



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**DETERMINAZIONE DELL'ORIGINE
BOTANICA DEL MIELE:**

**UN NUOVO ED AFFIDABILE METODO
DI RISONANZA MAGNETICA
NUCLEARE E CHEMIOMETRIA**

RELATORE: Dott.ssa ELISABETTA SCHIEVANO

CONTRORELATORE: Prof. ALESSANDRO BAGNO

LAUREANDO: MARCO PERGHER

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

INTRODUZIONE

CARATTERISTICHE DEL MIELE

PRODUZIONE

“Il miele è la sostanza naturale dolce che le api domestiche (*Apis mellifera* **Fig. 1.1**) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti dalle parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano, combinano con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare” (Direttiva 2001/110/CE del 20 dicembre 2001).



Fig. 1.1: *apis mellifera* al lavoro.

Il miele è una sostanza naturale utilizzata principalmente come alimento, prodotta dal nettare e dalla melata. Il nettare è un composto zuccherino generata da piante e fiori, secreto da particolari ghiandole chiamate nettarine. Contiene acqua fino al 90% e vari tipi di zuccheri, soprattutto glucosio, fruttosio e circa il 6% di saccarosio; si suddivide in 3 differenti tipologie secondo la prevalenza di uno di questi zuccheri (nel caso del saccarosio maggiore del 6%). Sono inoltre presenti altri zuccheri in piccole quantità, come raffinosio, maltosio e melibiosio. Nel nettare sono inoltre contenute tracce di altri componenti quali acidi organici, sali minerali, enzimi, pigmenti, sostanze organiche, vitamine, amminoacidi. La composizione nel nettare in questi elementi risulta relativamente costante per ogni specie botanica e determina la composizione del miele, lo stato fisico, il colore, l'odore, il sapore e l'aroma.

Come il nettare anche la melata deriva dalla linfa delle piante, ma mentre il primo è secreto attraverso un processo attivo, quest'ultima è prodotta in seguito all'intervento di insetti che succhiano in grande quantità la linfa delle piante per nutrirsi, trattenendo le sostanze azotate ed eliminando il liquido in eccesso (contenente prevalentemente zuccheri) che costituisce appunto la melata. Questa è composta principalmente da zuccheri semplici, ma in essa è maggiore la percentuale di oligosaccaridi; è prodotta da conifere (abete bianco, abete rosso, pino, larice), da piante non nettarifere (quercia, faggio, pioppo) e nettarifere (tiglio, salice, acero, castagno, robinia, alberi da frutto). Il miele di melata ha un

sapore meno dolce che quello prodotto a partire dal nettare, non cristallizza e si presenta particolarmente scuro, aromatico e denso.



Fig. 1.2: deposizione del miele in celle.

L'ape bottinatrice raccoglie una piccola quantità di nettare o di melata dalla pianta e la trasporta all'alveare dove è passata da un'ape all'altra; quest'operazione provoca la riduzione del contenuto d'acqua per evaporazione a causa dell'aria relativamente calda e secca presente all'interno dell'alveare e della grande superficie di scambio offerta dalla lingua allungata dell'ape (**Fig. 1.2**).

Durante questi passaggi, che hanno una durata di circa 20 minuti, il nettare si arricchisce di secrezioni ghiandolari dell'ape, cioè di enzimi che determinano una serie di trasformazioni chimiche; un esempio è l'enzima invertasi che è in grado di scindere il saccarosio in glucosio e fruttosio. Nel nettare, al momento della raccolta, sono presenti svariati tipi di zuccheri che, in questa fase, sono standardizzati dall'azione enzimatica.

In seguito la goccia di miele è depositata e sigillata con un tappo di cera (opercolo) nelle celle dell'alveare. In queste avviene un'ulteriore riduzione dell'acqua, fino a circa il 18% (tale quantità evita processi fermentativi che possono alterare le sue caratteristiche), con l'ottenimento di un miele maturo (**Fig. 1.3**).



Fig. 1.3: celle opercolate.

FASI DELLA LAVORAZIONE

Nel momento in cui l'ape finisce il proprio operato (produzione del miele maturo), comincia la lavorazione da parte dell'apicoltore. Questa si divide in diverse fasi ed ha come obiettivo l'ottenimento del miele in forma commercializzabile, al quale, per la legge italiana, non può essere aggiunto né sottratto alcun suo componente.



Fig. 1.4: soffiatura dei melari.

- **Fase 1: estrazione dei melari.** Avviene dopo aver prelevato i melari spostando le api dai favi con dei soffiatori (funzionano come dei ventilatori, **Fig. 1.4**).
- **Fase 2: disopercolatura.** Rimozione degli opercoli dalle celle nei melari per permettere al miele di fuoriuscire.
- **Fase 3: smielatura.** I melari sono posti negli smielatori (**Fig. 1.5**). Questi fanno fuoriuscire il miele grazie ad un processo di centrifugazione. Dallo smielatore il miele viene convogliato in vasche di raccolta.



Fig. 1.5: esempio di smielatore..

- **Fase 4: purificazione.** Serve ad eliminare particelle di cera, impurità e bolle d'aria che sono rimaste nel miele nel corso delle fasi precedenti. Viene effettuata attraverso tecniche di filtrazione e di decantazione. Durante questa ultima, le impurità, caratterizzate di un diverso peso specifico, si separano dalla massa del miele e possono essere così facilmente eliminate; sulla superficie si dispongono cera, insetti e parti d'insetti, materiali organici di varia natura, bolle d'aria mentre sul fondo si depositano particelle minerali e metalliche.

La filtrazione è realizzata per mezzo di filtri a sacco, a secchio o a cartuccia, con maglie di dimensioni decrescenti per evitare che le impurità ostruiscano i pori. Questo metodo è più veloce del precedente, ma va applicato attentamente: si corre il rischio di eliminare alcune particelle solide del miele, quali granuli di polline ed elementi indicatori di melata, considerate invece parti integranti del miele stesso ed utili per risalire all'origine geografica e botanica attraverso l'analisi microscopica.

- **Fase 5: trattamenti termici.** Possono essere fatti con diverse finalità, ad esempio per fluidificare i mieli cristallizzati, per invasarli, filtrarli o allungare il tempo di vita del prodotto allo stato liquido. Essi hanno sempre un effetto negativo sul prodotto in termini di perdita d'aroma a causa della presenza di sostanze termolabili (dipende dalla temperatura raggiunta e dalla durata del riscaldamento).
- **Fase 6: confezionamento.** Il miele, prima di cristallizzare, è invasato in contenitori di vetro o plastica. I recipienti utilizzati devono avere un sistema di chiusura ermetico che isoli totalmente il miele dall'aria in modo tale da preservarlo ed evitare che si formi della schiuma.

COMPOSIZIONE CHIMICA

Il miele è una miscela complessa ed i suoi componenti, oggetto di continue ricerche ed analisi, non sono ancora completamente noti; sono state identificate più di 300 molecole, ma spesso ne viene scoperta una nuova che risulta essere di notevole importanza farmacologica e dietetica.

Gli elementi principali del miele, vale a dire le sostanze presenti in tutti i tipi, anche se in proporzioni variabili sono zuccheri, acqua, sali minerali, acidi organici ed enzimi

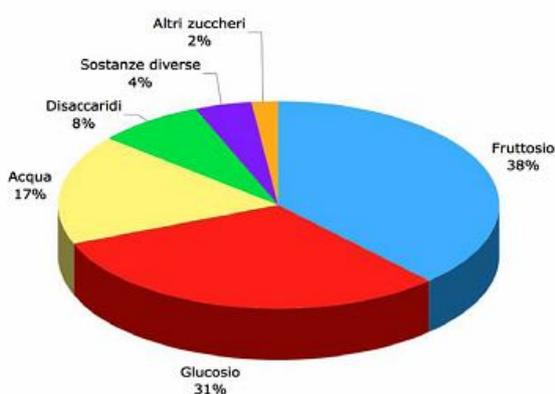


Fig. 1.6: diagramma dei principali componenti del miele.

l'andamento stagionale, le tecniche apistiche impiegate e le modalità di conservazione. Questi fattori influenzano notevolmente sia la composizione chimica, sia le caratteristiche morfologiche e organolettiche del miele.

(**Fig. 1.6**).

Due mieli, però, non possono mai essere identici perché il contenuto e il tipo di tali sostanze dipendono da alcuni fattori esterni, quali la composizione del nettare o della melata di partenza, la zona di provenienza, le condizioni climatiche,

Zuccheri

Dal punto di vista quantitativo gli zuccheri costituiscono i principali componenti del miele, rappresentando più del 95% della sostanza secca e circa l'85% della totale. La quantità ed il loro rapporto sono molto variabili in funzione dell'origine botanica del miele. L'elevato contenuto di zuccheri contribuisce in modo fondamentale a definire numerose proprietà fisiche e alimentari del miele: la viscosità, l'igroscopicità, lo stato fisico (liquido o cristallino), il valore energetico, il potere dolcificante.

Sono maggiormente presenti i monosaccaridi glucosio e fruttosio che, in rapporto variabile tra loro, insieme costituiscono circa il 90% degli zuccheri totali; solitamente il contenuto di fruttosio è leggermente superiore a quello di glucosio (mediamente, rispetto al peso netto, è presente circa il 38% di fruttosio e circa il 31% di glucosio, **Fig. 1.6**). Il fruttosio è molto solubile in acqua ed è una sostanza igroscopica, permette quindi di conservare il miele allo stato liquido. Al contrario, un contenuto elevato di glucosio comporta una maggiore propensione alla cristallizzazione del miele, dato che questo zucchero ha una minor

solubilità in acqua. Un'elevata quantità di fruttosio, inoltre, contribuirà a rendere il miele più dolce, poiché questo zucchero è caratterizzato da un potere dolcificante di 1.7, superiore a quello del saccarosio e a quello del glucosio, rispettivamente 0.6 e 0.7. Il potere dolcificante di una soluzione viene misurato rispetto ad una soluzione di saccarosio ugualmente dolcificata, secondo il seguente rapporto:

$$f(c_s) = \frac{C_s}{C_x}$$

Dove C_s e C_x sono le concentrazioni, in mol/L della soluzione standard e di quella da analizzare.

Il miele contiene anche diversi oligosaccaridi (**Fig. 1.7**) il cui contenuto medio è del 5-10% rispetto agli zuccheri totali. Questi non influiscono sulle proprietà fisiche e organolettiche, ma possono essere utili per determinare l'origine botanica del miele; infatti, la loro composizione dipende dalla pianta dalla quale esso deriva. Fino ad ora è stata verificata la presenza di 20 diversi tipi di saccaridi.

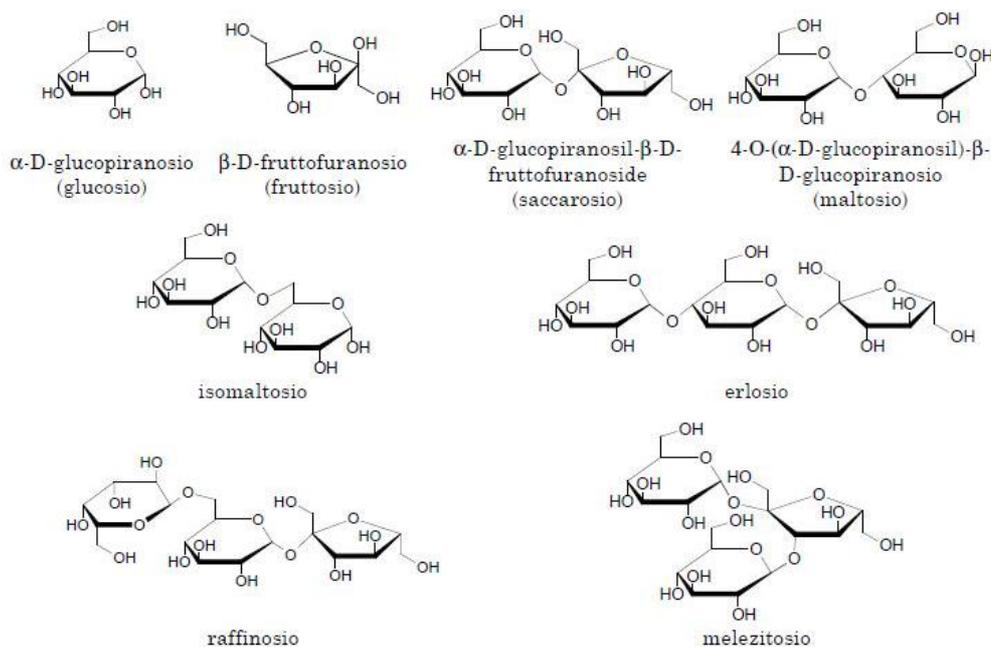


Fig. 1.7: alcuni zuccheri presenti nel miele.

Il saccarosio presente è dovuto alla non completa idrolisi, da parte degli enzimi, di tutto quello presente nel nettare o nella melata di partenza. Altri disaccaridi presenti normalmente nel miele sono il maltosio e l'isomaltosio mentre zuccheri come l'erlosio, non presenti nel nettare, sono il risultato di trasformazioni enzimatiche operate dalle secrezioni ghiandolari dell'ape; il meleztosisio, invece caratteristico di molti mieli di melata, viene sintetizzato durante il passaggio della linfa nel corpo dell'insetto produttore di melata, mediante l'azione di enzimi secreti dall'intestino e dalle ghiandole salivari.

Anche dopo l'estrazione del miele gli enzimi ancora presenti continuano la loro azione modificando ulteriormente la composizione zuccherina. L'invecchiamento del miele porta ad un aumento del tasso di glucosio, ad una diminuzione dei polisaccaridi e alla degradazione del fruttosio con produzione di idrossimetilfurfurale (HMF).

Acqua

Il contenuto d'acqua è una caratteristica importante in quanto influenza la conservabilità e la lavorabilità del miele. Esso è mediamente del 17% e non deve superare il 20%; percentuali elevate di acqua facilitano processi di fermentazione, mentre valori troppo bassi peggiorano la lavorabilità del miele (in particolare nella centrifugazione e nell'estrazione).

Il contenuto d'acqua nel prodotto dipende da diversi fattori: origine botanica, condizioni atmosferiche e ambientali precedenti e successive all'estrazione, stagione di produzione, modalità di intervento dell'apicoltore, condizioni di conservazione.

Acidi organici

I mieli contengono acidi organici in percentuali non elevate (in peso 0.1-1%); questi possono trovarsi nella loro forma libera o nella loro forma esterificata.

L'acido quantitativamente più importante è l'acido gluconico che determina in buona parte l'aroma del miele; si forma dal glucosio in seguito all'azione dell'enzima glucosio ossidasi, con liberazione di acqua ossigenata. Altri acidi organici presenti nel miele in piccola parte sono: acetico, butirrico, lattico, citrico, succinico, formico, maleico, malico e ossalico.

La presenza di questi composti fa sì che il pH del miele sia acido con valori compresi tra 3.6 e 4.8^[1]. Solitamente essi risultano più bassi nei mieli di nettare e più elevati in quelli di melata; si possono trovare anche con pH inferiore o superiore (per esempio quello di castagno ha un pH compreso tra 5 e 6). L'acidità totale si esprime in milliequivalenti per chilogrammo ed i suoi valori possono variare notevolmente da un miele all'altro (compresa da 10 a 40 meq/kg); essa contribuisce a determinare la stabilità del prodotto nei confronti dei microrganismi. Ne segue che il pH deve sempre essere tenuto sotto controllo durante l'estrazione e il confezionamento del miele in modo da evitare possibili contaminazioni microbiche.

L'acidità aumenta con l'invecchiamento comportando la perdita progressiva delle sostanze aromatiche e la diminuzione dell'attività degli enzimi; a causa di ciò è vietato commercializzare mieli con acidità maggiore di 40 meq/kg.

Sostanze minerali

Alcuni studi effettuati sul miele mediante spettrometria ad emissione atomica accoppiata al plasma, hanno rivelato una presenza significativa di K, Na, Ca, Mg^[2], Cl, S, P, Si, Fe, Mn, e Cu^[3,4]. La concentrazione degli elementi può essere misurata anche usando uno spettrofotometro a fiamma ad assorbimento atomico (AAS) o con un elettrodo ionoselettivo (ISE).

Il contenuto di sali minerali nel miele è in generale basso (0.02- 1%) e molto variabile. Influenza moltissimo il colore del miele: generalmente i mieli chiari sono poveri di sostanze minerali, mentre quelli più scuri, in particolare il miele di castagno e quello di melata, ne sono più ricchi^[5]. La presenza di questi è causata dall'assorbimento, attraverso la linfa, dei minerali contenuti nel terreno. Per questo la quantità di ogni sale varia da miele a miele a seconda dell'origine botanica e geografica^[6].

Proteine e amminoacidi

Il miele è povero di amminoacidi liberi e di proteine (contiene mediamente lo 0.2-0.3%). Questi possono essere presenti nel nettare, nella melata o possono essere contenuti nei granuli di polline che si trovano nel miele. Alcuni amminoacidi provengono anche da secrezioni delle api e si trovano in tutti i mieli; un esempio è la prolina, l'amminoacido libero presente in maggior quantità^[7].

Altri amminoacidi identificati presenti nel miele sono, ad esempio, l'arginina, l'istidina, la leucina, la lisina e la metionina (**Fig. 1.8**).

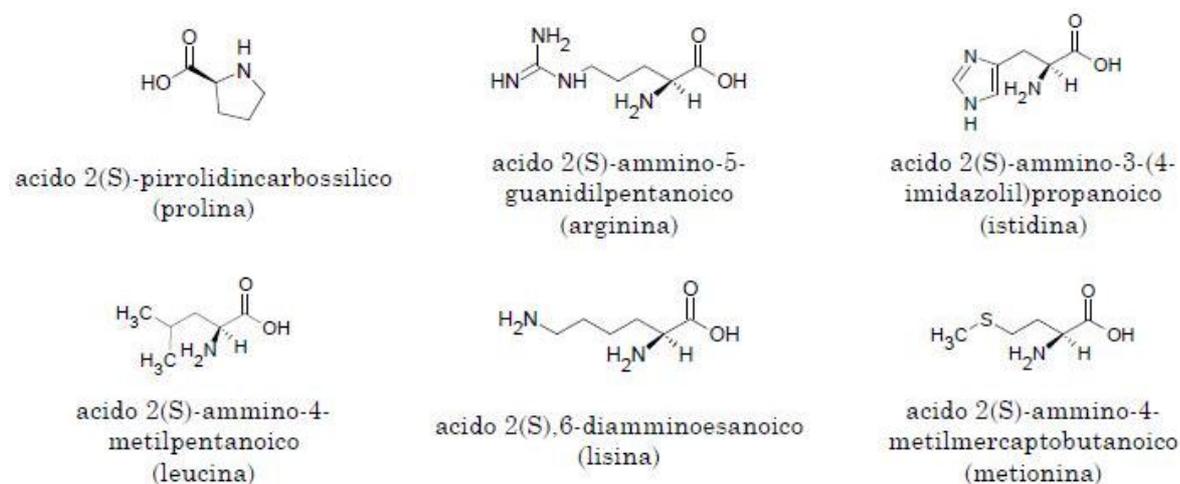


Fig. 1.8: *i principali amminoacidi presenti nel miele.*

Una particolare classe di sostanze proteiche che riveste un'importanza particolare è rappresentata dagli enzimi.

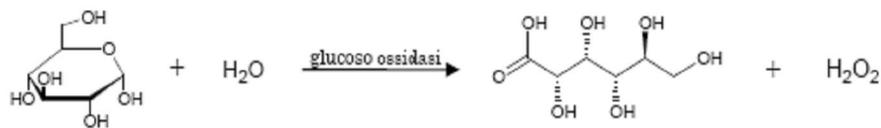
Enzimi e vitamine

Il miele contiene diversi enzimi derivanti dalle secrezioni ghiandolari delle api, dal nettare e dalla melata. Essi rivestono un'elevata importanza perché catalizzano la maggior parte delle reazioni che portano alla formazione del miele. Inoltre, poiché essi si degradano progressivamente nel tempo o in seguito a trattamenti termici, la loro quantità può costituire un indice di freschezza del prodotto.

I principali enzimi del miele sono l'invertasi e glucosio ossidasi (secreti da una ghiandola delle api), le diastasi e varie amilasi (d'origine in parte animale ed in parte vegetale), le catalasi e fosfatasi (derivanti dal nettare e dalla melata).

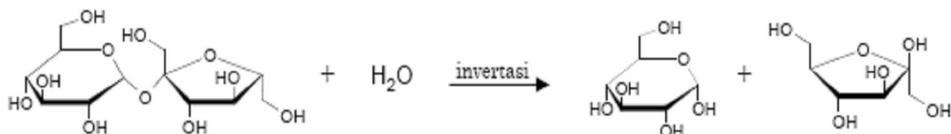
Essi svolgono diverse funzioni:

- La glucosio ossidasi, in presenza di acqua, provoca l'ossidazione del glucosio con liberazione di acido gluconico e acqua ossigenata (**Schema 1.1**):



Schema 1.1: ossidazione del glucosio.

- L'invertasi catalizza l'idrolisi del legame glicosidico del saccarosio, generando i due monomeri che lo costituiscono (D-glucosio e D-fruttosio) secondo la reazione (**Schema 1.2**):



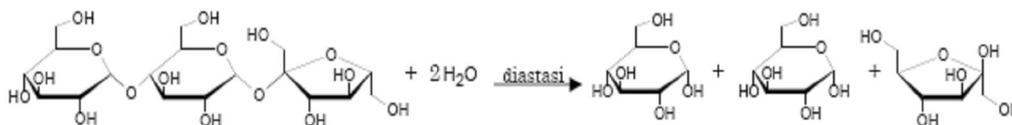
Schema 1.2: azione dell'enzima invertasi.

La reazione è accompagnata da una modifica della rotazione ottica da destroripa a levogira; per questo motivo l'enzima prende il nome di invertasi ed il prodotto generatosi viene detto zucchero invertito.

- La catalasi catalizza la conversione dell'acqua ossigenata in acqua e ossigeno:



- La diastasi, in presenza di acqua, scinde gli oligosaccaridi, come l'erlosio, in composti più semplici (**Schema 1.3**):



Schema 1.3: azione dell'enzima diastasi.

Questo enzima si degrada con il passare del tempo e se sottoposto a trattamenti termici. La quantità di diastasi presente nel miele, indice diastasio, viene misurata secondo la scala di Schade ed è indice della freschezza del miele.

Il miele è un alimento estremamente povero di vitamine; le quantità presenti sono dell'ordine di mg/kg e non hanno assolutamente importanza dal punto di vista nutritivo, tenuto conto delle dosi di miele normalmente assunte. Le vitamine presenti appartengono al gruppo delle idrosolubili: tiamina, riboflavina, acido ascorbico, piridossina, acido pantotenico, biotina, acido folico, niacinamide (**Fig. 1.9**).

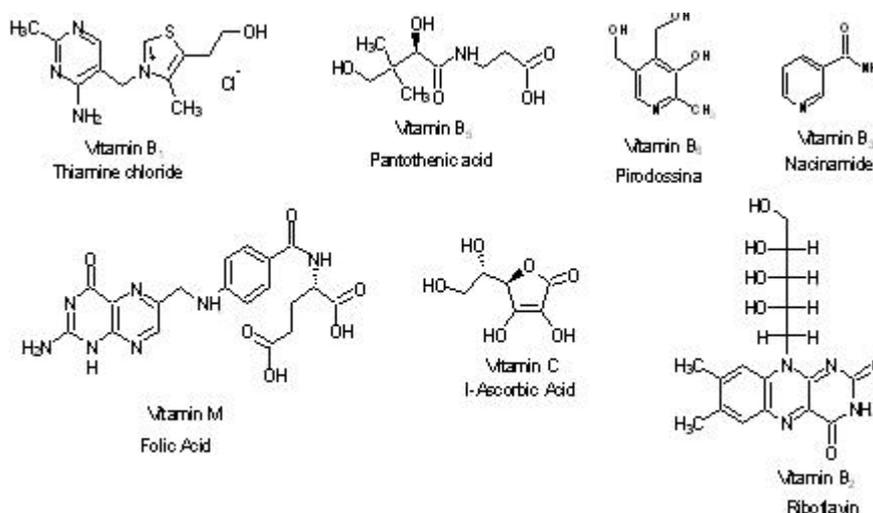


Fig. 1.9: le principali vitamine presenti nel miele.

Le vitamine che si trovano nel miele derivano non dal nettare, ma dal polline che le contiene in concentrazioni ben più elevate.

Costituenti minori

Nel miele sono presenti dei costituenti minori, sostanze che si trovano in quantità estremamente ridotte e chimicamente molto diverse tra loro:

- *Composti aromatici e sostanze volatili:* si tratta di diversi composti (acidi, alcoli, chetoni, aldeidi, esteri, furani) che sono presenti in varie proporzioni. Essi sono differenti per ogni specie di miele e contribuiscono a caratterizzare l'aroma del prodotto. Trattandosi di sostanze volatili e termolabili risultano di difficile

identificazione; alcune, tuttavia, sono state determinate attraverso tecniche NMR e gascromatografiche. In particolare uno studio GC effettuato sui mieli di castagno e di limetta, ha potuto individuare come markers del castagno queste sostanze: acetofenone, 1-fenil etanolo e 2-aminoacetofenone^[8]. Un altro studio realizzato su diverse specie di miele tra cui castagno ed acacia, ha individuato diversi componenti^[9], tra cui furani come il 2-acetil furano e la 2-furaldeide (furfurale, **Fig. 1.10**), esteri come il salicilato di metile e benzoato di propile (**Fig. 1.11**).



Fig. 1.10: a) 2-Acetil furano b) 2-Furaldeide(Furfurale).

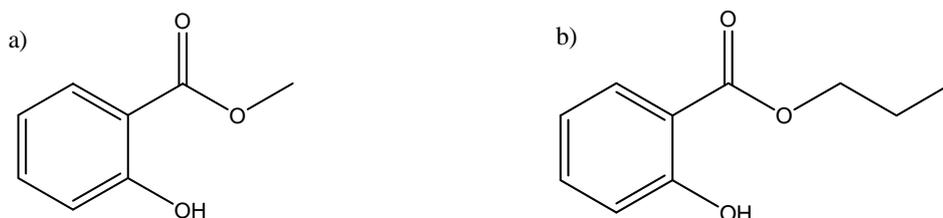


Fig. 1.11: a) Salicilato di metile b) Acido benzoico propil estere.

Infine uno studio sul tiglio ha evidenziato la presenza alcuni due markers di quest'origine: il 4-(1-idrossi-1-metiletil)cicloesa-1,3-diene-1-carbossilico e l'acido 4-(1-metiletilene)cicloesa-1,3-diene-1-carbossilico^[10].

Altre sostanze aromatiche sono i fenoli, a volte presenti in seguito a trattamenti effettuati dagli apicoltori; sono stati identificati il timolo e il carvacrolo^[11].

Composti di importanza non secondaria sono infine i flavonoidi. Essi sono pigmenti di origine vegetale che contribuiscono alla formazione del colore e risultano utili per la determinazione dell'origine geografica^[12]. In **Fig. 1.12** sono riportati due flavonoidi trovati in alcuni tipi di miele.

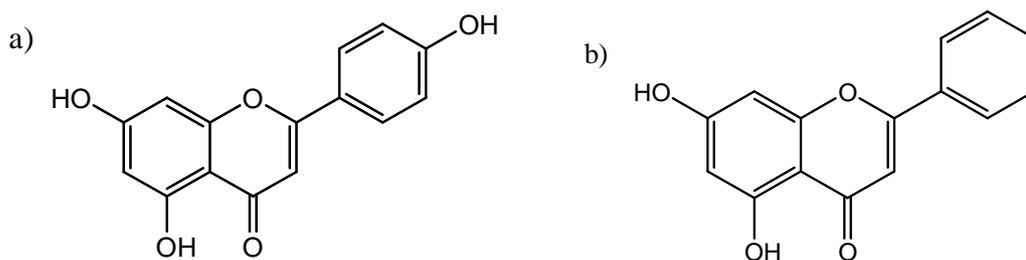


Fig. 1.12: a) Apigenina (5,7,4-triidrossiflavone) b) Crisina (5,7-diidrossiflavone).

- *Lipidi*: la loro presenza nel miele è praticamente insignificante ed è probabilmente collegata alle cere residue provenienti dalle estrazioni.
- *Esteri ed alcoli*: sono presenti relativamente in gran quantità e sono di diversi tipi in base alle diverse origini del miele. Esempi di questi composti sono l'acetato di geranile e il linaloolo (**Fig. 1.13**).

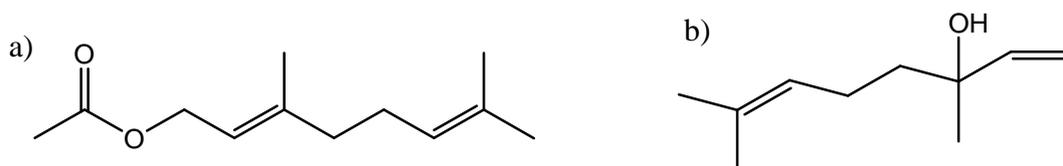


Fig. 1.13: a) Acetato di geranile (3,7-dimetil 2,6-octadien-1-acetato)
b) Linaloolo (3,7-dimetil-1,6-octadien3-olo).

- *Idrossimetilfurfurale*: è una sostanza (**Fig. 1.14**) praticamente assente nel miele appena estratto; si forma successivamente per degradazione degli zuccheri, in particolare del fruttosio in ambiente acido. La sua concentrazione aumenta, con il passare del tempo, tanto rapidamente tanto più il miele è stato sottoposto a trattamenti termici; mieli di buona qualità presentano valori di HMF attorno ai 20 mg/kg.

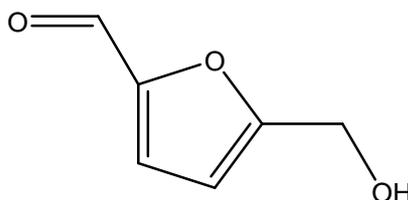


Fig. 1.14: Idrossimetilfurfurale (HMF).

- *Propoli*: può essere presente in tracce all'interno del miele. È una sostanza resinosa che le api raccolgono dalle gemme e dalla corteccia delle piante. Viene considerata d'origine vegetale nonostante le api la elaborino con l'aggiunta di cera, polline ed enzimi prodotti dalle stesse. Normalmente contiene il 25-30% di cera, il 45-55% di resine e balsami, il 10% di oli essenziali, il 5% di polline e il 5% di sostanze organiche e minerali.
- *Sostanze esogene*: possono essere sostanze di origine naturale o aggiunte dall'uomo. Un esempio delle prime è l'acido ossalico, l'acido formico e l'acido lattico; sono utilizzate per combattere un acaro parassita delle api (*Varroa*

destructor) che, nutrendosi della loro emolinfa, ne causa la morte. Eventuali sostanze nocive aggiunte dall'uomo per uccidere i parassiti devono rientrare nei valori di soglia stabiliti dalle normative vigenti.

PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE

Le proprietà fisiche del miele sono strettamente correlate alla sua composizione chimica. Sostanze come acqua e zuccheri, per esempio, determinano proprietà quali l'indice di rifrazione, l'igroscopicità e la capacità di cristallizzare mentre i sali influenzano la conducibilità elettrica.

Le proprietà che condizionano maggiormente le caratteristiche del miele sono le seguenti:

- *Indice di rifrazione*: varia linearmente con il contenuto di umidità (aumenta al diminuire della percentuale di acqua). La sua determinazione è uno strumento utile per conoscere il contenuto di questa nel miele.

- *Densità*: a 20 °C varia da 1.39 a 1.43 g/cm³, con un valore medio di 1.42 g/cm³.

- *Viscosità*: è generalmente alta a causa dell'elevata concentrazione di zuccheri (rende l'idea la **Fig. 1.15**).

Essa è legata al contenuto d'acqua e alla temperatura: maggiore è la quantità di acqua presente e la temperatura, più bassa è la viscosità (diventa stabile a circa 40 °C).

- *pH*: come già citato precedentemente, il pH ideale è circa pari a 5 ma spesso si possono avere valori più bassi. L'invecchiamento del miele comporta l'aumento dell'acidità, con conseguente perdita delle sostanze che



Fig. 1.15: viscosità del miele.

forniscono l'aroma e perdita di attività degli enzimi. Un metodo (detto di White) permette di misurare l'*acidità totale* come somma dell'*acidità libera*, dovuta agli acidi organici, e dell'*acidità combinata*, dovuta alla presenza di lattoni. Si basa sulla determinazione del pH attraverso misure potenziometriche e neutralizzazioni acido-base fatte su una soluzione costituita da miele (10 g) e acqua (75 mL). Si utilizza questo metodo perché gli acidi organici si trovano in una condizione di equilibrio tra la forma libera e quella combinata (esterificata o lattonificata in caso degli ossoacidi). In particolare vengono effettuate due titolazioni potenziometriche a punto finale (l'erogazione del titolante viene interrotta a pH prefissato) e l'acidità libera viene misurata per titolazione diretta, mentre i lattoni vengono idrolizzati aggiungendo alcali alla soluzione del miele ed infine determinati con una retrotitolazione^[13].

- *Igroscopticità*: è causata dall'elevata presenza di zuccheri. Il miele è una sostanza molto igroscopica, tende a raggiungere un equilibrio igrometrico con l'ambiente esterno: in ambiente umido assorbe acqua, mentre in ambiente secco la cede (questo processo è molto più lento del primo). Quindi è importante che il miele sia conservato in ambienti con umidità relativa bassa (non superiore al 60%). Questo per evitare che il contenuto d'acqua venga modificato e con esso varie proprietà quali, per esempio, la cristallizzazione (in seguito a fenomeni di fermentazione del prodotto).

- *Conducibilità elettrica*: vale in media 0.5-0.8 mS/cm. Nel miele le sostanze ionizzabili in grado di condurre sono essenzialmente sali, acidi organici e proteine. La misura di questa proprietà può essere quindi utile per determinare la quantità di sali presenti: quelli di melata e quelli particolarmente scuri presentano, solitamente, i valori di conducibilità elettrica più elevati di quelli di nettare.

- *Rotazione specifica*: tale proprietà è conferita dagli zuccheri e da molecole chirali. L'angolo di rotazione è dato dalla somma degli angoli di rotazione dei singoli zuccheri; la maggior parte dei mieli di nettare sono destrorigiri, mentre i mieli di melata sono levogiri.

- *Colore*: varia naturalmente dalle tonalità più chiare del giallo a quelle più scure dell'ambra, fino praticamente al nero; non mancano mieli con riflessi verdi o rossi (**Fig. 1.16**). Le sostanze specifiche responsabili del colore del miele sono in parte ancora sconosciute; vi contribuiscono prodotti derivati dagli zuccheri, da alcuni pigmenti vegetali (carotene, xantofille, antociani, flavonoidi), da amminoacidi e sali minerali^[14]. Il colore del miele è legato all'origine botanica ed è pertanto un importante parametro per la definizione dei mieli uni floreali. Il miele di acacia, ad esempio, presenta un colore giallo paglierino, quello di castagno un ambrato molto scuro e quello di tiglio un ambrato chiaro. Cambiamenti di colore possono anche derivare da interventi dell'apicoltore (uso di favi vecchi, contatto con metalli, alte temperature di lavorazione), dalle modalità di conservazione (esposizione alla luce, lunghi tempi di stoccaggio) e dall'invecchiamento.



Fig. 1.16: vasetti di miele di vari colori.

Il colore viene misurato in mm della scala Pfund, utilizzando appositi comparatori ottici: lo strumento è costituito da una scala campione di vetrini colorati, un piccolo contenitore per

il campione da misurare e una scala millimetrata dotata di un puntatore per indicare la posizione lì dove il campione ha la stessa gradazione di colore rispetto al vetrino di riferimento. Esiste una classificazione del miele mediante una scala messa a punto dal Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti e comunemente utilizzata nel commercio internazionale (**Tab. 1.1**).

<i>INDICE DI PFUND</i>	<i>DENOMINAZIONE</i>
Fino a 8 mm	Bianco acqua
Da 9 a 17 mm	Extra Bianco
Da 18 a 34 mm	Bianco
Da 35 a 50 mm	Ambra extra chiaro
Da 51 a 85 mm	Ambra chiaro
Da 86 a 114 mm	Ambra extra chiaro
Più di 115 mm	Ambra scuro

Tab. 1.1: *Classificazione del colore del miele usata nel commercio internazionale.*

- *Cristallizzazione:* assieme al colore, è uno dei parametri di maggiore importanza per la valutazione del miele dal punto di vista commerciale. Il miele cristallizza sulla base di un processo naturale in quanto è una soluzione soprasatura di zuccheri; il prodotto tende nel tempo a passare da una forma disordinata (amorfa) ad un'ordinata (cristallina) a causa della precipitazione degli zuccheri sotto forma di cristalli. Il processo di cristallizzazione porta alla formazione di cristalli di glucosio monoidrato, in quantità, forma e disposizione diverse secondo le condizioni in cui il processo ha avuto luogo: maggiore è il tempo in cui questo avviene, tanto più voluminosi saranno i cristalli.

La tendenza di un miele alla cristallizzazione muta in relazione alla sua composizione (contenuto di acqua e zuccheri) ed alla temperatura di conservazione. Essa risulta più rapida in mieli ricchi di glucosio (il tenore di glucosio supera il 28%), che presentano particelle solide in sospensione, che hanno un appropriato contenuto d'acqua (compreso tra il 15 e il 18%) e che sono conservati ad una temperatura prossima ai 14 °C. La velocità di formazione dei cristalli è massima a tale temperatura mentre sopra ai 25 °C e sotto ai 5 °C risulta completamente inibita. Questo perchè sopra i 25 °C il processo rallenta a causa della distruzione dei cristalli (a 78 °C la distruzione è completa e il miele non può più cristallizzare) e al di sotto dei 4 °C la viscosità è troppo elevata, limitando il movimento delle molecole e rallentando così il processo.

La cristallizzazione modifica solo l'aspetto del prodotto, ma non influenza alcuna caratteristica o proprietà nutritiva (gli unici cambiamenti consistono nell'aspetto e nel

sapore che diventa leggermente meno dolce). Il contrario avviene sottoponendolo ad alte temperature al fine di distruggere i cristalli di glucosio ed ottenere un miele liquido (si denaturano gli enzimi e le vitamine).

PROPRIETÀ TERAPEUTICHE

Un cenno merita alcune proprietà del miele che, insieme agli altri prodotti delle api (pappa reale, polline e soprattutto propoli e veleno d'ape, **Fig. 1.17**), lo fanno impiegare come terapia per la cura delle affezioni reumatiche, ulcere, artriti^[15] e certe malattie infiammatorie come il mal di gola. Le sue principali proprietà sono:

- *antiossidante e antiradicali liberi*. Questa è causata dai composti fenolici, dalla vitamina C e da altre sostanze^[16,17]. Viene analizzata attraverso metodi che osservano la capacità di questi composti a neutralizzare i radicali liberi in soluzione;
- *antimicrobica*. Questa è causata dal perossido di idrogeno prodotto dall'azione degli enzimi ossidasi e da altri tipi di molecole come la pinocembrina (flavonoide) e vari acidi. E' studiata osservando l'azione di queste sostanze contro determinati batteri^[18].

I composti contenuti nel miele possiedono anche altre proprietà di carattere farmacologico, tuttora fonte di studio. Ad esempio i flavonoidi possiedono proprietà analgesiche, inibendo le cicloossigenasi^[19], e l'acido chinurenico agisce sul sistema nervoso centrale legandosi ai recettori dell'acido glutammico^[20].



Fig. 1.17: in ordine da sinistra: miele, pappa reale, propoli e veleno d'ape.

NORMATIVA ED ANALISI SUL MIELE

DENOMINAZIONE D'ORIGINE BOTANICA

La direttiva europea sul miele (409/74) e la corrispondente legge italiana (753/82) prevedono una classificazione del miele secondo la sua origine botanica e geografica. Tale direttiva risulta chiara dal punto di vista delle indicazioni geografiche, ma incompleta per quanto riguarda quelle botaniche. Essa, infatti, afferma che al miele può essere applicata un'indicazione legata all'origine vegetale o floreale se il prodotto proviene *soprattutto* da tale origine e ne possiede le caratteristiche organolettiche, chimico-fisiche e microscopiche. La legge avrebbe dovuto essere completata da un decreto applicativo contenente, per ogni tipologia di miele unifloreale, dei limiti ben precisi e caratteristici per i vari parametri organolettici, chimico-fisici e microscopici, che avrebbero permesso di verificare le denominazioni utilizzate nel commercio^[21].

Esistono due categorie di miele: unifloreale e multifloreale. Il primo deriva principalmente da una specie botanica (in questa categoria rientrano anche i mieli di melata poiché hanno un'unica origine, anche se non nettarifera); il secondo deriva da raccolte che si protraggono per un certo periodo e in cui non vi è una specie predominante. Per definire se il miele è unifloreale è necessario studiare numerosi campioni dell'origine in questione, provenienti da diverse zone e rappresentativi di diverse annate.

Attualmente sono stati classificati 18 tipi di miele unifloreale prodotto in Italia: robinia, cardo, castagno, erica, agrumi, eucalipto, corbezzolo, erba medica, rododendro, girasole, sulla, rosmarino, nespole del Giappone, tiglio, timo, tarassaco, melata di Metcalfa e melata di abete. I mieli unifloreali sono considerati una tipologia privilegiata, ma in realtà il loro valore non è intrinsecamente superiore a quello dei millefiori; alcuni, per esempio, possono non essere graditi alla maggior parte dei consumatori per un aroma particolare legato alla loro origine e una tendenza a cristallizzare irregolarmente. D'altra parte i mieli unifloreali hanno il vantaggio di essere tra loro diversi, con caratteristiche costanti e riconoscibili, in grado di soddisfare il gusto del consumatore in modo particolare. Certamente la produzione dei mieli unifloreali richiede all'apicoltore maggiore impegno e professionalità^[22].

DENOMINAZIONE DI ORIGINE GEOGRAFICA

Le caratteristiche organolettiche e la composizione del miele sono notevolmente influenzate da diversi fattori tipici del territorio di produzione come, per esempio, dalla

vegetazione, dal tipo di suolo, e dalle diverse attività umane che possono avere degli effetti negativi sulla salubrità del prodotto.

La Legge italiana 753/82 sul miele prevede due livelli di denominazione geografica:

- ⇒ **art. 3** (obbligatorio) che discrimina il miele prodotto totalmente o parzialmente all'esterno della Comunità Europea;
- ⇒ **art. 6** (facoltativo) secondo il quale il miele può essere commercializzato con un'indicazione relativa all'origine geografica, quale un nome regionale, territoriale o topografico, qualora il miele provenga totalmente dall'origine indicata.

La provenienza geografica contribuisce al valore commerciale del miele sia per caratteristiche reali del prodotto, sia per l'immagine sia ne può derivare (previsto dalle norme sul miele e dal regolamento CE 2081/92).

Il controllo dell'origine geografica del miele è affidato completamente all'analisi pollinica. Il quadro pollinico che si ottiene da un esame microscopico, infatti, corrisponde dal punto di vista floristico alla zona di produzione.

LIMITI DELL'ANALISI MELISSOPALINOLOGICA

L'analisi melissopalinoLOGICA, ossia l'analisi del polline dei mieli, è nata con la finalità di determinare l'origine geografica del prodotto; in seguito è stata applicata alla definizione dell'origine botanica. La mellissopalinoLOGICA è quindi quella branca della palinologia (scienza che si occupa dello studio dei pollini) che studia l'origine botanica e geografica dei mieli sulla base dell'analisi microscopica e sul riconoscimento dei pollini e degli altri elementi presenti^[23].

Tale tecnica presenta diversi limiti e problematiche che non permettono di identificare con precisione l'origine botanica del miele. Il polline che si trova nel miele non deriva solo dalle fasi di raccolta del nettare (arricchimento primario, l'unico in relazione con l'origine botanica), ma anche da quelle successive di elaborazione da parte delle api (arricchimento secondario), dalle operazioni di smielatura (arricchimento terziario) o dal polline disperso nell'atmosfera (arricchimento quaternario). L'analisi pollinica non può quindi essere completamente risolutiva per l'identificazione dell'origine botanica, in quanto contiene elementi di disturbo.

Un altro forte elemento di imprecisione deriva dal fatto che la quantità di polline presente nel nettare al momento della raccolta è estremamente variabile secondo l'origine: per esempio, il nettare di tiglio contiene sempre pochi granuli pollinici in quanto la forma capovolta dei fiori e la posizione dei nettari non permettono un consistente arricchimento

primario. Molti apicoltori, inoltre, sono soliti durante l'anno spostare le proprie arnie in diverse aree geografiche, dai monti alle pianure, in maniera tale da riuscire a produrre miele di diverse origini botaniche secondo la zona e del periodo dell'anno e di incrementare così la produzione. Le arnie che vengono spostate possono contenere ancora il polline di specie botaniche delle zone in cui si trovavano precedentemente e quindi il miele successivamente prodotto può risultarne contaminato. A differenza di quel che si pensa, in seguito ad un'analisi melissopalinoologica, la specie botanica che crediamo essere dominante nella maggior parte dei casi risulta presente solo in piccola percentuale e saranno trovati in abbondanza pollini non presenti al momento del raccolto.

Oltre ai limiti sopra descritti possiamo riscontrare altre problematiche pratiche. La prima riguarda il fatto che le analisi devono essere svolte da personale estremamente specializzato ed esistono pochissimi laboratori che possiedono gli strumenti adatti all'analisi e tale personale. Il secondo problema riguarda la standardizzazione dell'analisi stessa: il riconoscimento dei pollini da parte degli analisti può essere standardizzato solo attraverso una formazione uniforme ed un costante aggiornamento.

La standardizzazione dell'interpretazione dei risultati si basa sul sistema informatico che è di uso ancora limitatissimo, non esistendo una banca dati sufficientemente estesa. Esiste inoltre un'imprecisione di base sulla valutazione dello spettro pollinico riguardante il campionamento (la preparazione di un vetrino a partire da pochi grammi di miele), che è troppo ridotto per poter avere dei risultati identici ripetendo l'analisi, in termini di tipi di pollini riscontrati ed in termini di accuratezza che, affinché sia dell'ordine dell'1% nella stima delle frequenze relative, necessita di un conteggio su 40000 granuli pollinici, aumentando così i costi della tecnica. Da ciò deriva che questo tipo di analisi non permette di arrivare a risultati riproducibili quanto quelli ottenibili con altre tecniche.

FRODI SULL'ORIGINE DEL MIELE

Nel caso dell'origine geografica il miele, in caso di frode, è venduto con una denominazione che non gli corrisponde. Il problema sta nei limiti dell'analisi pollinica e nel fatto che gli spettri pollinici possono subire delle variazioni in seguito alla variazione dell'agroecosistema dei sistemi di apicoltura; possono essere facilmente modificati nel corso della lavorazione, proprio con la finalità di frode, attraverso miscelazione tra mieli diversi o eliminando il polline presente in esso attraverso filtrazione spinta e sostituendolo poi con pollini di altre origini. Un miele filtrato si riconosce facilmente per il ridottissimo

numero di elementi figurati presenti (granuli pollinici ed indicatori di melata); la filtrazione spinta, vietata dalla legge, può avere anche la finalità di ridurre i rischi di ricristallizzazione ed è applicata nella lavorazione del miele destinato alla commercializzazione negli Stati Uniti dove la tecnica è permessa.

Nel caso dell'origine botanica sono frequenti errori di valutazione del prodotto da parte dell'apicoltore e dei commercianti. Il problema, quindi, se guardato dal punto di vista del consumatore, non sta nel definire una percentuale minima di origine, ma nel precisare dei limiti di composizione e di caratteristiche che facciano sì che il consumatore riscontri nel miele comprato tutte le caratteristiche (per esempio colore, aspetto fisico, odore e sapore) proprie della specie botanica desiderata. Il controllo può essere fatto attraverso la verifica della corrispondenza alle caratteristiche organolettiche, chimico-fisiche e microscopiche standard. Per alcuni tipi di mieli più comuni sono riportate in letteratura le schede con le loro caratteristiche specifiche e sarà quindi sufficiente solo la verifica organolettica. Quando invece il risultato della smielatura è diverso dall'atteso (per esempio l'acacia è troppo scura o saporita, il castagno comincia a cristallizzare due mesi dopo la produzione) è necessario verificare se il prodotto, visibilmente meno puro della norma, rientra o no negli standard previsti.

ESEMPI DI METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ORIGINE BOTANICA E GEOGRAFICA

Selezionati vari campioni di mieli scelti in base all'origine da studiare, vengono eseguite analisi su componenti o proprietà ritenute maggiormente caratterizzanti^[24]: misure chimico-fisiche per il controllo della qualità (pH, rotazione specifica, spettro degli zuccheri, enzimi, colore, etc)^[25], determinazione del contenuto di minerali^[26], determinazione della composizione di carboidrati^[27], di amminoacidi^[28], di composti fenolici^[29] e di altri componenti^[30].

Lo studio può essere effettuato con diverse tecniche, scelte in base a vari fattori secondo i casi, e risulta accompagnato con una trattazione statistica dei dati ottenuti.

In seguito sono elencati alcuni metodi d'analisi utilizzati:

- Spettroscopia FT-NIR^[31] su campioni non estratti;
- Spettroscopia FT-ATR-MIR^[32] su campioni non estratti;
- Spettroscopia di emissione^[33] su campioni non estratti;
- Spettroscopia NMR^[34,35] su campioni estratti;

- Analisi HPLC dei componenti fenolici (acidi fenolici ed acido abscissico^[29], flavonoidi^[36]);
- Analisi HPLC degli amminoacidi^[37];
- Analisi GC-MS dei composti volatili^[30] (responsabili dell'aroma);
- Analisi GC-MS dei composti fenolici^[38].

L'impiego di sistemi statistici consiste nel selezionare gruppi di campioni omogenei dai quali uscirà un profilo standard per ogni tipologia studiata, ognuno con le proprie caratteristiche organolettiche, microscopiche e chimico-fisiche. È possibile quindi utilizzare alcune schede di caratterizzazione dei principali mieli unifloreali basate su analisi di tipo microscopiche, organolettiche e chimico-fisiche. Il controllo dell'origine botanica si basa quindi sul confronto tra i dati ottenuti sul campione da valutare ed i profili presenti: se c'è coincidenza, il miele può essere definito unifloreale. L'analisi dell'origine geografica risulta più difficoltosa a causa di piccole differenze di composizione e non tutti i metodi sopraccitati possono risultare efficaci. In genere questi nuovi metodi presentano dei limiti: si basano su un numero limitato di campioni e l'analisi è usata su una combinazione di parametri derivanti da misure indipendenti.

APPLICAZIONE DELLA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

Il campo di applicazione della risonanza magnetica nucleare è molto vasto e spazia in molti campi. Tale tecnica risulta particolarmente adatta a risolvere problematiche che richiedono un approccio multidisciplinare; questo è il caso delle matrici alimentari. Negli ultimi anni molti studi hanno affrontato il problema dell'analisi dei prodotti alimentari, concentrata soprattutto sullo studio e sulla determinazione delle componenti principali, rivolgendo un interesse particolare verso tutte quelle sostanze il cui contenuto è legato a limiti legislativi. Il grande vantaggio della tecnica NMR consiste nella capacità di analizzare matrici alimentari (come aceto balsamico, miele, formaggi, olio, caffè) anche molto complesse, sottoponendole a poche manipolazioni.

Nel caso del miele due studi NMR hanno confermato la possibilità di determinarne l'origine botanica e geografica attraverso l'analisi di spettri degli amminoacidi^[39] e degli zuccheri presenti^[40]. In altri 2 lavori più recenti sono analizzati estratti organici in DMSO^[41] ed il profilo in carboidrati^[42], ma i metodi non risultano affidabili a causa del numero limitato di campioni di miele studiati. Scopo di questo gruppo di ricerca è la messa a punto di un metodo che, analizzando lo spettro ¹H-NMR dell'estratto organico in CHCl₃, identifichi l'origine botanica e geografica dei campioni di miele.

PROGETTO DI TESI

L'analisi statistica condotta nel precedente lavoro di tesi^[43] su 97 campioni di miele dei colli Euganei di 4 origini botaniche diverse, ha evidenziato particolari segnali NMR nella zona dei protoni aromatici presenti solo nel miele di castagno. Questi segnali appartengono, probabilmente, ad una molecola che può essere considerata marker di questo tipo di miele (**Fig. 2.1**). La parte iniziale del mio lavoro di tesi ha avuto come obiettivo l'isolamento, l'individuazione e la caratterizzazione di questa molecola.

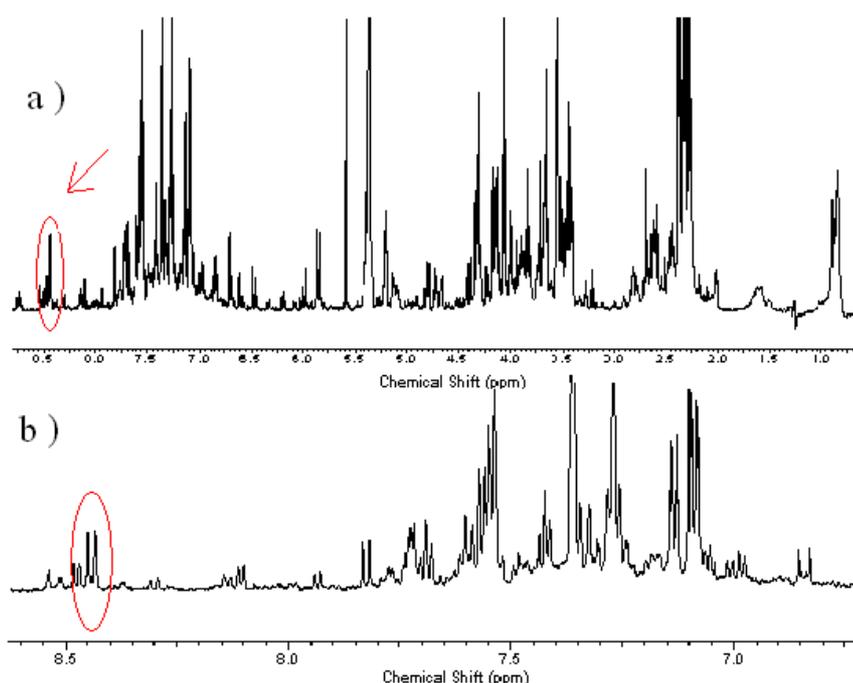


Fig. 2.1: spettro completo (a) e della zona aromatica (b) di un campione di castagno. In rosso i segnali caratteristici della molecola.

Dopo l'arrivo di 65 campioni forniti dall'industria Rigoni, il progetto di tesi è proseguito con l'analisi di questi ultimi per l'ampliamento di un database già esistente costruito al fine di ottenere un metodo che permette, tramite analisi di spettri $^1\text{H-NMR}$ e chemiometria, l'identificazione dell'origine botanica di mieli incogniti. L'obiettivo è costruire un nuovo modello di analisi multivariata su un training set di 162 campioni di 6 origini botaniche differenti (castagno, acacia, tiglio, millefiori, eucalipto ed arancio) ed ottenere la validazione utilizzando un test set costituito da 12 campioni acquistati al supermercato o direttamente dal produttore. In aggiunta si è cercato di isolare ed individuare uno dei marker del miele di eucalipto.

STRUMENTAZIONE E METODOLOGIA

RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica spettroscopica che si basa sulla misura dell'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche nella regione delle radiofrequenze (400-800 MHz) da parte di un campione immerso in un intenso campo magnetico (9.4-18.8 T). Tale tecnica è utilizzata per ottenere informazioni di tipo chimico e fisico sulle molecole presenti. Come per le altre tecniche spettroscopiche, la frazione di radiazione assorbita è legata alla concentrazione delle specie assorbenti, mentre l'energia delle transizioni dipende dalle proprietà atomiche, molecolari e dall'intensità del campo magnetico applicato.

L'NMR si basa sul principio fisico per il quale dei nuclei dotati di spin nucleare (cioè con un numero di protoni e/o di neutroni dispari), sottoposti all'azione del campo magnetico e colpiti da onde elettromagnetiche nella regione delle radiofrequenze, producono un segnale di risonanza osservabile ad una frequenza proporzionale al campo osservato (frequenza di risonanza).

La distribuzione degli elettroni attorno al nucleo e l'interazione magnetica tra i nuclei stessi creano uno spostamento del valore del campo magnetico sperimentato da ciascun nucleo. Questo fa che si abbia una variazione della frequenza di risonanza del campione; essa può fornire all'operatore una serie d'importanti informazioni quali la distribuzione degli elettroni attorno al nucleo (quindi la composizione chimica del campione) e le interazioni fra nuclei (che forniscono invece la struttura fisica e la dinamica delle molecole nel campione stesso).

NMR AD ALTA RISOLUZIONE: FONDAMENTI TEORICI

La risonanza magnetica nucleare permette di effettuare sia analisi chimiche di tipo qualitativo che quantitativo, di ottenere la risoluzione strutturale di molecole complesse, di distinguere un particolare nucleo secondo ciò che lo circonda all'interno della molecola e di ottenere importanti informazioni sulle molecole d'interesse. Questa tecnica necessita dell'utilizzo campi magnetici molto intensi (dai 4 ai 18 T), omogenei e stabili nel tempo.

I nuclei aventi momento angolare di spin \mathbf{I} diverso da zero, presentano un momento magnetico di spin $\boldsymbol{\mu} = \gamma \cdot \mathbf{I}$ non nullo a esso associato, dove γ rappresenta il rapporto giromagnetico del nucleo esaminato. Un nucleo avente numero quantico di spin \mathbf{I} possiede un momento angolare di spin di modulo:

$$|\mathbf{I}| = [\mathbf{I}(\mathbf{I} + 1)]^{1/2} \hbar \quad \text{con } \hbar = h/2\pi ; \text{ dove } h \text{ è la costante di Planck.}$$

La componente del momento angolare lungo l'asse z (scelto come riferimento), vale:

$$\bar{I}_z = m_i \cdot \hbar \quad \text{con } m_i = \mathbf{I}, \mathbf{I}-1, \dots, -\mathbf{I}; \text{ dove } m_i \text{ è il numero quantico magnetico.}$$

Sono quindi possibili $2\mathbf{I}+1$ stati di spin energeticamente equivalenti che si differenziano unicamente per il valore di m_i . In questo lavoro il nucleo esaminato è il protone (^1H), per il quale $\mathbf{I} = 1/2$, e sono quindi possibili due stati di spin degeneri α ($m_i = -1/2$) e β ($m_i = 1/2$).

L'applicazione di un campo magnetico statico \mathbf{B}_0 rimuove la degenerazione tra gli stati di spin creando una differenza di energia tra gli stessi proporzionale al campo magnetico applicato:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0$$

Lo stato α si trova ora a minore energia (spin parallelo al campo magnetico applicato) rispetto allo stato β (spin antiparallelo, **Fig. 3.1**).

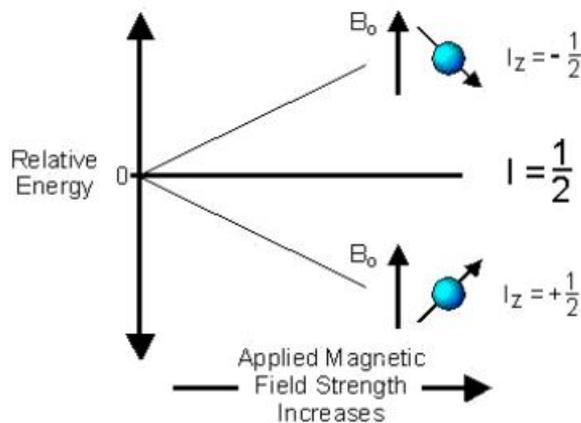


Fig. 3.1: transizione energetica in un esperimento NMR.

Per promuovere una transizione tra i due stati di spin è necessaria una radiazione con frequenza $\nu_0 = (\gamma/2\pi)B_0$; solo quando questa eguaglia la frequenza di Larmor, ovvero la frequenza di precessione dei nuclei ν_L , si raggiunge la condizione di risonanza:

$$\nu_L = \nu_o = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \text{ (equazione fondamentale per l'NMR).}$$

In condizioni di equilibrio lo stato α è termodinamicamente favorito e quindi più popolato rispetto allo stato β . La differenza di popolazione tra due stati di spin è data dalla funzione di distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{\gamma h B_0}{2\pi kT}\right) \cong 1 - \frac{\gamma h B_0}{2\pi kT}.$$

dove N_β è il numero di protoni a maggiore energia, N_α il numero di protoni a minore energia, k è la costante di Boltzmann (pari a $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), T indica la temperatura assoluta e ΔE è la differenza di energia tra i due stati.

La somma vettoriale dei singoli momenti magnetici μ_i dei nuclei produce un vettore \mathbf{M}_0 (magnetizzazione macroscopica) che, in condizioni di equilibrio, ha componente non nulla solo lungo la direzione del campo magnetico statico (M_z). Le restanti componenti, M_x e M_y , sono nulle poiché ci troviamo in una condizione di *random phase*, condizione nella quale le componenti dei singoli μ_i , lungo il piano xy , sono presenti statisticamente con uguale probabilità. Applicando un impulso a radiofrequenza, tale che la sua componente magnetica \mathbf{B}_1 sia ortogonale a \mathbf{B}_0 , si ha una deflessione del vettore magnetizzazione \mathbf{M} di un angolo θ , rispetto all'asse z , proporzionale alla durata τ_p dell'impulso stesso:

$$\theta = \gamma B_1 \tau_p$$

Si origina così una componente trasversale \mathbf{M}_{xy} del vettore magnetizzazione che, una volta rimosso \mathbf{B}_1 , inizierà a precedere attorno alla direzione di \mathbf{B}_0 alla frequenza di Larmor caratteristica del nucleo. Questo moto di precessione crea un segnale detto FID (*Free Induction Decay*), con andamento sinusoidale che decresce esponenzialmente nel tempo a causa dei processi di rilassamento che tendono a ripristinare le condizioni di equilibrio.

La frequenza di risonanza di ciascun nucleo è largamente influenzata dall'intorno chimico in cui si trova: nuclei con diversi intorni precedono a differenti frequenze in quanto risentono dell'azione di campi locali, minori di quello applicato, generati dal moto

degli elettroni degli atomi circostanti. Ogni nucleo viene quindi schermato da una nube elettronica la cui densità dipende dall'intorno nel quale è inserito. L'intensità del campo efficace è la seguente:

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma) \quad \text{dove } \sigma \text{ è la costante di schermo}$$

Modificando l'equazione $\nu_o = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$ si ottiene un valore di frequenza di risonanza effettiva:

$$\nu_{eff} = \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0(1 - \sigma)$$

Il *chemical shift* δ (in ppm) è un parametro che misura l'effetto di schermo ed è dato dallo spostamento della frequenza di risonanza di ciascun nucleo rispetto ad una frequenza di riferimento:

$$\delta = \frac{\nu_o - \nu_{rif}}{\nu_{rif}} 10^6$$

Consideriamo ora un esempio di esperimento monodimensionale.

Il periodo di preparazione consente al sistema di raggiungere l'equilibrio termico: un impulso a 90° flette la magnetizzazione \mathbf{M} sul piano xy, dove inizia la precessione che genera un segnale registrato come FID (**Fig. 3.2**). Questo segnale nel dominio del tempo viene trasformato in un segnale nel dominio delle frequenze mediante trasformata di Fourier.

La spettroscopia ad impulsi, a differenza di quella ad onda continua, permette di eccitare simultaneamente tutti i nuclei e di raccogliere contemporaneamente tutti i segnali emessi. Risulta così possibile ripetere l'esperimento numerose volte e sommare i FID risultanti, ottenendo un notevole miglioramento del rapporto segnale/rumore, direttamente proporzionale al numero di esperimenti effettuati.

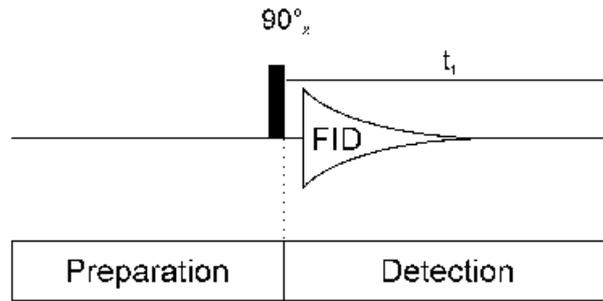


Fig. 3.2: rappresentazione schematica di un esperimento NMR monodimensionale.

FENOMENI DI RILASSAMENTO

Applicando ad un campione un impulso a radiofrequenza, gli spin nucleari vengono perturbati rispetto al loro stato di equilibrio. Il sistema tende in seguito a ritornare alla condizioni iniziali mediante un fenomeno detto rilassamento che permette di disperdere l'energia in eccesso attraverso le due componenti della magnetizzazione.

- *Magnetizzazione longitudinale lungo l'asse z (M_z)*. L'impulso sposta il vettore di magnetizzazione netta dall'asse z al piano xy. Il ritorno della magnetizzazione lungo l'asse z è detto rilassamento longitudinale: M_z torna al valore iniziale M_0 con una velocità dipendente dal tempo T_1 secondo la seguente equazione differenziale:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{(M_0 - M_z)}{T_1} \quad \text{dove } T_1 = \text{tempo di rilassamento longitudinale}$$

$$M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1})$$

Durante questo processo, noto anche come rilassamento spin-reticolo (**Fig. 3.3**), l'energia viene trasferita dal nucleo eccitato all'ambiente circostante mediante varie interazioni, ad esempio dipolo-dipolo. L'energia persa dagli spin è trasferita all'ambiente sottoforma di calore ma essendo molto piccola, la variazione di temperatura del campione è trascurabile.

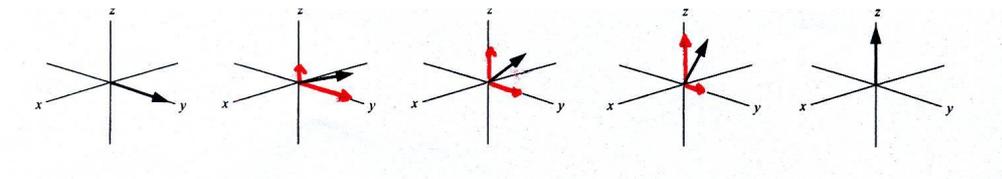


Fig. 3.3: rilassamento longitudinale.

- *Magnetizzazione trasversale sul piano xy (M_{xy})*. Non considerando il rilassamento longitudinale, ci si aspetta che il vettore magnetizzazione ruoti lungo l'asse z; ciò è teoricamente possibile solo se il campo magnetico che agisce su ciascuno spin del campione è esattamente lo stesso. Questo non accade: alcuni spin sono soggetti ad un campo magnetico locale leggermente superiore o inferiore alla media, che li fa ruotare con una frequenza maggiore o minore. I vettori momento magnetico tenderanno ad aprirsi a ventaglio, portando quindi alla totale assenza di magnetizzazione netta sul piano trasversale. Essa ritorna al valore iniziale con una velocità dipendente da T_2 , mediante un fenomeno noto come rilassamento spin-spin o trasversale (**Fig. 3.4**) espresso mediante la relazione $M_{xy} \propto e^{-t/T_2}$.

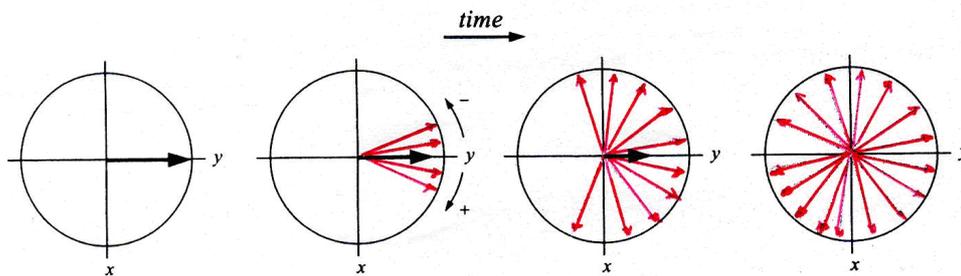


Fig. 3.4: *rilassamento trasversale.*

Il rilassamento trasversale genera un passaggio di spin dal livello β a livello α e viceversa (*flip-flop process*), a differenza di quello longitudinale che provoca la perdita di energia degli spin nucleari; il primo può essere considerato un processo entropico mentre il secondo un processo entalpico. La velocità di entrambi è strettamente correlata alla struttura della molecola esaminata.

Le differenze di campo magnetico che generano il rilassamento trasversale sono dovute a due diverse sorgenti di rilassamento: una alla disomogeneità del campo magnetico statico lungo il volume di campione (causata da un'imperfezione puramente strumentale e può essere ridotta ottimizzando la "shimmatura") e l'altra al campo magnetico locale generato dagli spin nucleari (prodotta da interazioni inter ed intramolecolari nel campione). Queste due sorgenti si combinano in un unico tempo di rilassamento effettivo T_2^* che tiene conto di tutti quei fattori che contribuiscono alla perdita del segnale trasversale:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2(\Delta B_0)} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2}$$

dove T_2 indica il contributo intrinseco nella molecola e $T_2(\Delta B_0)$ il contributo derivante dalla disomogeneità di campo. L'effetto più evidente del rilassamento trasversale è dato dall'allargamento dell'ampiezza dei picchi di risonanza: un rilassamento rapido degli spin (T_2 piccolo), produce un decadimento veloce del FID e picchi di risonanza allargati; uno lento (T_2 grande), produce un decadimento lento del FID e picchi stretti. Infatti, la larghezza di riga spettrale a metà altezza ($\Delta\nu_{1/2}$) è legata a T_2^* dalla seguente relazione:

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2^*}$$

Non risulterà mai che $T_2 > T_1$, dato che al recupero della magnetizzazione longitudinale corrisponde l'annullamento della magnetizzazione trasversale: se la magnetizzazione è ritornata completamente lungo l'asse z, la magnetizzazione netta lungo il piano xy sarà nulla.

Il vantaggio della spettroscopia NMR consiste nell'elevato tempo di vita degli spin nucleari eccitati (da pochi secondi ad alcuni minuti) rispetto a quello degli stati elettronici nella spettroscopia elettronica (alcuni picosecondi).

ACQUISIZIONE DEI DATI

Nell'ideare e nell'impostare un esperimento è necessario prendere in considerazione diversi parametri che dipendono non solo dal tipo di campione e da ciò che si vuole dimostrare, ma anche da fattori come il tempo richiesto dall'esperimento. A livello industriale il fattore tempo è un parametro di notevole importanza e va quindi ottimizzato, sempre che ciò non precluda la buona riuscita dell'esperimento. L'operatore dovrà quindi occuparsi dell'ottimizzazione di una serie di parametri come il tempo di attesa, d_1 (*relaxation delay*), la durata dell'impulso, pw (*pulse width*) in μs , l'angolo d'inclinazione dell'impulso, α ed il tempo di acquisizione, aq (**Fig. 3.5**).

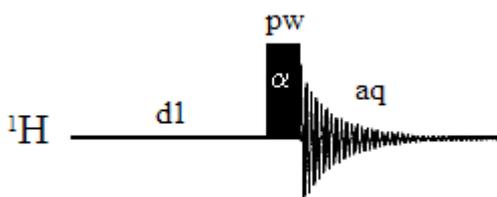


Fig. 3.5: parametri principali da ottimizzare nella progettazione di un esperimento 1H -NMR.

Tempo di acquisizione (aq)

Il tempo totale di campionamento, detto anche tempo di acquisizione aq , è definito dalla velocità di digitalizzazione del segnale, che dipende a sua volta dall'ampiezza spettrale (SW), che è correlato al tempo di attesa tra un punto e il successivo (DW) e dal numero totale di punti campionati (TD):

$$aq = DW \cdot TD = \frac{TD}{2SW}$$

Tempo di attesa (d_1)

Rappresenta il tempo, in secondi, che è necessario attendere tra due impulsi successivi affinché il sistema di spin possa riportarsi allo stato di equilibrio; per raggiungerlo è necessario utilizzare elevati valori di d_1 , che si riflettono quindi sulla durata complessiva dell'esperimento. La lunghezza del d_1 è governata dalle proprietà di rilassamento dei nuclei del campione, ciascuno dei quali contribuisce con il proprio tempo di rilassamento longitudinale, T_1 . È necessaria una conoscenza approfondita dei tempi di rilassamento delle sostanze d'interesse che possono essere valutati con esperimenti di *inversion-recovery* o semplicemente stimati a partire dai valori di T_1 di molecole strutturalmente simili. Se il tempo di ripetizione utilizzato è eccessivamente corto rispetto al T_1 richiesto, si ha una diminuzione del rapporto segnale-rumore finché, nel caso estremo, la magnetizzazione tra due impulsi successivi non ha il tempo sufficiente per poter rilassare e quindi non si riesce a registrare il segnale (*saturazione del segnale*) a causa della perdita completa della risonanza. Se si è interessati nell'osservare un dato segnale, la saturazione deve essere necessariamente evitata; viceversa, essa può essere appositamente utilizzata qualora si voglia, ad esempio, eliminare un segnale molto intenso, come quello del solvente^[45].

Durata ed Inclinazione dell'impulso (pw, α).

I due parametri pw (*pulse width*, indica la durata dell'impulso) e α (*tip angle*, indica l'angolo di inclinazione) sono strettamente correlati al tempo di rilassamento, T_1 , dei nuclei presenti nel campione. Alcune molecole possiedono però tempi di rilassamento longitudinali molto elevati, e in questi casi un intervallo di ripetizione corretto ($5T_1$) può comportare tempi di acquisizione eccessivi per effettuare i classici esperimenti di laboratorio.

Indipendentemente dall'angolo di inclinazione, un impulso corto, ma di elevata potenza, è in grado di eccitare un'ampia finestra di frequenze (impulso *hard*), mentre un impulso lungo e meno potente è efficace in una regione più ristretta (impulso *soft*). È possibile ridurre l'angolo di inclinazione dell'impulso, di conseguenza i tempi di attesa per il ritorno all'equilibrio, basandosi sull'*equazione di Ernst*:

$$\cos \alpha_E = e^{-t_r/T_1}$$

purché tra le scansioni trascorra un tempo tale da garantire il completo decadimento della magnetizzazione trasversale, una volta scelto il tempo di ripetizione $t_r = d_1 + aq$.

Nei casi in cui i tempi di acquisizione eccessivamente lunghi costituiscano un problema, è necessario arrivare ad una situazione di compromesso tra sensibilità e quantità.

SEQUENZE PER L'OTTENIMENTO DEGLI SPETTRI MONODIMENSIONALI

Di ciascun campione è stato acquisito uno spettro monodimensionale utilizzando una modifica della sequenza DPFGE (*Double Pulsed Field Gradient Spin-Echoes*) ovvero di una tecnica di eccitazione selettiva che combina impulsi selettivi con impulsi a gradiente, al fine di produrre sequenze di eccitazione sperimentali caratterizzate da un gran numero di proprietà diverse. L'elemento base di questa sequenza può essere schematizzato con il blocco $[G-S-G]$, dove G rappresenta un impulso a gradiente, mentre S è un elemento generico (solitamente un impulso di inversione di 180°) che può assumere qualsiasi angolo di rotazione nel piano cartesiano.

Nella specifica sequenza utilizzata in questo lavoro il blocco $[G-S-G]$ è stato modificato con il blocco $[G-\pi-S-G]$ (**Fig. 3.6**).

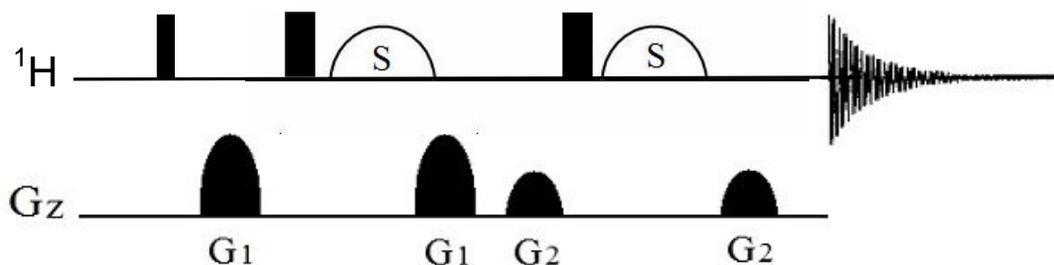


Fig. 3.6: schema della sequenza utilizzata.

In questa sequenza, i gradienti che precedono e seguono gli impulsi d'inversione (il primo *hard* che agisce su tutto lo spettro, il secondo selettivo che inverte solo la zona da sopprimere) sono uguali e agiscono rifocalizzando la magnetizzazione che ha risentito solo del primo impulso a 180° , secondo il principio del *gradient-echo*. Gli spin che sono sottoposti ad entrambi gli impulsi di inversione, in altre parole quelli che risuonano nella zona selezionata dall'elemento *S*, risentono dell'effetto cumulativo dei due gradienti e rimangono non fasati nel piano trasversale, non sono quindi osservati. Il profilo di fase delle risonanze selezionate è dettato dalle proprietà dell'impulso selettivo *S*, che potrebbero però discostarsi leggermente dall'idealità. Ripetendo nuovamente il blocco $[G - \pi - S - G]$ (questa volta però utilizzando un gradiente di potenza G_2 , che evita la rifocalizzazione accidentale della magnetizzazione corrispondente a risonanze indesiderate), eventuali errori di fase vengono eliminati e quindi il profilo di eccitazione che ne risulta dipende esclusivamente dalle proprietà dell'impulso selettivo.

Uno dei possibili utilizzi della sequenza DPFGE e di quella qui presentata è dato dalla capacità delle stesse di eccitare una data zona dello spettro, permettendo così di eliminare tutte le risonanze che non interessano. Se i segnali in questione sono anche i più intensi, la loro eliminazione permette di liberare la memoria dell'ADC con conseguente aumento del *range dinamico*; ciò permette di aumentare il *receiver gain* e, di conseguenza, la sensibilità di analisi, permettendo così di osservare segnali di intensità troppo bassa per essere visti normalmente^[52].

NMR BIDIMENSIONALE

Uno spettro bidimensionale contiene segnali che sono funzione di due frequenze ed è rappresentato quindi da un grafico a due dimensioni: ω_1 in ordinata e ω_2 in ascissa. Un esperimento di questo tipo richiede due trasformate di Fourier, ortogonali tra loro e su due assi dei tempi indipendenti: t_1 e t_2 .

In un esperimento 2D si possono distinguere quattro fasi: la preparazione, l'evoluzione, il mescolamento e l'acquisizione (**Fig. 3.7**).

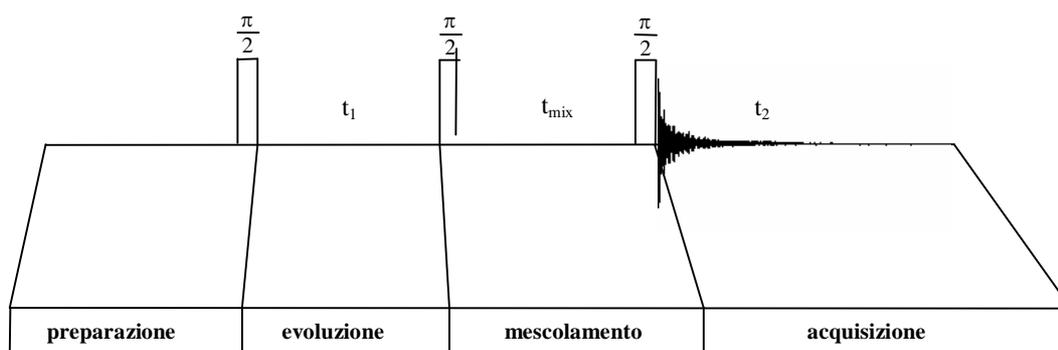


Fig. 3.7: schema generale per l'acquisizione di uno spettro 2D NMR.

Dopo il periodo di preparazione i nuclei raggiungono l'equilibrio termico e in seguito il sistema viene perturbato mediante un impulso di radiofrequenza a $\pi/2$ che deflette la magnetizzazione sul piano xy . Durante il periodo di evoluzione (t_1) la magnetizzazione può evolvere sotto l'influsso di vari fattori, come l'accoppiamento spin-spin e la precessione. Nella fase di mescolamento, il tempo τ_m , costituito da una serie di impulsi e intervalli di tempo, causa trasferimenti di magnetizzazione tra gli spin e il segnale risultante viene registrato come FID durante il tempo t_2 . Ripetendo n volte l'esperimento, variando sistematicamente il tempo t_1 , si ottengono n FID, ognuno dei quali fornisce uno spettro nel quale l'intensità e/o la fase dei picchi dipende dal tempo t_1 . La trasformata di Fourier viene prima applicata ai FID acquisiti durante t_2 , generando la matrice $S(t_1; \omega_2)$ e in seguito lungo l'asse dei tempi t_1 permettendo così di ottenere lo spettro 2D. Solo t_2 è l'asse reale dei tempi perché in questo periodo viene acquisito un vero FID; quello che si ottiene lungo l'asse dei tempi t_1 è un interferogramma costruito prendendo un punto da ciascuno spettro monodimensionale della matrice $S(t_1, \omega_2)$.

Per ottenere utili informazioni da uno spettro 2D è necessario che i nuclei evolvano con una certa frequenza durante il tempo t_1 e con frequenza diversa durante t_2 . Gli spettri bidimensionali utilizzati in questo lavoro e di seguito descritti sono di due tipi:

- *Omonucleari*: se i due assi del grafico rappresentanti i valori delle frequenze si riferiscono ad uno stesso nucleo generando così, oltre ai picchi di correlazione, dei picchi diagonali che rappresentano la correlazione di un picco con se stesso. Spettri omonucleari utilizzati in questa tesi sono: TOCSY, COSY, NOESY.
- *Eteronucleari*: se i due assi si riferiscono a due nuclei diversi (HMQC, HMBC).

COSY ^1H - ^1H (Correlation Spectroscopy)

L'esperimento COSY, basato sull'accoppiamento scalare spin-spin, è costituito da due impulsi a $\pi/2$ separati dal periodo di evoluzione t_1 , sistematicamente incrementato, e dal periodo di acquisizione t_2 (**Fig. 3.8**). Durante il tempo di mescolamento la magnetizzazione originariamente associata ad uno spin viene trasferita agli spin con cui quest'ultimo è accoppiato scalarmene (trasferimento di coerenza).

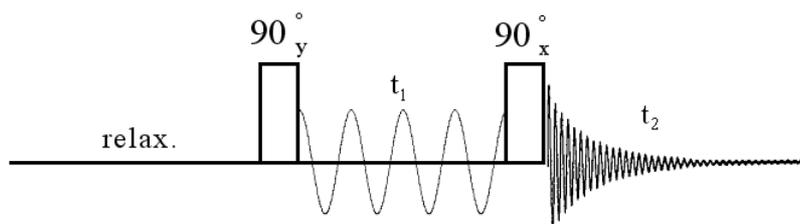


Fig. 3.8: schema generale per l'acquisizione di uno spettro COSY.

Questo esperimento permette quindi di vedere le correlazioni esistenti tra protoni legati a carboni adiacenti; sperimentalmente si osservano cross picchi tra atomi separati da non più di tre legami (3J). Tale esperimento può quindi essere considerato come lo sviluppo in due dimensioni di un esperimento monodimensionale di disaccoppiamento selettivo.

Per spiegare tale esperimento, consideriamo per esempio due spin A e X, accoppiati con una costante di accoppiamento $^1J_{A-X}$ ed aventi chemical shift ν_A e ν_X . Dopo il primo impulso a 90° lungo l'asse x la magnetizzazione associata allo spin A, $M(A)$, viene trasferita nel piano trasversale lungo y dove precessa con frequenza ν_A , attorno all'asse z durante t_1 . Durante questo tempo una parte della magnetizzazione rilassa, ed oltre alle due componenti trasversali, si forma una componente di M lungo z. Il secondo impulso a 90° lungo x trasferisce parte della magnetizzazione di A allo spin accoppiato X, mentre la rimanente resta associata ad A e precessa durante il periodo di acquisizione (t_2) con la frequenza ν_A come durante t_1 ; questo porta alla formazione di un picco diagonale. Al contrario la magnetizzazione trasferita precessa durante t_2 con la frequenza tipica dello spin X e questo produce un cross picco.

TOCSY ^1H - ^1H (Total Correlation Spectroscopy)

Nell'esperimento TOCSY è possibile vedere la correlazione tra nuclei che fanno parte dello stesso sistema di spin, propagando il trasferimento della magnetizzazione al di là degli spin direttamente accoppiati. Per fare ciò ci si serve di una *mixing sequence*

costituita da una sequenza δ - 180° - δ (**Fig. 3.9**), nota come *spin lock*, mediante la quale la magnetizzazione rimane bloccata sull'asse y (*spin locked*).

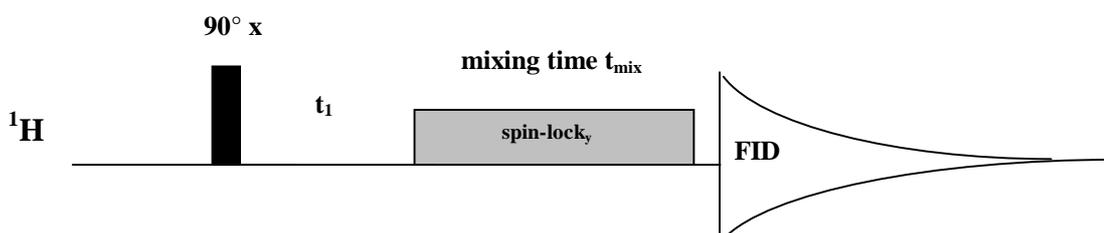


Fig. 3.9: schema generale per l'acquisizione di uno spettro TOCSY.

Durante questo periodo (tempo di mescolamento, τ_m) non vi è alcuna evoluzione di chemical shift, tutti gli spin sperimentano lo stesso campo magnetico efficace e questo consente alla magnetizzazione di propagarsi da uno spin al suo vicino e così via. Più lungo è il tempo di mescolamento, maggiore è la propagazione della magnetizzazione e ciò consente trasferimenti tra nuclei più distanti.

La sequenza più frequentemente usata è la MLEV-16 alla quale viene aggiunto un impulso di rifocalizzazione di 180° lungo y (MLEV-17) per eliminare l'errore di fase eventualmente accumulato durante la sequenza:

MLEV-16 **ABBA BBAA BAAB AABB**

dove $A = 90^\circ_x 180^\circ_y 90^\circ_x$

$B = 90^\circ_{-x} 180^\circ_y 90^\circ_{-x}$

MLEV-17 **(MLEV-16) – 180°_y – (MLEV-16) – 180°_y**

La sequenza viene ripetuta più volte in maniera tale da coprire il *mixing time* voluto.

NOESY ^1H - ^1H (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Il NOESY è un esperimento che prende in considerazione le interazioni dipolari tra i singoli momenti magnetici nucleari, che si trasmettono nello spazio (al contrario di quelle scalari che avvengono attraverso gli elettroni di legame). Irraggiando selettivamente e intensamente il sistema alla frequenza di risonanza propria di un determinato protone, si osservano variazioni nell'intensità dei segnali corrispondenti a nuclei vicini a quello perturbato, cioè a nuclei ad esso accoppiati dipolarmente. Su tale principio si basa il NOE (*Nuclear Overhauser Effect*).

Il primo impulso di 90° trasferisce la magnetizzazione nel piano trasversale dove, durante il t_1 , evolve per effetto del chemical shift e dell'accoppiamento scalare (**Fig. 3.10**). Il secondo impulso riporta parte della magnetizzazione lungo z, dove durante il τ_m rilassa attraverso fenomeni di interazione dipolare. Infine il terzo impulso riporta la magnetizzazione, che ha subito mescolamenti tra i nuclei accoppiati dipolarmente, nel piano xy permettendo così di rilevarla durante il t_2 . Le componenti di \mathbf{M} derivanti da accoppiamenti scalari vengono eliminate con opportuni cicli di fase.

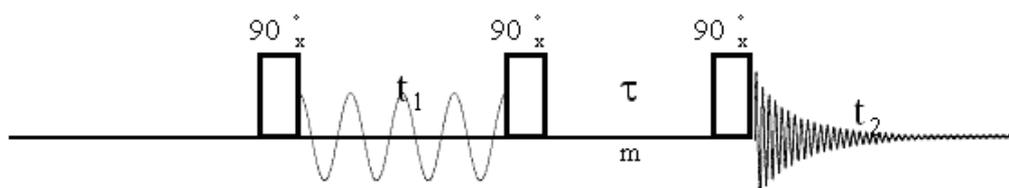


Fig. 3.10: schema generale per l'acquisizione di uno spettro NOESY.

Le distanze interprotoniche possono essere determinate dall'entità dell'effetto NOE e quindi dal volume dei cross picchi presenti nello spettro, secondo la seguente relazione:

$$\eta_l(S) = \frac{W_2 - W_0}{2W_1 + W_0 + W_2} \cdot \frac{\gamma_s}{\gamma_l}$$

L'effetto NOE è rilevabile solamente per protoni che distano tra loro al massimo 5 \AA , poiché è inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza interprotonica; dipende inoltre dal tempo di correlazione che caratterizza la rapidità dei moti molecolari. A seconda che prevalgano W_2 o W_0 , si avranno NOE positivi o negativi: se consideriamo molecole piccole in soluzioni poco viscosi, $\omega_0\tau_c \ll 1$ e l'effetto NOE risulta positivo (condizioni di *extreme narrowing*); al contrario, macromolecole in soluzioni viscosi aventi $\omega_0\tau_c \gg 1$ (in condizioni di *slow motion*) mostreranno η negativi. Se invece $\omega_0\tau_c$ vale circa uno le transizioni doppio quantiche avvengono con la stessa probabilità delle zero quantiche, $W_2 \approx W_0$, perciò l'effetto NOE si annulla.

Nell'effettuare un esperimento NOESY, è necessario scegliere accuratamente il *mixing time*, poiché il suo valore deve essere sufficientemente grande da consentire il mescolamento della magnetizzazione tra spin accoppiati, ma allo stesso tempo non troppo elevato in modo tale da evitare trasferimenti successivi di magnetizzazione tra protoni non accoppiati dipolarmente (*spin diffusion*)^[46]. Questo fenomeno genererebbe nello spettro dei picchi fittizi che potrebbero essere ricondotti a correlazioni non esistenti e inoltre

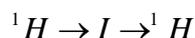
provocherebbero la riduzione di segnali corrispondenti a nuclei accoppiati, rendendo inutilizzabile il loro impiego per la determinazione delle distanze interprotoniche.

ESPERIMENTI ETEROCORRELATI ^1H - ^{13}C

Le sequenze di impulsi per gli esperimenti eteronucleari consentono di correlare la magnetizzazione del protone a quella di un eteronucleo ad esso scalarmente accoppiato, in questo caso il ^{13}C . Il problema principale per questo tipo di esperimento è la scarsa abbondanza naturale del nucleo NMR attivo (^{13}C). La sensibilità di un esperimento eteronucleare dipende dai rapporti giromagnetici dei nuclei eccitati ed osservati (γ_{ecc} e γ_{oss}):

$$S/N \propto \gamma_{\text{ecc}} (\gamma_{\text{oss}})^{3/2}$$

quindi, per avere una maggiore sensibilità, è necessario utilizzare il nucleo con più alto γ sia per l'eccitazione sia per l'osservazione (^1H). A questo scopo si utilizzano sequenze, dette di osservazione inversa, che prevedono il doppio trasferimento di magnetizzazione:



e portano ad un aumento di sensibilità pari a $(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{I}})^{5/2}$ rispetto all'osservazione diretta, cioè 31.6 nel caso in cui I sia il ^{13}C . La difficoltà di questi esperimenti sta nel disaccoppiare l'eteronucleo ed è legata soprattutto all'ampio intervallo di frequenze da irradiare e all'impossibilità di impiegare potenze troppo elevate che surriscalderebbero il campione. I metodi migliori per il disaccoppiamento eteronucleare impiegano sequenze d'impulsi composti con l'effetto globale di un impulso di 180° , che sono ripetute per tutta la durata dell'acquisizione. Gli spettri bidimensionali che si ottengono da esperimenti eterocorrelati di questo tipo hanno la finestra spettrale del protone in ω_2 (ascissa) e quella del carbonio in ω_1 (ordinata). Questa tecnica presenta, però dei limiti come la ridotta risoluzione digitale in ω_1 a causa della più ampia finestra spettrale rispetto a quella protonica (i segnali del ^{13}C sono dispersi su un intervallo di circa 200 ppm), e il numero contenuto di esperimenti che si raccolgono per avere lo spettro in tempi ragionevoli.

Uno degli esperimenti bidimensionali eteronucleari utilizzati è l'HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*), che permette di evidenziare le correlazioni tra ^1H e ^{13}C direttamente legati. La sequenza base è descritta in (Fig. 3.11).

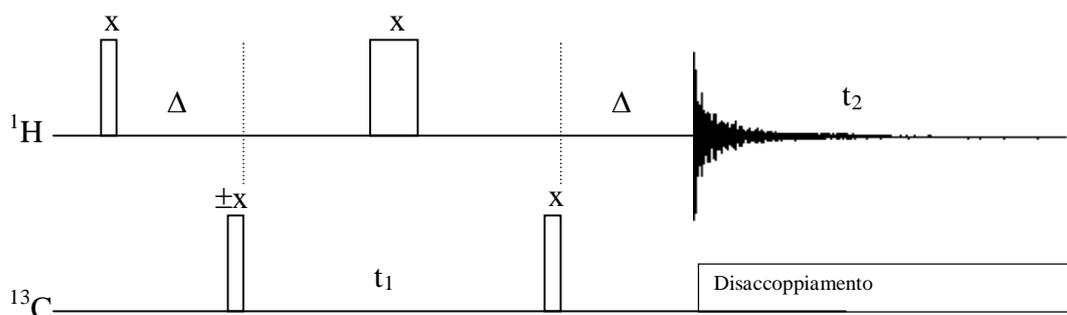


Fig. 3.11: sequenza d'impulsi base per un esperimento HMQC.

Mentre un esperimento che permette di vedere la correlazioni long range ${}^2J_{CH}$ e ${}^3J_{CH}$ è l'HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*), con rilevazione sul canale del protone. Il tempo delay Δ ($1/2J$) può essere ottimizzato a seconda della J che si desidera trovare. Nello spettro HMBC non si osservano le costanti dirette.

CHEMIOMETRIA

Ora è dedicato un paragrafo ad una sintesi delle trattazioni statistiche utilizzate nell'elaborazione dei dati ottenuti attraverso i vari metodi di analisi (§1.2.5).

La chemiometria è la scienza che permette di mettere in relazione, attraverso metodi matematici e statistici, misure fatte su un dato sistema o processo con lo stato dello stesso (*International Chemometrics Society*). Inizialmente utilizzata in campo chimico, per separare i dati utili dal resto (rumore, informazioni ridondanti, informazione non correlata al problema da risolvere), oggi, data l'estrema versatilità, trova largo impiego anche in altri settori di differente natura.

Generalmente i sistemi reali sono governati da più variabili simultaneamente; la chemiometria consente un approccio di tipo multivariato al processo da analizzare. Esso tiene conto di tutti i fattori in gioco e consente, così, d'utilizzare al meglio tutte le informazioni contenute nei dati raccolti. Questo approccio non viene applicato nella maggior parte delle procedure statistiche ed analitiche classiche, le quali tendono a trasformare in univariati tutti i problemi.

La **Fig. 3.12** illustra un insieme multivariato: la tabella dei dati è rappresentata da una matrice di n righe che rappresentano gli oggetti (campioni, esperimenti etc.) e di $p + r$ colonne che rappresentano le variabili (descrittori, caratteri etc.) con cui ciascun oggetto viene descritto.

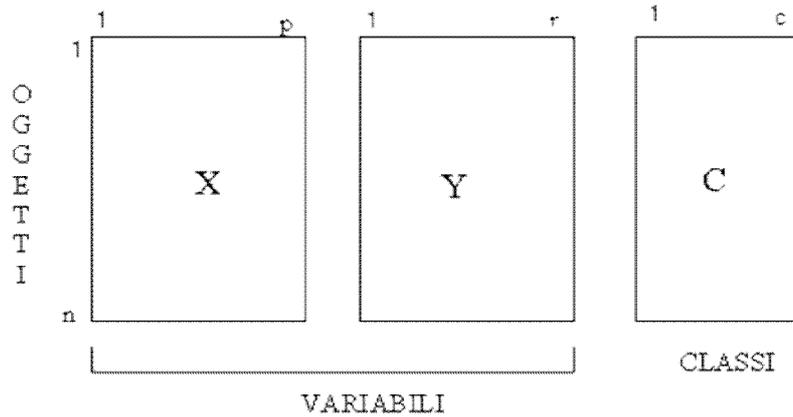


Fig. 3.12: rappresentazione di un insieme di dati multivariato.

Le variabili possono essere distinte in variabili indipendenti (matrice X) e variabili dipendenti (matrice Y). Agli oggetti, inoltre, può essere associato un vettore che contiene l'informazione di appartenenza di ciascun oggetto ad una delle classi predefinite (matrice C). I metodi chemiometrici possono essere impiegati per evidenziare le relazioni tra le variabili considerate e l'importanza relativa di ciascuna di esse nell'ambito del problema studiato (qualora le variabili siano numerose). Essi inoltre permettono di correlare i campioni in base alla loro distribuzione nello spazio multi-dimensionale descritto dall'insieme delle variabili. La chemiometria oggi raccoglie al suo interno i metodi di classificazione, di modellamento e di regressione multivariata, l'analisi di similarità, l'analisi delle componenti principali e i diversi metodi ad essa collegati, i sistemi esperti e i metodi di intelligenza artificiale, i metodi di disegno sperimentale e di ottimizzazione.

Nell'analisi multivariata è importante che le variabili siano il più possibile confrontabili; le variabili che mostrano una grande varianza, in genere, risultano decisive nel determinare le principali sorgenti di informazione nell'analisi delle componenti principali. L'analisi dei dati e la loro interpretazione saranno quindi condizionate da poche variabili che mascherano eventuali contributi di altre variabili solo in virtù del loro intrinseco significato, della loro alta varianza o della loro scala di misura. Nei casi in cui queste presentino dei comportamenti indesiderati (come quelli di non normalità, non additività, non linearità rispetto ad altre variabili) è necessario applicare delle trasformazioni matematiche (radice quadrata, log. etc) per cercare di bilanciare così i dati. Inoltre, in molti casi, è necessario pretrattare i dati originali in modo da ottenere da questi solo informazioni utili, eliminando quelle inutilizzabili, in modo da rendere le variabili il più possibile confrontabili. In genere, le variabili che mostrano una grande varianza risultano decisive nel determinare le principali sorgenti di informazione nell'analisi delle

componenti principali. L'analisi dei dati e la loro interpretazione saranno quindi condizionate da poche variabili che mascherano eventuali contributi di altre variabili solo in virtù del loro intrinseco significato, della loro alta varianza o della loro scala di misura. Se si vogliono utilizzare i dati così come si presentano, non è necessario applicare nessuna scalatura; in caso contrario esistono diversi tipi di scalatura utilizzabili:

- *centratura (CTR)*: è una scalatura che non modifica la varianza dei dati e viene effettuata centrando i dati rispetto al valor medio di ciascuna variabile;
- *varianza unitaria (UV)*: per ottenerla è necessario moltiplicare le variabili per l'inverso della loro deviazione standard ($1/s_k$);
- *pareto*: rappresenta un metodo intermedio tra non scalatura e UV; determina per le variabili una varianza pari alla deviazione standard anziché una varianza unitaria.

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA)

La PCA (*principal components analysis*) è un metodo di analisi multivariata delle componenti principali che si utilizza per ridurre le dimensioni di un *dataset*, nel caso le variabili siano numerose, mantenendo il più possibile la variabilità presente in questo. In tal modo è possibile identificare dei *patterns* nei dati ed evidenziare eventuali similarità e differenze tra questi; una volta trovati è possibile ridurre il numero di dimensioni, senza perdere troppa informazione. La riduzione si ottiene trasformando le p variabili X_1, X_2, \dots, X_p in un nuovo set di variabili, chiamato componenti principali (PC_s), che contiene le nuove variabili PC_1, PC_2, \dots, PC_p , non correlate tra loro. Le PC_s sono ordinate in modo tale che la varianza risulti maggiore in PC_1 e via via minore nelle PC seguenti. In altre parole, $\text{Var}(PC_1) \geq \text{Var}(PC_2) \geq \text{Var}(PC_3) \geq \dots \geq \text{Var}(PC_p)$ dove $\text{Var}(PC_i)$ esprime la varianza della variabile PC_i nel database considerato, $\text{Var}(PC_i)$ è anche chiamato autovalore di PC_i . In **Fig. 3.13** è rappresentato un esempio a due sole variabili.

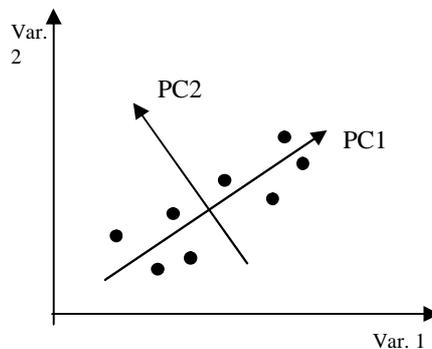


Fig. 3.13: determinazione delle componenti principali.

In questo esempio abbiamo considerato due sole variabili che vengono descritte da due componenti: ogni componente è una combinazione lineare delle due variabili originali. La procedura matematica per la determinazione delle componenti principali consiste nel calcolo di autovalori e autovettori della matrice covarianza (o di correlazione) dei dati X . La matrice dei dati X può essere rappresentata in uno spazio ortogonale, utilizzando una matrice di rotazione (detta matrice dei *loadings*) e la matrice degli *scores*. Un aspetto di grande rilevanza nello studio di problemi multivariati è la possibilità di rappresentare graficamente sia i *loadings* sia gli *scores* mediante l'impiego di grafici bidimensionali.

PARTIAL LEAST SQUARE PROJECTION TO LATENT STRUCTURES (PLS)

La PLS è un metodo di relazione tra le matrici X e Y che rende possibile l'analisi di dati contenenti informazione inutile o incompleta. È un modello di proiezione che può approssimare ogni matrice di dati a patto che ci sia un certo grado di similarità tra gli oggetti: maggiore è questa similarità e maggiore sarà il numero delle componenti del modello e la precisione dello stesso. Il modello viene creato da un *training set* di N osservazioni (oggetti, composti, etc) costituito da p variabili (X) e da r variabili (Y) (**Fig. 3.14**). Sulla base del modello creato per la matrice X , si fanno predizioni sulla matrice Y . Il modello PLS creato viene giudicato "affidabile" nel caso superi una serie di test e solo allora potrà essere utilizzato per le predizioni.

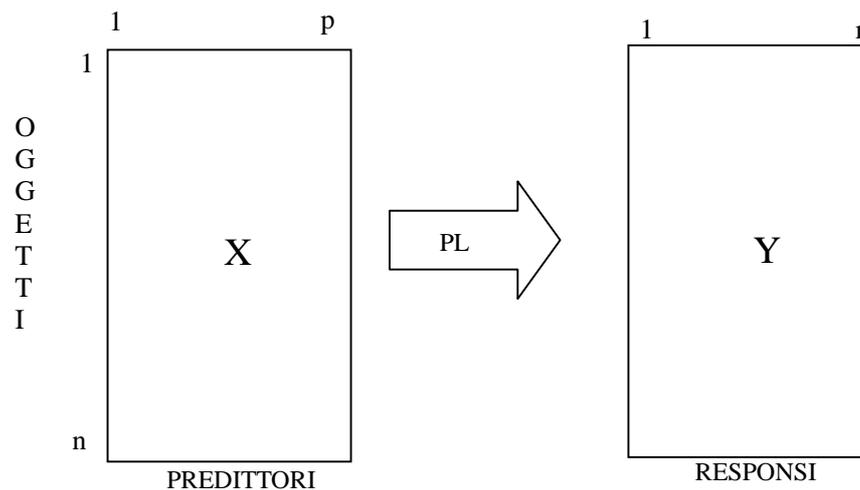


Fig. 3.14: rappresentazione del modello utilizzato per l'analisi PLS.

Uno sviluppo della PLS è la PLS-DA (*Discriminant Analysis*) il cui obiettivo è quello di separare classi di oggetti sulla base della loro matrice delle variabili X .

ANALISI DELLO SCORE PLOT

Il diagramma di distribuzione ottenuto determinando gli assi t_1 , t_2 e l'ellisse di tolleranza su questi costruita, è una finestra nello spazio k -dimensionale che mostra come le osservabili si ripartiscano le une rispetto le altre; lo *score plot* può essere visto come una mappatura delle osservabili.

Nel nuovo sistema di riferimento, costituito dalle componenti principali, gli *score* rappresentano le coordinate dei campioni e possono essere rappresentati graficamente mediante lo *score plot* (**Fig. 3.15, 3.16**). Quest'ultimo è un diagramma che riporta le coordinate nello spazio definito dalle due o tre componenti principali scelte e consente di verificare il comportamento dei campioni rispetto a queste (ad esempio per identificare eventuali raggruppamenti, la presenza di dati anomali o di distribuzioni particolari). Le coordinate di ogni soggetto sono date dalla coppia di *score* relative alle componenti principali. Vengono originati dei *cluster* che raggruppano le osservabili più simili tra loro e degli *outliers* che separano quelle dissimili.

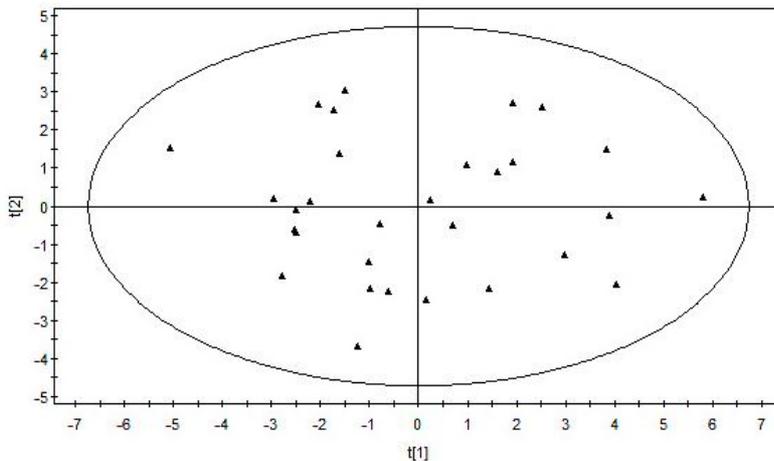


Fig. 3.15: rappresentazione bidimensionale dello score plot.

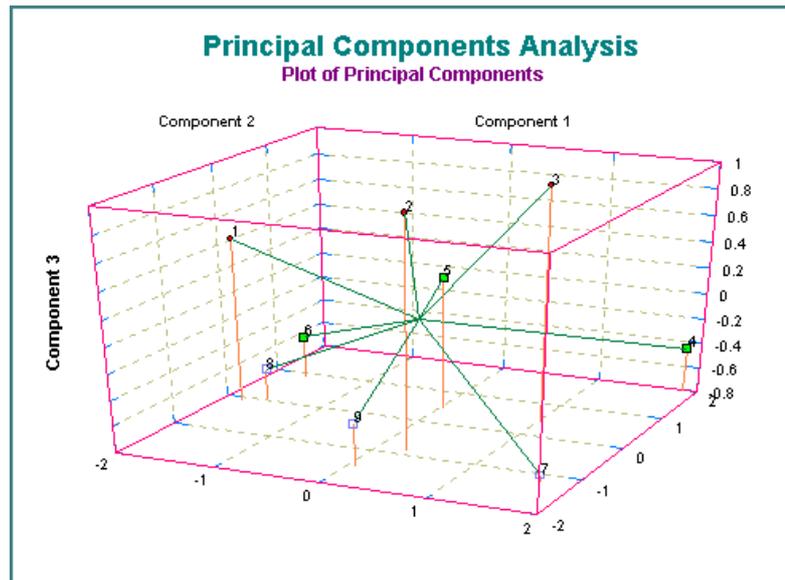


Fig. 3.16: rappresentazione tridimensionale dello score plot.

È possibile creare un secondo grafico, *loading plot* (**Fig. 3.17**), che analizza il ruolo di ciascuna variabile nelle diverse componenti e permette di osservare la distribuzione dei pesi delle variabili. Questo grafico permette di valutare l'importanza di ogni variabile originale nelle nuove componenti principali e le relazioni di dipendenza diretta ed inversa tra le variabili originali. Gli assi cartesiani sono costituiti dalle prime due componenti principali e i punti rappresentano le variabili originali individuate dalla coppia di *loading* che ciascuna variabile ha nelle due componenti considerate. Le variabili che si trovano vicino all'origine degli assi non sono significative per la determinazione delle due PC considerate. Le variabili che assumono valori elevati (sia positivi sia negativi) sull'asse PC_1 contribuiscono in modo preponderante alla definizione della prima componente principale, mentre quelle che assumono valori elevati su PC_2 definiscono maggiormente la seconda componente principale (per eventuali altre componenti principali considerate è possibile fare un ragionamento analogo).

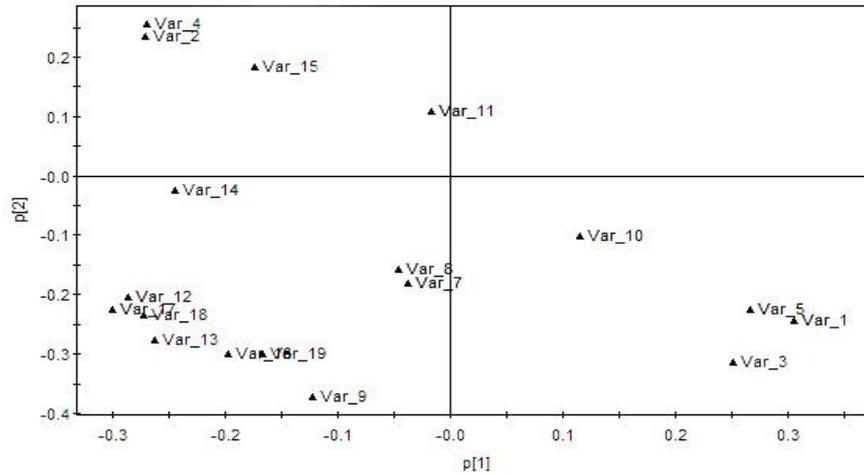


Fig. 3.17: rappresentazione del loading plot ottenuto con il programma SIMCA-P11.

Score e loading plot sono quindi due rappresentazioni complementari. Il grafico in Fig. 3.17 mostra come le variabili siano correlate tra loro, quali forniscano informazioni simili e quali non vengano ben rappresentate dal modello.

La distribuzione delle variabili si basa sulla determinazione di due parametri: R^2 , che è la misura quantitativa dell'efficienza del *fitting* applicato ai nostri dati, e Q^2 , che è l'indice della capacità predittiva del modello:

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{SSX_{tot.corr.}} \quad Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SSX_{tot.corr.}}$$

dove RSS è il residuo della somma dei quadrati, PRESS residuo predittibile della somma dei quadrati e $SSX_{tot.corr.}$ è la variazione totale nella matrice X dopo la centratura. Graficamente è possibile rappresentare questa espressione della variazione delle variabili utilizzando nel programma SIMCA-P11 uno *X/Y overview plot* (Fig. 3.18).

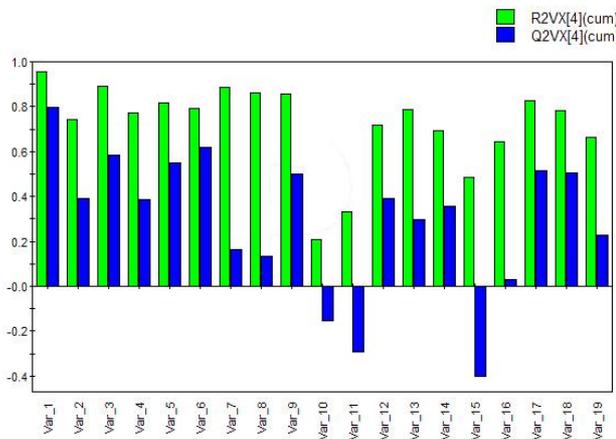


Fig. 3.18: overview plot per R^2 e Q^2 ottenuto con programma SIMCA-P11

Il valore di R^2 può essere compreso tra 0 e 1 (1 indica un *fitting* perfetto del modello mentre lo 0 un fitting nullo). Il valore di Q^2 , invece, è considerato buono, quando è maggiore di 0.5, eccellente quando supera lo 0.9. Infine è importante ricordare che la differenza tra R^2 e Q^2 non deve essere troppo grande, preferibilmente deve compresa tra 0.2 e 0.3. Quando nel *loading plot* le variabili si posizionano rispetto $p[1]$ e $p[2]$ nell'intorno dello zero, significa che tali variabili non sono determinanti per la costruzione delle componenti principali, infatti, avremo valori molto bassi di R^2 e Q^2 . Al contrario sono significative quelle che, avendo R^2 e Q^2 elevati, si distribuiscono lontane dal centro del diagramma. Se pensiamo di tracciare una retta attraverso l'origine della **Fig. 3.17**, possiamo osservare come le variabili vicine tra loro siano correlate positivamente mentre quelle opposte, collegate dalla linea, lo sono negativamente (**Fig. 3.19**).

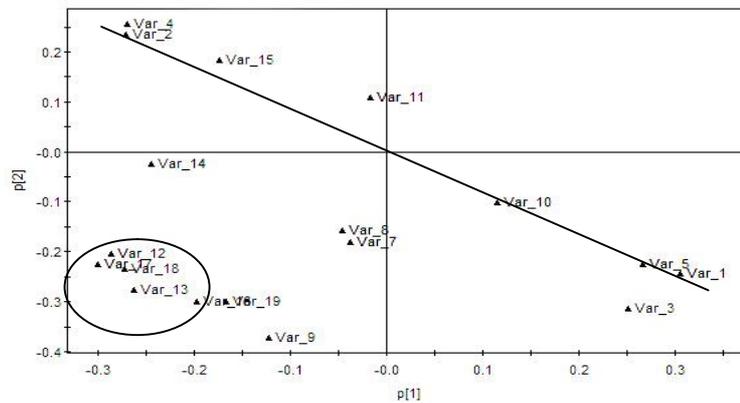


Fig. 3.19: correlazione tra le variabili in un loading plot.

Consideriamo un'osservabile posizionata nel primo quadrante dello *score plot*: questa sarà caratterizzata da un alto contenuto nelle variabili distribuite nella corrispondente zona del *loading plot* e da un limitato rispetto a quelle presenti nel terzo settore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

MARKER DEL MIELE DI CASTAGNO

Individuata ed isolata attraverso purificazioni la molecola marker da identificare (§6.3), sono state eseguite le analisi di massa (ESI-MS **Fig. 4.1**), di dicroismo circolare, infrarosso e di spettroscopia NMR. In particolare gli esperimenti di Risonanza Magnetica Nucleare acquisiti sono: 1D- ^1H -NMR e 1D-TOCSY selettivo ed i bidimensionali COSY, NOESY, TOCSY, HMBC, HMQC.

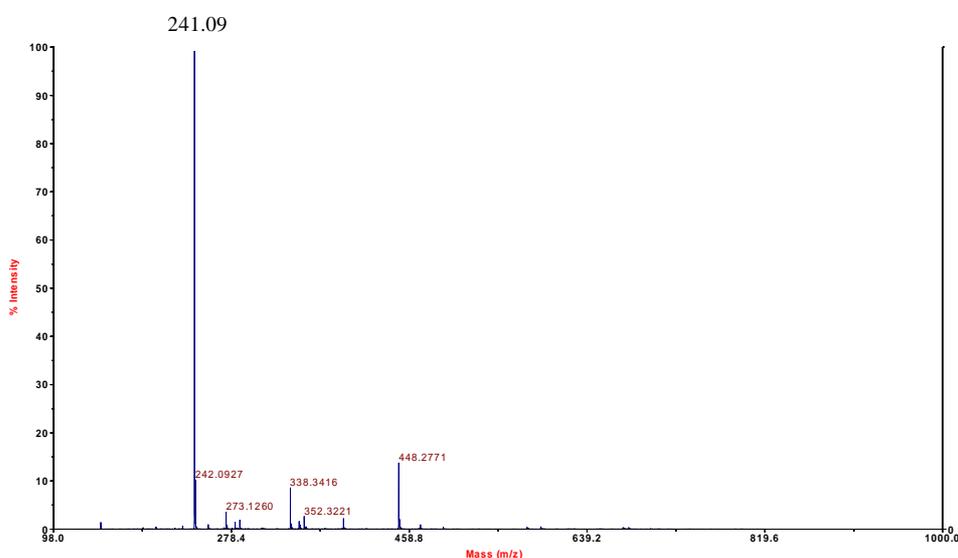


Fig. 4.1: *spettri ESI-MS di una frazione contenente la molecola marker.*

Attraverso un'analisi approfondita degli spettri ottenuti, servendosi della letteratura e di software specifici che predicono il chemical shift in base alla struttura (ChemDraw, ChemSketch), le ipotesi sono state ridotte a due regioisomeri, dei quali il composto più probabile è il composto B (**Fig. 4.2**).

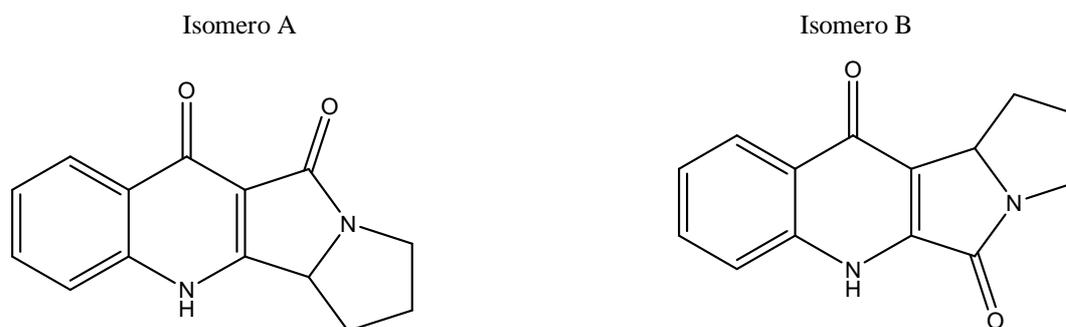


Fig. 4.2: *due isomeri probabili marker del miele di castagno.*

Un articolo uscito durante lo studio^[46] ha confermato il composto B, γ -lactam derivative of 3-pyrrolidinyl kynurenic acid (γ -LACT-3-PKA), quale molecola marker del miele di castagno; esso viene prodotto da un derivato dell'acido chinurenico (3-PKA) in seguito ad una reazione intramolecolare di condensazione (**Fig. 4.3**).

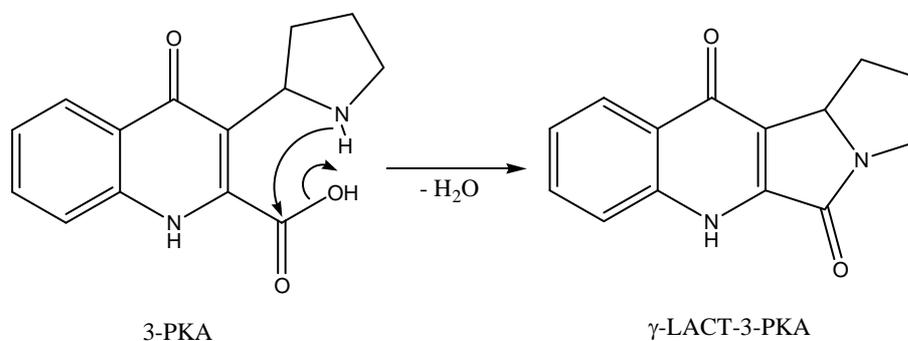


Fig. 4.3: reazione di condensazione dell'acido chinurenico.

CARATTERIZZAZIONE DELLA MOLECOLA

In **Tab. 4.1** viene riportata l'assegnazione delle risonanze ^1H e ^{13}C ottenute mediante l'analisi degli spettri 1D e 2D-NMR di seguito riportati.

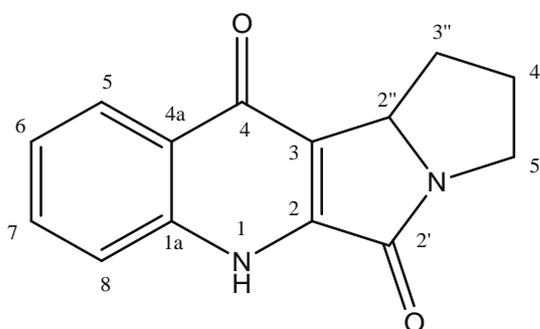


Fig. 4.4: struttura chimica del γ -LACT-3-PKA con l'assegnazione dei carboni.

H	nH	m	¹ H	¹³ C	COSY (³ J)	HMBC	NOESY
1		banda	9.74				7.57
5	1	dd		126.34	7.42	132.76; 139.79; 175.13	7.42
7	1	t	7.69	132.76	7.69; 7.42	126.34; 139.79	7.42; 7.57
8	1	dd	7.57	118.40	7.69	124.19; 132.76; 127.49	
6	1	t	7.42	124.19	8.44; 7.69	118.3; 127.49; 132.76	7.69; 8.44
2''	1	dd	4.80	63.00	2.63; 1.26	29.26 (debole); 126.32; 166.97	2.42; 2.63; 3.52
5''a	1	m	3.68	41.52	2.43; 2.45	29.26; 166.97	2.45; 3.52
5''b	1	m	3.52	41.52	2.42; 2.45	29.26	2.42; 3.68; 4.80
3''a	1	dt	2.63	29.26	2.42; 2.45; 4.80	41.52	4.80; 1.26; 2.42
4''a	1	m	2.42	29.26	2.63; 3.52; 3.68; 1.26	63.00	3.52; 2.63; 2.45; 4.80
4''b	1	m	2.45	29.26	2.63; 3.52; 3.68; 1.26	63.00	3.52; 1.26; 2.42
3''b	1	m	1.26	29.26	sovr.	63.00; 126.32	
3				126.32			
4				175.13			
4a				139.79			
1a				127.49			
2'				166.97			

Tab. 4.1: assegnazione dei protoni e dei carboni secondo la numerazione di Fig. 4.4.

ESI-MS (Acetonitrile-Acqua 1:1+0.1% HCOOH): 241 m/z [M+H]⁺

EI-MS: 213, 196, 185, 172, 144, 120; 162, 120 m/z partendo dal picco ESI-MS 241 m/z [M+H]⁺

IR (CaF₂; cm⁻¹): 3396, 3019, 2959, 2927, 2855, 1712, 1692, 1674, 1662, 1642, 1626, 1598, 1540

CD (MeOH ; nm) : 222.8

UV-Vis (CHCl₃, nm) : 335, 350

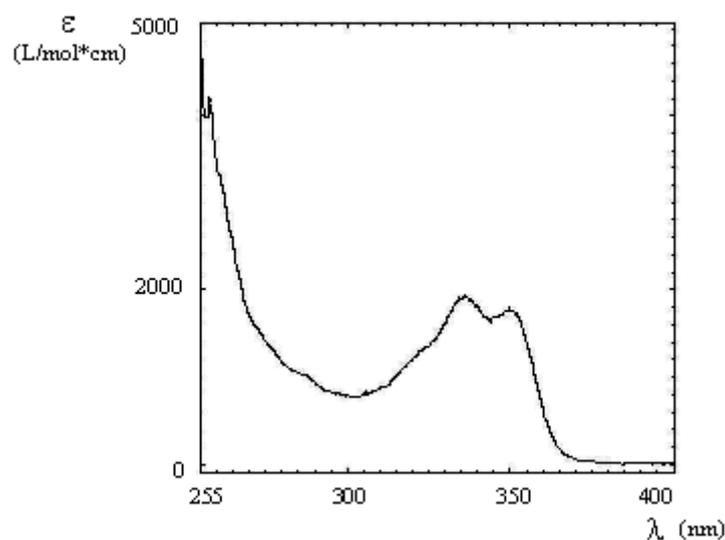


Fig. 4.5: spettro UV del γ -LACT-3-PKA.

INTERPRETAZIONE DEGLI SPETTRI ACQUISITI

Di seguito si riporta una descrizione degli spettri analizzati (in essi viene indicato, sui picchi o sulla diagonale, il numero del protone riportato in **Fig. 4.4**). La **Fig. 4.6** mostra lo spettro monodimensionale con alcune zone allargate nelle quali risuonano i protoni della molecola in esame. I forti segnali a basse frequenze (<2ppm) derivano da impurezze presenti nel campione in esame.

- **1D ^1H -NMR**

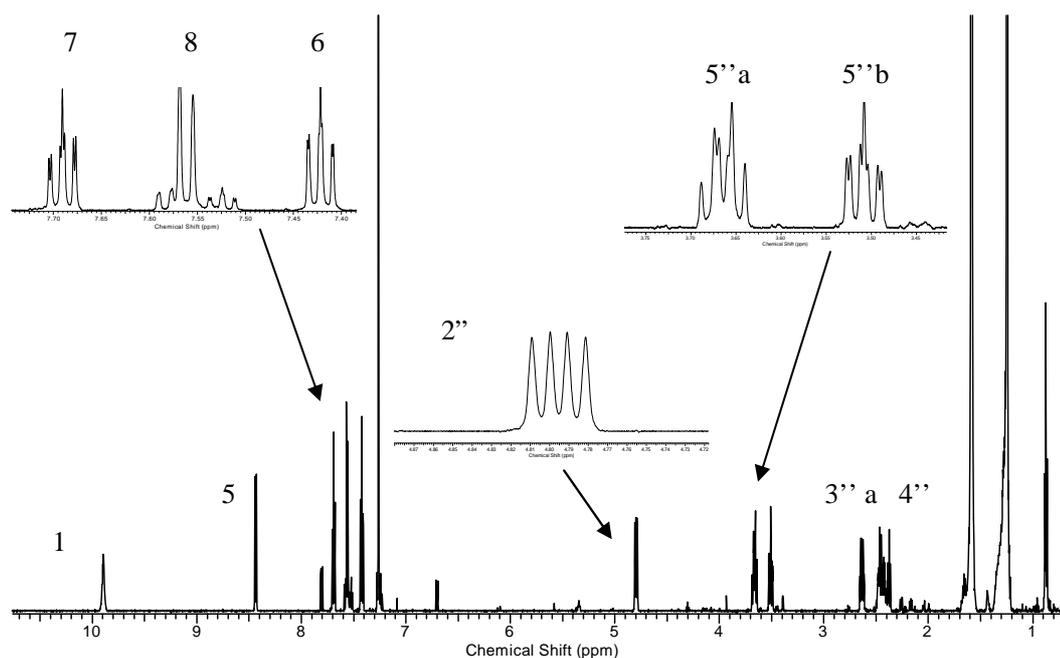


Fig. 4.6: spettro 1D- ^1H -NMR della frazione purificato con l'ingrandimento di alcuni segnali caratteristici.

- **1D-TOCSY selettivo**

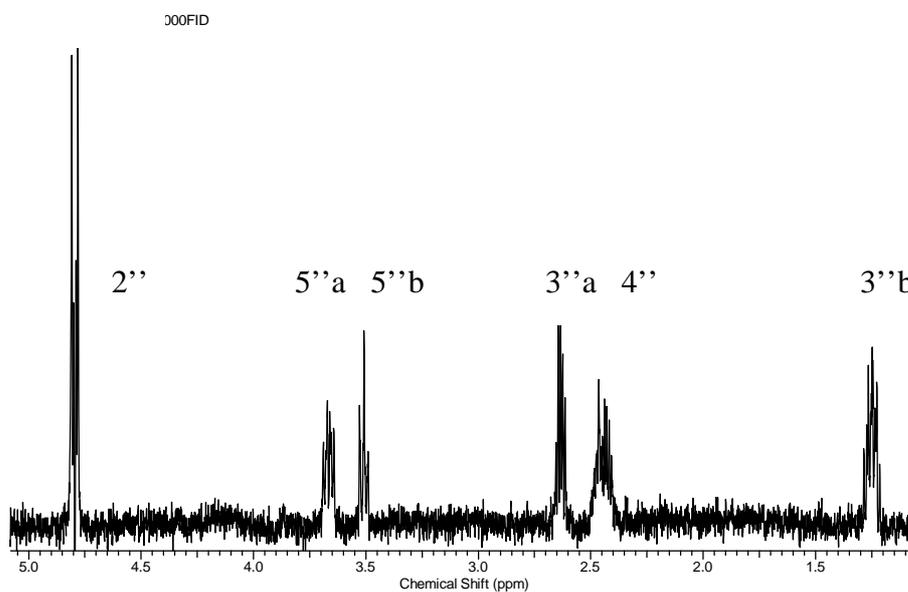


Fig. 4.7: spettro 1D- TOCSY selettivo ottenuto eccitando il segnale a 4.8 ppm.

Questa tecnica è stata usata per vedere le correlazioni TOCSY del protone a 4.80 ppm (2''): utilizzando un impulso selettivo su quel segnale, vengono eccitati e rilevati solamente i protoni ad esso correlati scalarmente (**Fig. 4.7**). Risultato di questo è uno spettro nel quale compaiono solamente i segnali dei picchi dei protoni che fanno parte dello stesso sistema di spin di quello irradiato. Questa tecnica ha permesso di identificare il segnale del protone a 1.26 ppm (3''b), altrimenti sovrapposto con altri segnali derivanti da impurezze.

- **2D-TOCSY**

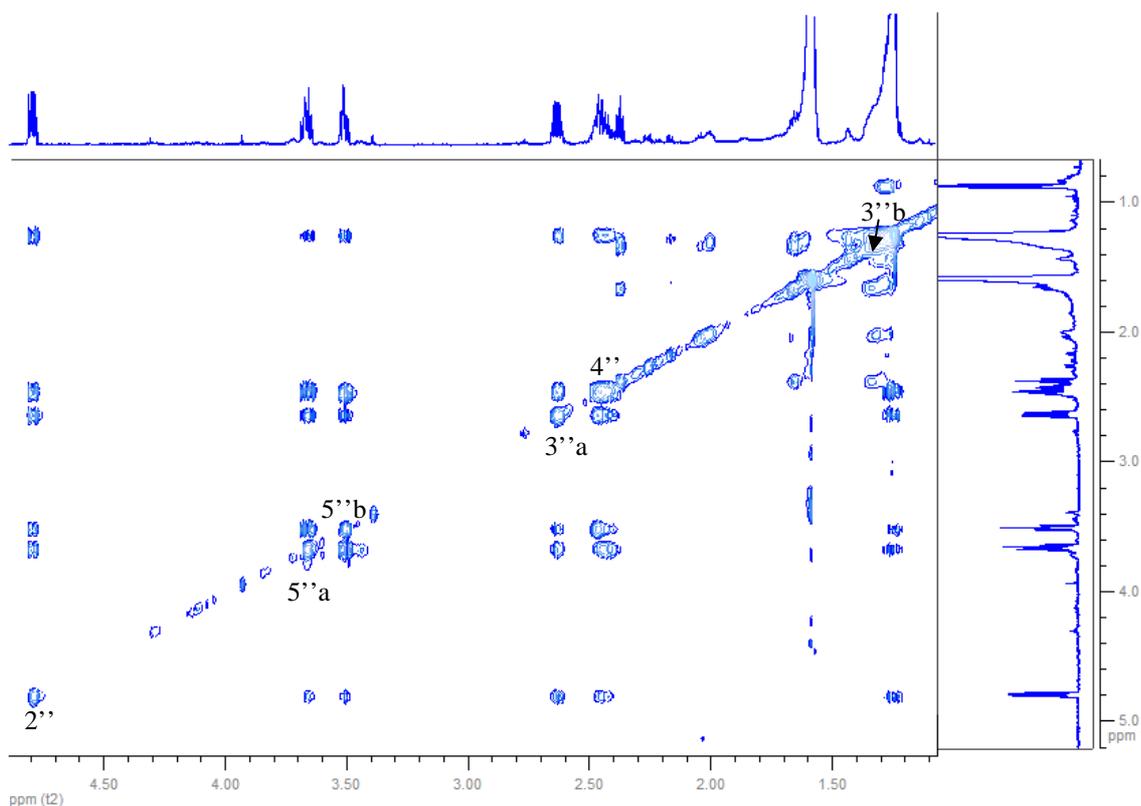


Fig. 4.8: particolare della zona da 1 a 5 ppm dello spettro 2D-TOCSY della frazione purificata.

Lo spettro evidenzia le correlazioni tra protoni che fanno parte dello stesso sistema di spin (§3.3.2); questo viene interrotto dalla presenza nella catena di eteroatomi, carbonili o carboni quaternari. Nel nostro caso ci sono due sistemi di spin: uno è quello che comprende i protoni aromatici, interrotto da due carboni quaternari, e l'altro è quello nell'anello pirrolidinico, interrotto da un carbonile ed un azoto (questa zona spettrale è rappresentata in **Fig. 4.8**).

- **2D-COSY**

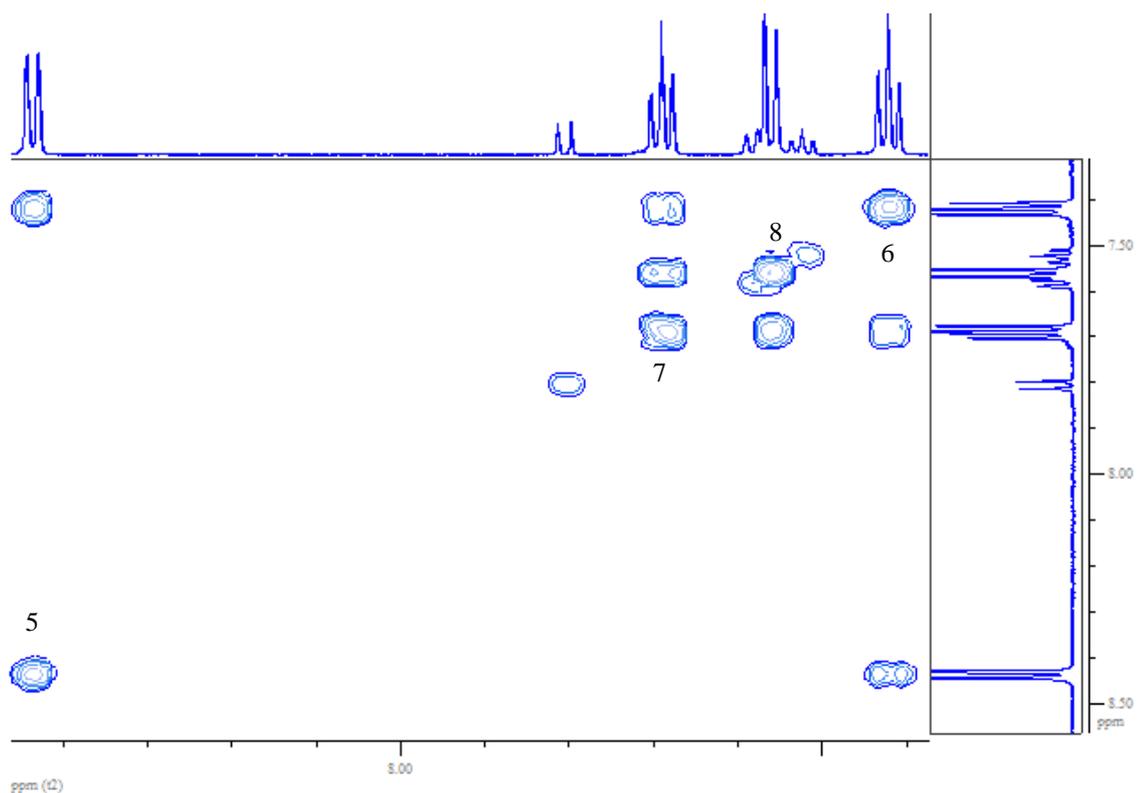


Fig. 4.9: particolare della zona da 7 a 8.5 ppm dello spettro 2D-COSY della frazione purificata.

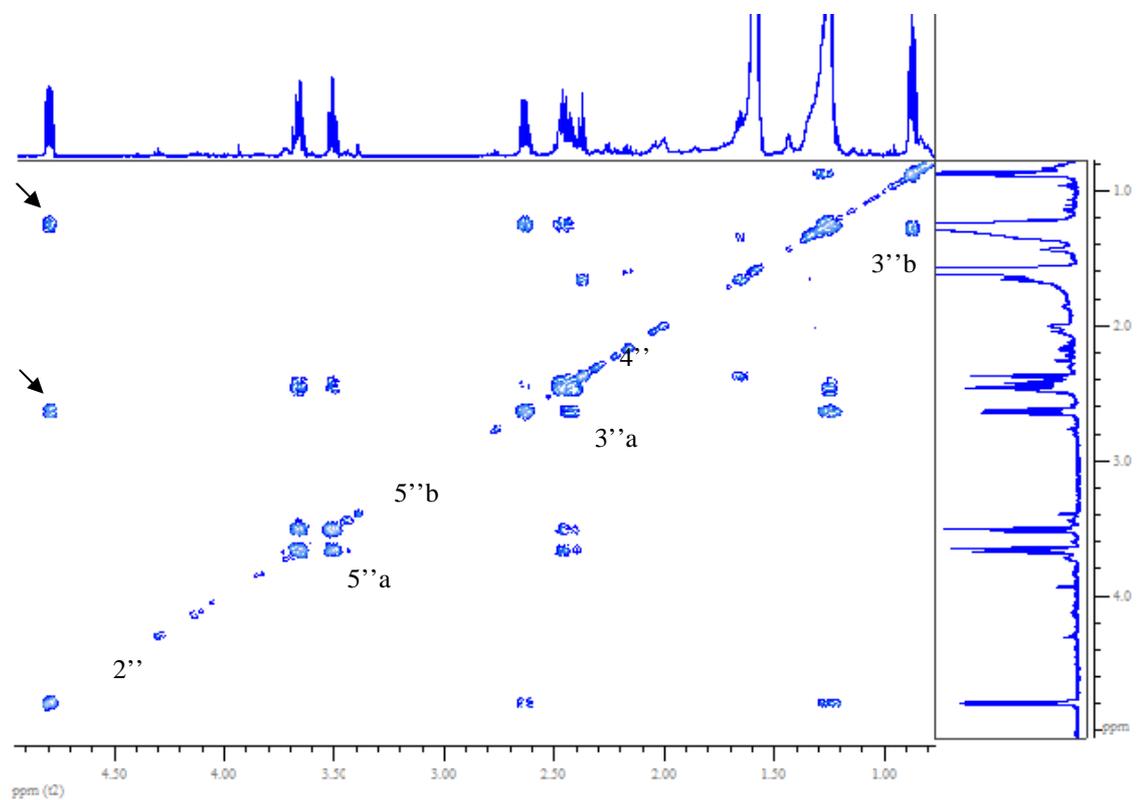


Fig. 4.10: particolare della zona da 1 a 5 ppm dello spettro 2D-COSY della frazione purificata.

Insieme allo spettro TOCSY, il COSY è stato fondamentale per capire la zona aromatica (**Fig. 4.9**) e, in particolar modo, la zona pirrolidinica (**Fig. 4.10**). Lo spettro, attraverso i cross-picchi, indica le correlazioni 3J e 2J : si osservano solo i protoni su atomi adiacenti o geminali (§3.3.1). Per esempio i due cross-picchi indicati con le frecce in **Fig. 4.10** hanno permesso di assegnare i chemical shifts dei protoni 3''a (2.63 ppm) e 3''b (1.26 ppm). L'assegnazione della risonanza di questi due protoni differisce da quella riportata in letteratura^[46].

- 2D-NOESY

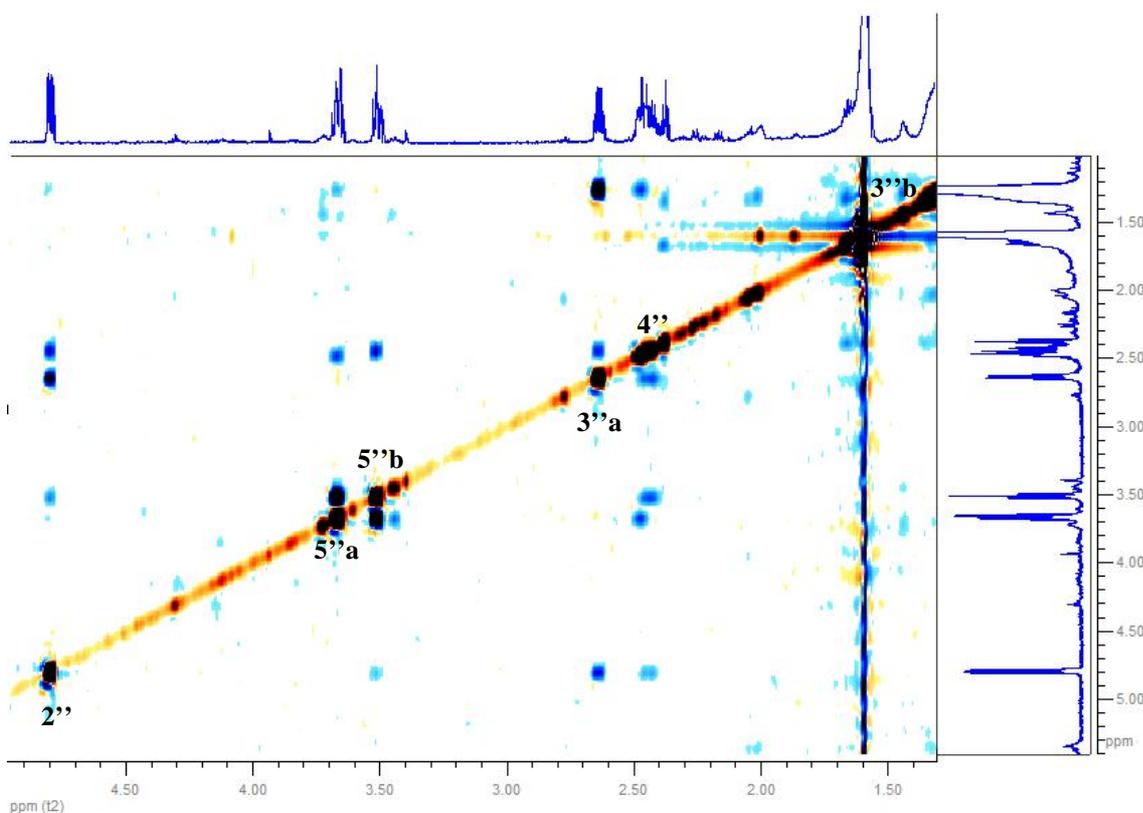


Fig. 4.11: particolare della zona da 1 a 5 ppm dello spettro 2D-NOESY della frazione purificata.

Nello spettro NOESY (**Fig. 4.11**) i cross-picchi vengono originati da interazioni dipolari tra protoni distanti al massimo 5 Å; questo ha permesso di risalire alla configurazione relativa degli atomi di idrogeno (§4.1.3). In **Fig. 4.12** sono riportate le correlazioni dell'atomo 2'' e dell'atomo 4''a, ritenute più esemplificative; si nota che il protone a 4.8 ppm presenta picchi NOE più intensi con i protoni a 2.63 ppm, 2.42 e 3.68 che quindi stanno sopra al piano ipotetico della molecola di **Fig. 4.12**, mentre quello a 2.45 ppm presenta cross-picchi forti oltre che con l'idrogeno geminale, a 2.42', anche con i protoni che risuonano a 1.26, 3.68 e che quindi stanno sotto al piano della molecola. In **Tab. 4.1**, nella colonna NOESY, vengono riportate tutte le correlazioni osservate.

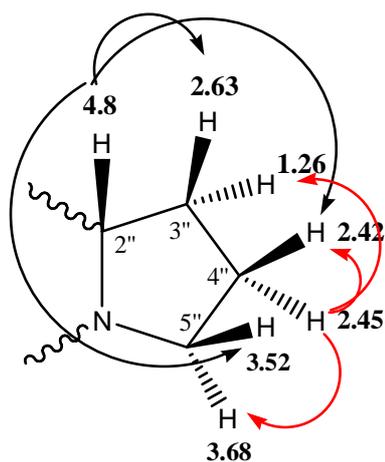


Fig. 4.12: configurazione relativa rispetto al carbonio 2'' e correlazioni NOESY dell'atomo 2'' e 4''a.

Lo spettro NOESY ha contribuito a confermare l'isomero B come molecola marker; l'esclusione dell'isomero A è stata fatta a causa dell'assenza nello spettro del cross-picco tra il protone 2'' ed il protone 1.

- **2D-HMQC**

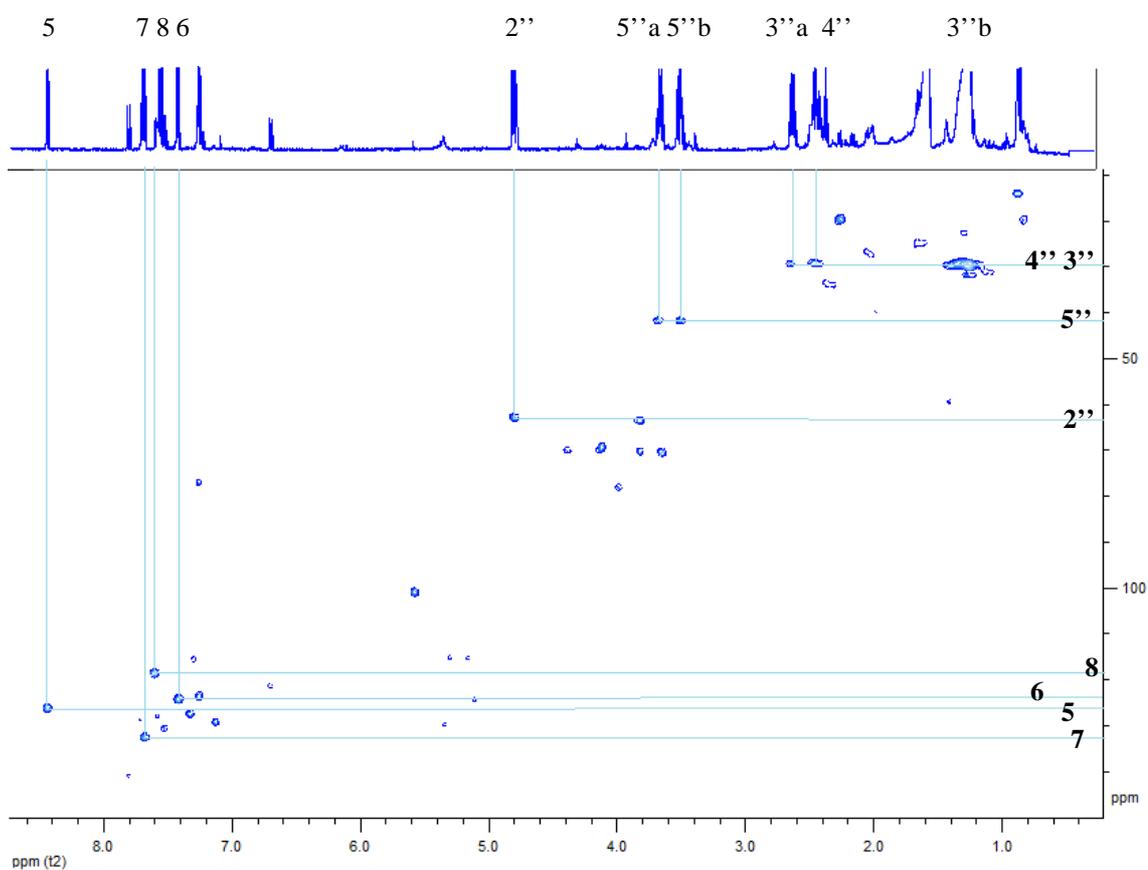


Fig. 4.13: spettro 2D-HMQC della frazione purificata (in grassetto i carboni).

Questo spettro (**Fig. 4.13**) permette di assegnare il chemical shifts dei carboni legati direttamente ad atomi di idrogeno (§3.3.4). Unito allo spettro HMBC è stato utile per capire la sequenza degli atomi all'interno della molecola.

- **2D-HMBC**

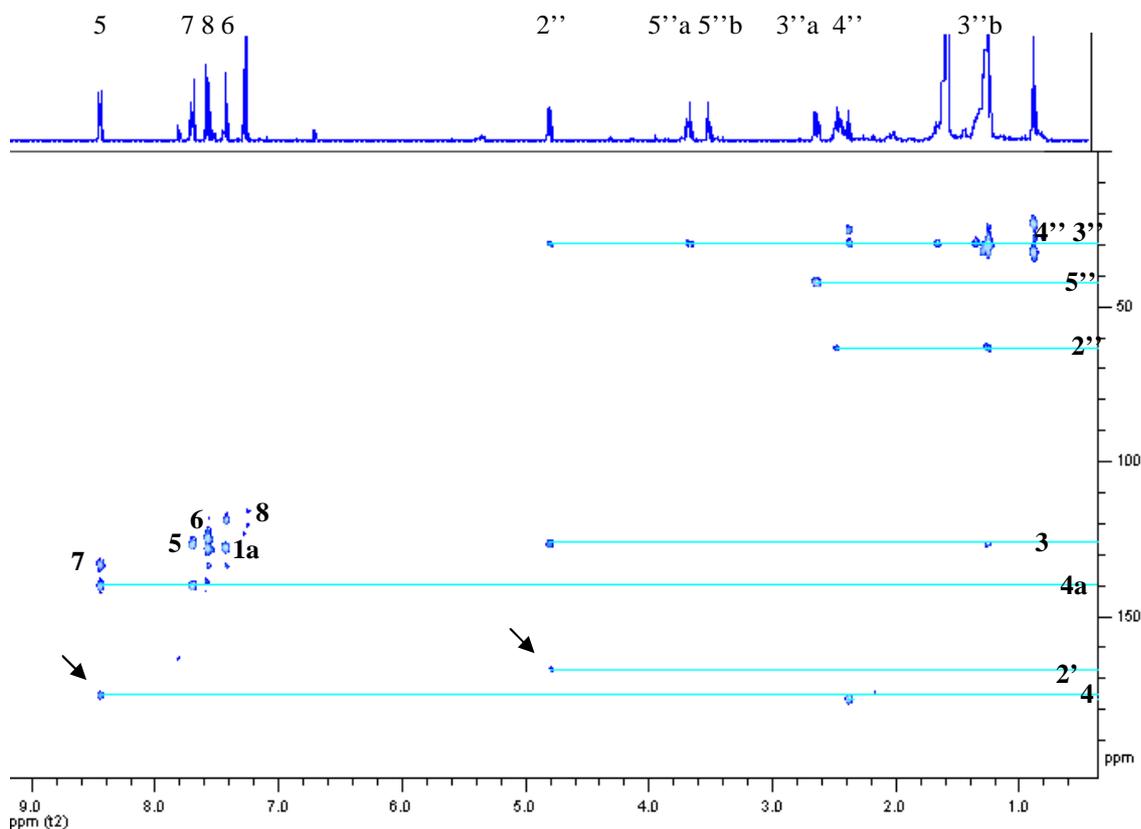


Fig. 4.14: spettro 2D-HMBC della frazione purificata (in grassetto i carboni).

Lo spettro indica le correlazioni tra i protoni ed i carboni che distano 2J e 3J (solitamente i cross-picchi sono più intensi per quest'ultime, §3.3.4). Questo esperimento è utile per capire la presenza di gruppi carbonilici. Questi vengono osservati nei cross-picchi tra protoni e carboni che cadono nella zona tra 160 e 200 ppm (indicati con le frecce in **Fig 4.14**): cross-picco tra il protone 8.44 ppm (5) ed il carbonio a 175.13 ppm (carbonile in posizione 4) e cross-picco tra quello a 4.80 ppm (2'') ed il carbonio a 166.97 ppm (carbonile in posizione 2').

OSSERVAZIONI

La molecola risulta quasi completamente planare per la presenza di anelli aromatici e sistemi coniugati. La parte non planare è quella dell'anello pirrolidinico. Si riporta una predizione della struttura 3D eseguita con il programma ChemDraw (**Fig. 4.15**).

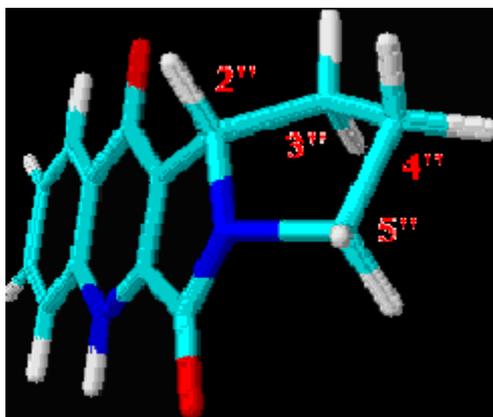


Fig. 4.15: ipotesi della struttura 3D del γ -LACT-3-PKA eseguita con il software ChemDraw.

Il carbonio 2'' è un centro stereogenico; è stato eseguito uno spettro CD (**Fig. 4.16**) il quale ha confermato che la molecola presenta attività ottica; si osserva un minimo a 222.8 nm.

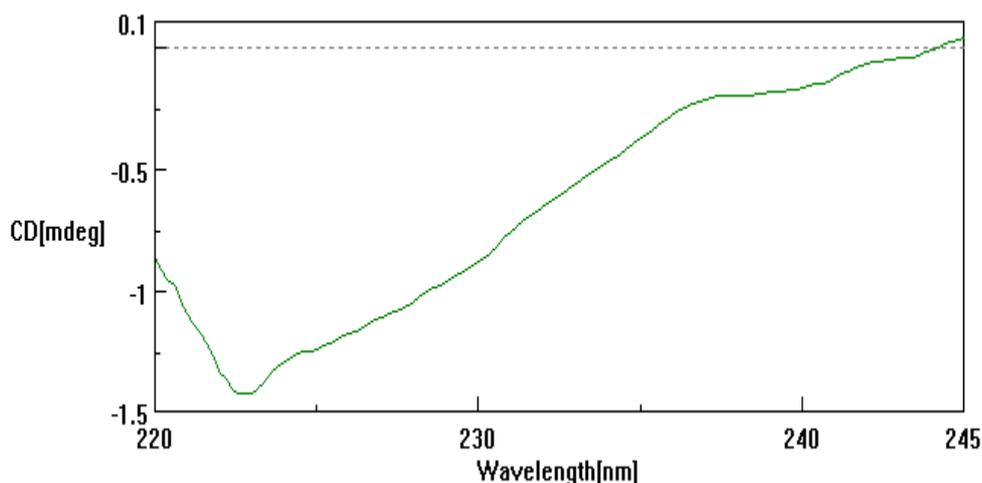
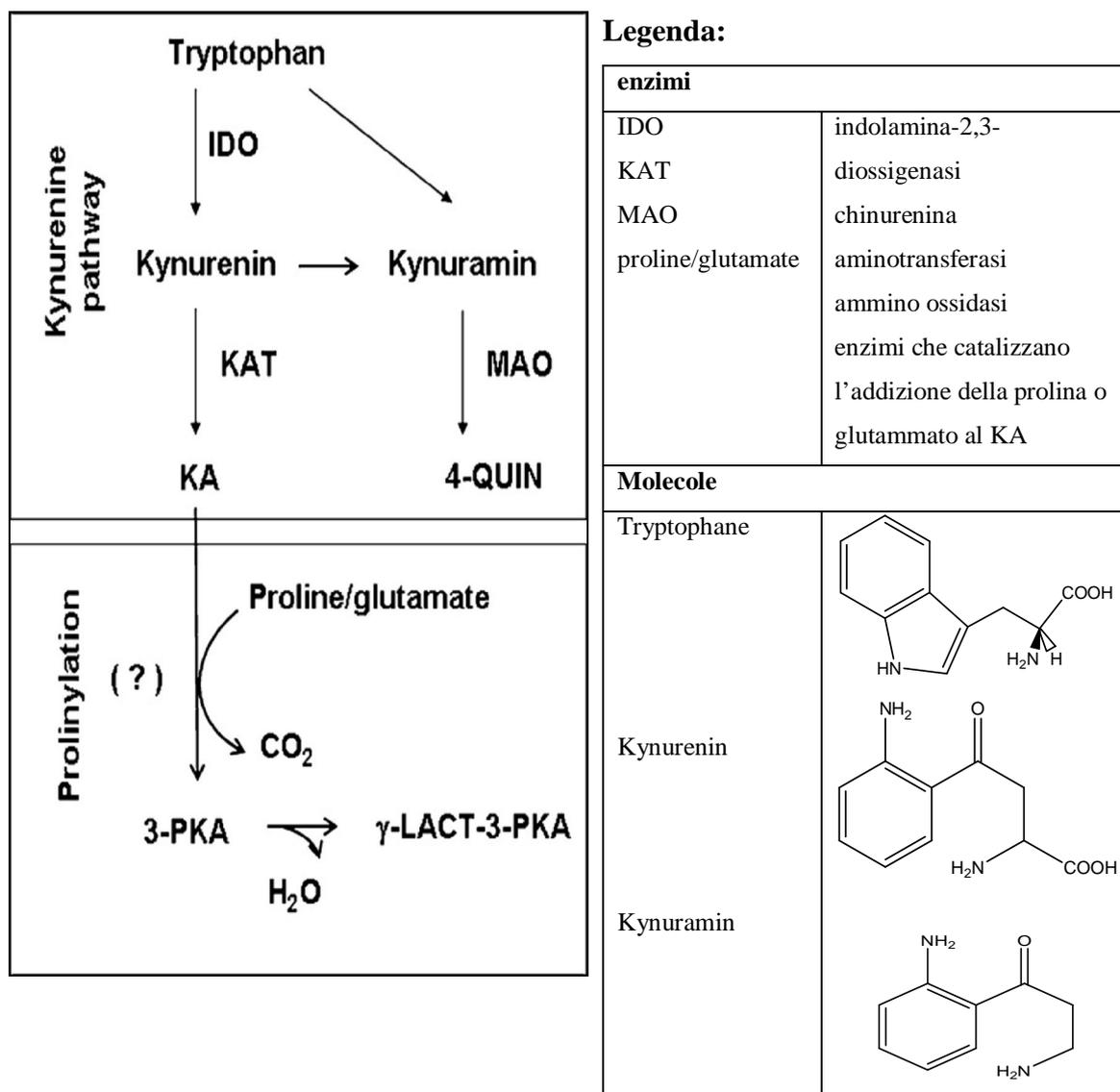


Fig. 4.16: spettro CD del γ -LACT-3-PKA.

Nello **Schema 4.1** s'ipotizza il biomeccanismo di formazione del γ -LACT-3-PKA; questo ha un ruolo nel metabolismo del triptofano^[47]. L'intervento di enzimi, i quali agiscono probabilmente con ritenzione della conformazione (legano la L-prolina o L-glutammato), fanno ipotizzare che la molecola sia in eccesso enantiomerico in conformazione L.



Schema 4.1: ipotesi del biomeccanismo di formazione del γ -LACT-3-PKA.

Ipoteticamente esiste una tautomeria cheto-enolica che interessa il carbonile sul carbonio 4, simile a quella presente nella molecola dell'acido chinurenico (KA), favorita in ambiente acido^[48] (Fig. 4.17).

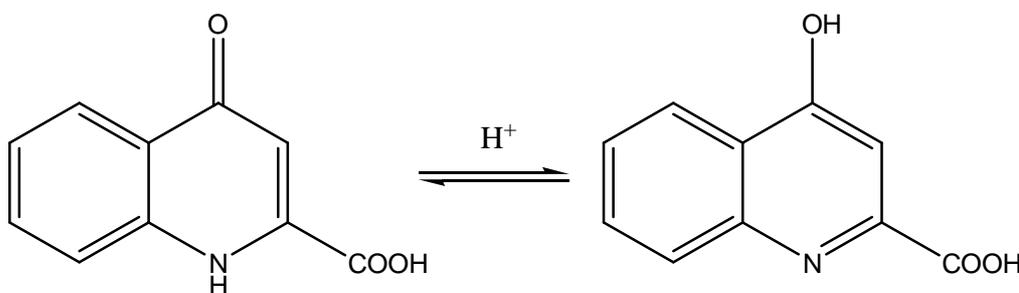


Fig. 4.17: risonanza cheto-enolica dell'acido chinurenico.

IDENTIFICAZIONE DI ALTRE MOLECOLE NELL'ESTRATTO

Nelle varie frazioni raccolte dalle colonne di purificazione sono state identificate altre due molecole che presentano segnali ben identificabili nella zona aromatica: la crisina (5,7 Dihydroxyflavone) e il 4-chinolone (4-QUIN).

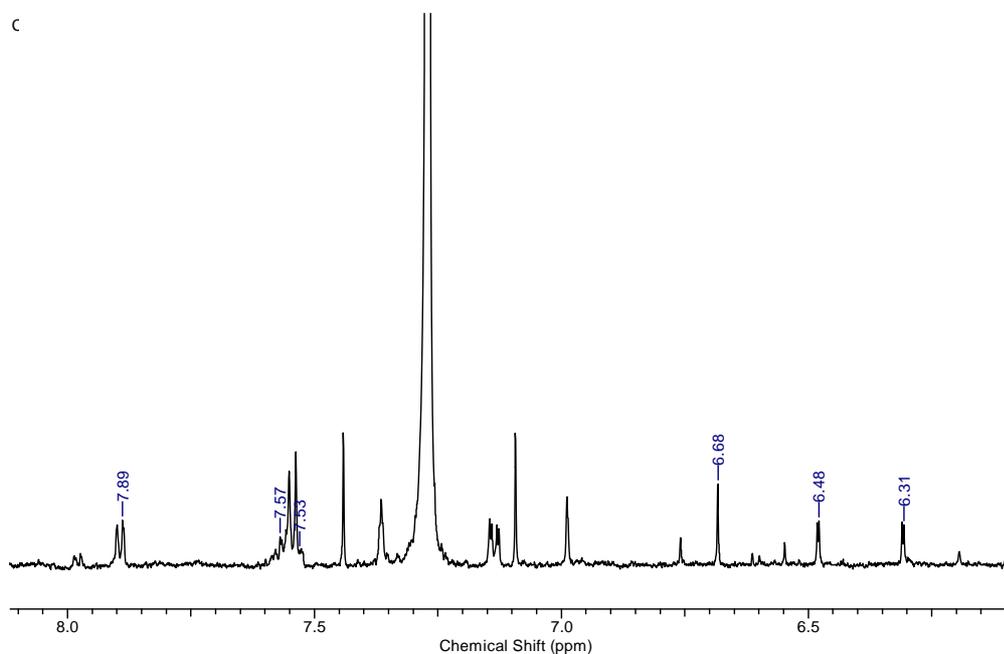


Fig. 4.18: particolare dello spettro di una frazione purificata, con peak peaking dei segnali della crisina.

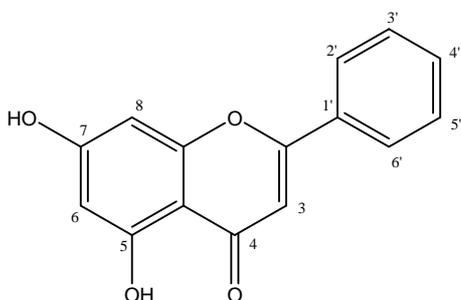


Fig. 4.19: struttura della crisina.

ESI-MS (Acetonitrile-Acqua 1:1+0.1% HCOOH):
255 m/z [M+H]⁺

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): **3',4',5'**
7.89 (d); **2',6'** 7.53÷7.57 (sovrapposti); **3** 6.68 (s);
6 6.31 (d, J=2.20 Hz); **8** 6.48 (d).

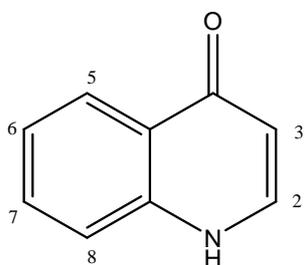


Fig. 4.20: struttura del 4-chinolone.

ESI-MS (Acetonitrile-Acqua 1:1+0.1% HCOOH):
146 m/z [M+H]⁺

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): **2** 8.07 (d,
J=6.56 Hz); **5** 7.94 (dd, ³J=7.84 Hz, ²J=1.31 Hz); **7**
7.89 (m); **6,8** 7.10÷7.60 (sovrapposti); **3** 6.00÷6.40
(sovrapposto).

La crisina è presente sì in tutti i vari tipi di miele, ma l'analisi statistica ha evidenziato che questo flavonoide è contenuto in maggior quantità nei mieli di acacia. La molecola 4-QUIN, presente unicamente nel miele di castagno, potrebbe trovarsi in risonanza con la sua forma enolica (4-quinolinol); infatti nello spettro sono presenti diversi doppietti nella zona aromatica riconducibili a questa ($^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm): **2** 8.48 (d, $J=8.30$ Hz); **5** 8.10 (dd, $^3J=8.32$ Hz, $^2J=1.25$ Hz); **3** 6.61 (d, $J=8.27$ Hz)). Tale ipotesi è stata fatta in base alla predizione dello spettro data da ChemDraw e data dal sito www.nmrdb.org unite ad un articolo in letteratura^[49], quindi merita uno studio di conferma più approfondito.

MARKER DEL MIELE DI EUCALIPTO

Da un'analisi visiva di una sovrapposizione di spettri ottenuti da estratti organici di 5 diverse origini botaniche (Fig. 4.21), sono stati evidenziati alcuni segnali caratteristici degli spettri ottenuto dai mieli di eucalipto. In Fig. 4.22 tali segnali sono indicati con delle frecce.

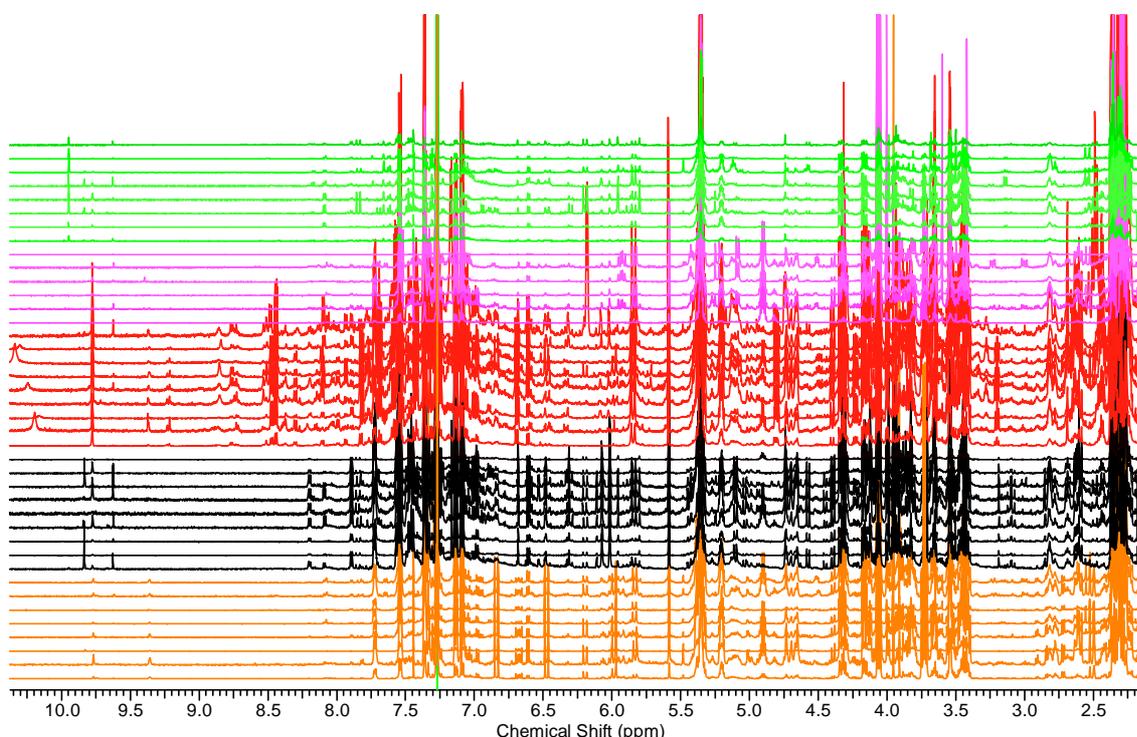


Fig. 4.21: sovrapposizione degli spettri $^1\text{H-NMR}$ delle varie origini. Acacia **nero**, castagno **rosso**, eucalipto **arancio**, arancio **viola**, millefiori **verde**. Da osservare i doppietti a δ 6.87 e 6.47 ppm dell'eucalipto.

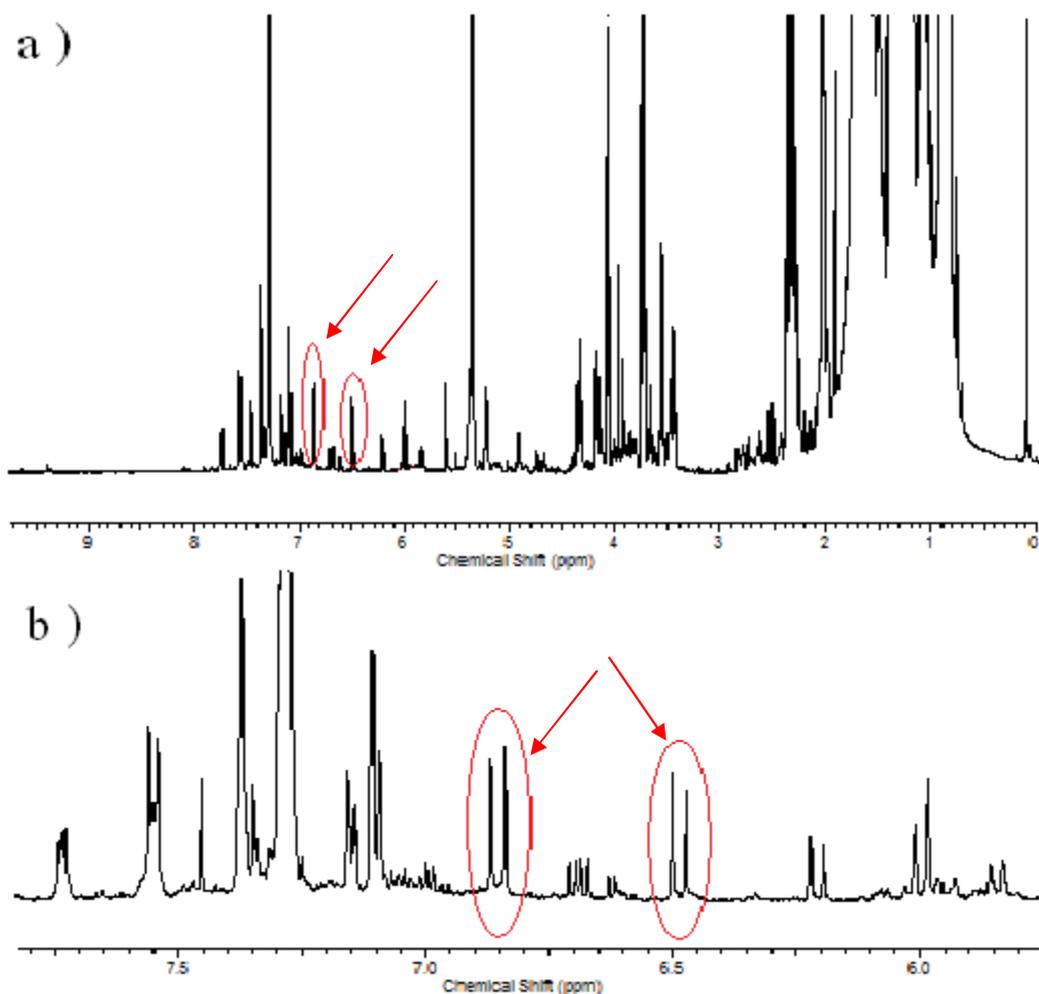


Fig. 4.22: a) spettro 1D-¹H-NMR di un campione di miele dell'eucalipto con evidenziati i segnali olefinici del probabile marker, b) ingrandimento della zona dei protoni olefinici.

Attraverso purificazione il probabile marker è stato ottenuto sufficientemente puro e concentrato per le analisi finalizzate all'identificazione della struttura (¹H-NMR, NOESY, TOCSY, HMBC, HMQC, ESI-MS). Attraverso un'analisi approfondita di tutti gli spettri ed ricerche in letteratura, è stata individuata la struttura della molecola (**Fig. 4.23**). Questa molecola è il dehydrovomifoliol (DHV) e non caratterizza unicamente il miele di eucalipto; in letteratura sono presenti degli articoli che la individuano anche nel miele di erica^[50].

CARATTERIZZAZIONE DELLA MOLECOLA

In **Tab. 4.2** viene riportata l'assegnazione delle risonanze ^1H e ^{13}C ottenute mediante l'analisi degli spettri 1D e 2D-NMR di seguito riportati.

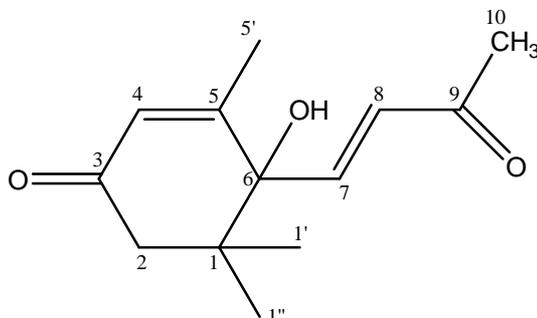


Fig. 4.23: struttura chimica del dehydrovomifoliol con l'assegnazione dei carboni.

H	nH	m	^1H	^{13}C	TOCSY	NOESY	HMBC
-OH	1		1.64			6.47; 5.97	
8	1	d	6.84	144.95	6.47	6.47; 2.51; 2.31; 1.89; 1.03; 5.97(debole)	79.30; 197.97
7	1	d	6.47	130.32	6.84	6.84; 2.51 (debole); 2.31; 1.64; 1.11; 1.03	79.30; 197.97
4	1	s	5.97	128.18	1.89	6.84 (debole); 1.89; 1.11; 1.03.	79.30; 49.8; 18.82
2a	1	d	2.51	49.80	2.34		196.8; 42.5; 23.75
2b	1	d sovr.	2.34	49.80	2.51		196.80; 42.5; 79.3
10	3	s	2.31	28.36			197.97; 130.32; 144.95 (debole)
5'	3	s	1.89	18.82	5.97		79.30; 128.18; 160.82
1'	3	s	1.11	24.71			79.30; 42.50; 49.80; 23.75
1''	3	s	1.03	23.75			79.30; 42.50; 49.80; 24.71
3				196.80			
5				160.82			
6				79.30			
1				42.50			
9				197.97			

Tab. 4.2: assegnazione dei protoni e dei carboni secondo la numerazione di **Fig. 4.23**.

ESI-MS (Acetonitrile-Acqua 1:1 +0.1% HCOOH): 223 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

INTERPRETAZIONE DEGLI SPETTRI ACQUISITI

Si riportano gli spettri in CDCl_3 degli esperimenti più utili per l'identificazione (in essi viene indicato, sui picchi o sulla diagonale, il numero del protone riportato in **Fig. 4.23**).

- **1D-¹H-NMR**

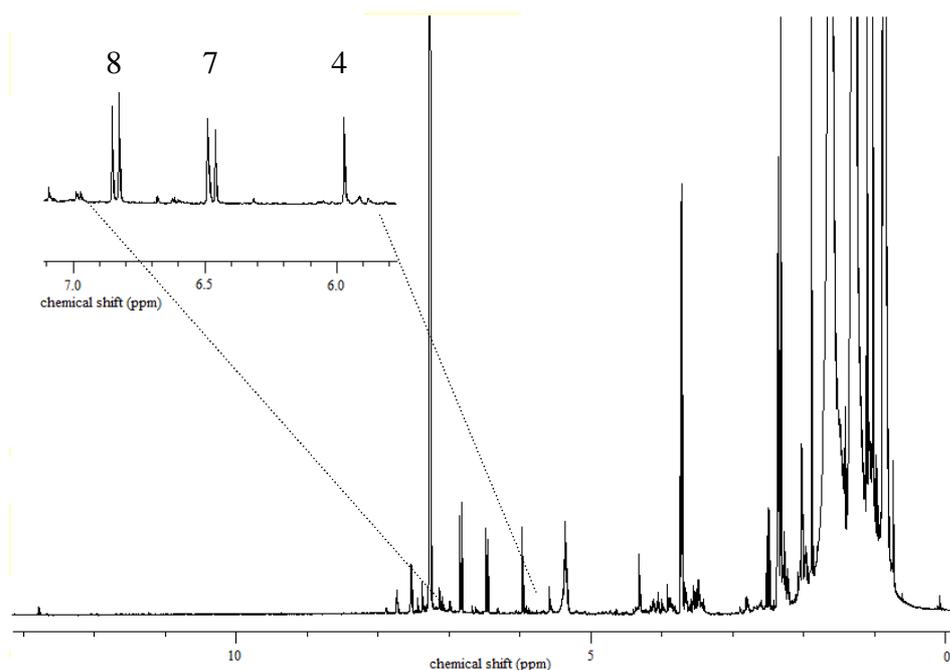


Fig. 4.24: spettro ¹H-NMR della frazione purificata del DHV con particolare della zona olefinica.

Il valore delle J (15.87 Hz) dei doppietti 7 e 8 (**Fig. 4.24**), cioè dei 2 protoni del doppio legame, fa concludere che questi siano in conformazione trans.

- **2D-TOCSY**

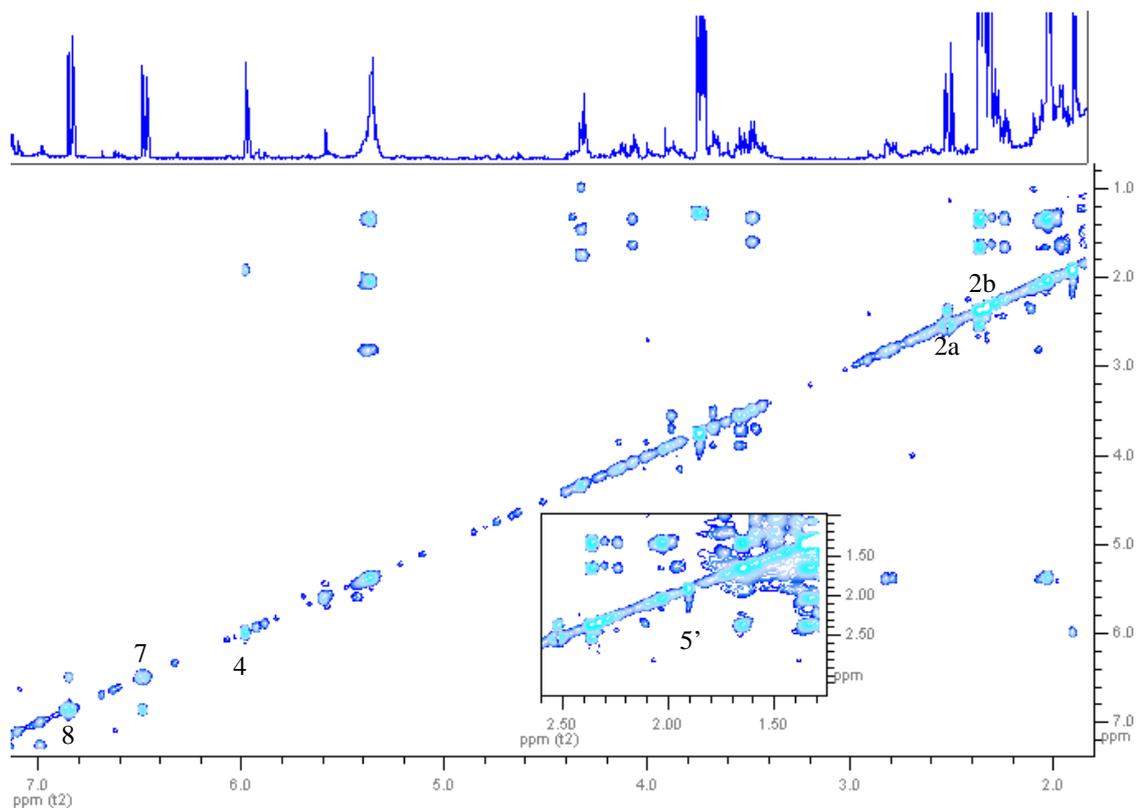


Fig. 4.25: spettro 2D-TOCSY della frazione purificata con particolare della zona da 1 a 2.5 ppm.

Lo spettro TOCSY ha evidenziato la presenza di 3 sistemi di spin (§3.3.2); infatti i protoni 7 e 8, i geminali sul carbonio 2 correlano solo tra loro rispettivamente e quello sul 4 con quelli sul carbonio 5' (**Fig. 4.25**). Non viene riportato lo spettro COSY nel quale si nota solo la correlazione tra i protoni 7 e 8.

• **2D-NOESY**

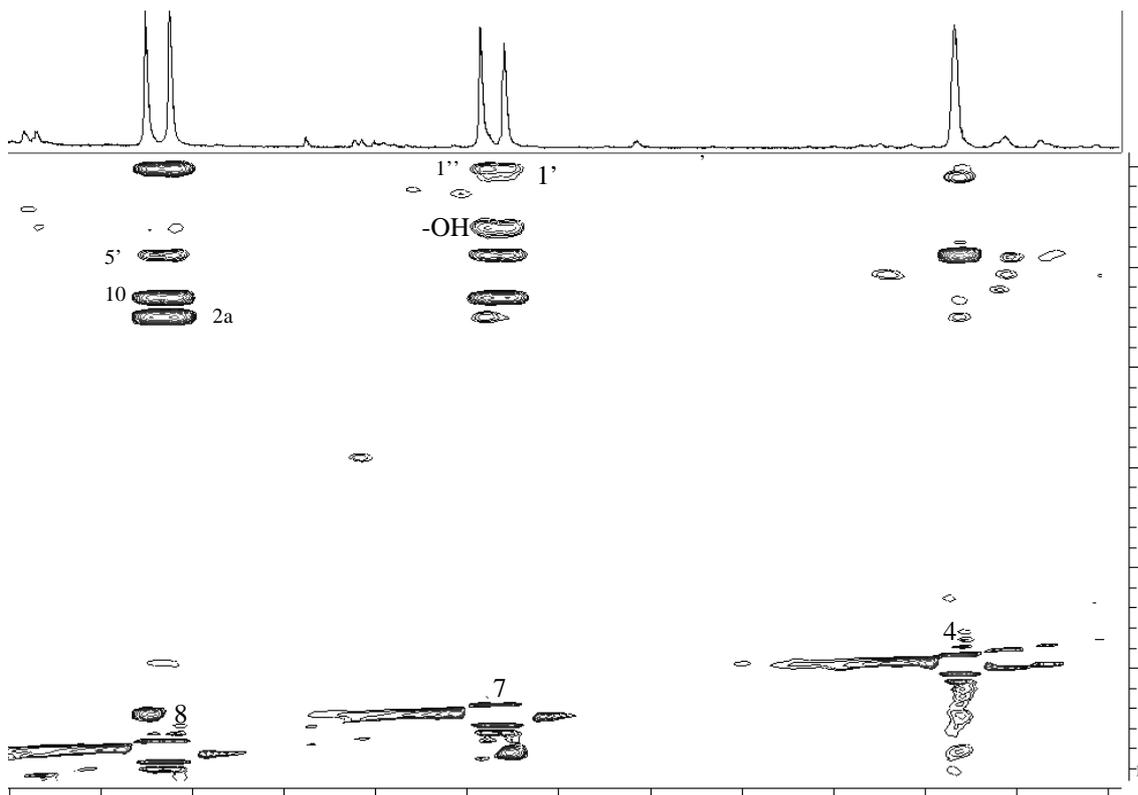


Fig. 4.26: particolare della zona olefinica dello spettro 2D-NOESY della frazione purificata del marker.

La **Fig. 4.26** rappresenta la porzione olefinica dello spettro NOESY. In **Tab. 4.2** vengono riportate le correlazioni NOESY dei protoni 4, 7 e 8. Le correlazioni osservate per i protoni olefinici, 7 ed 8, hanno consentito l'assegnazione della corretta posizione degli stessi.

• 2D-HMQC

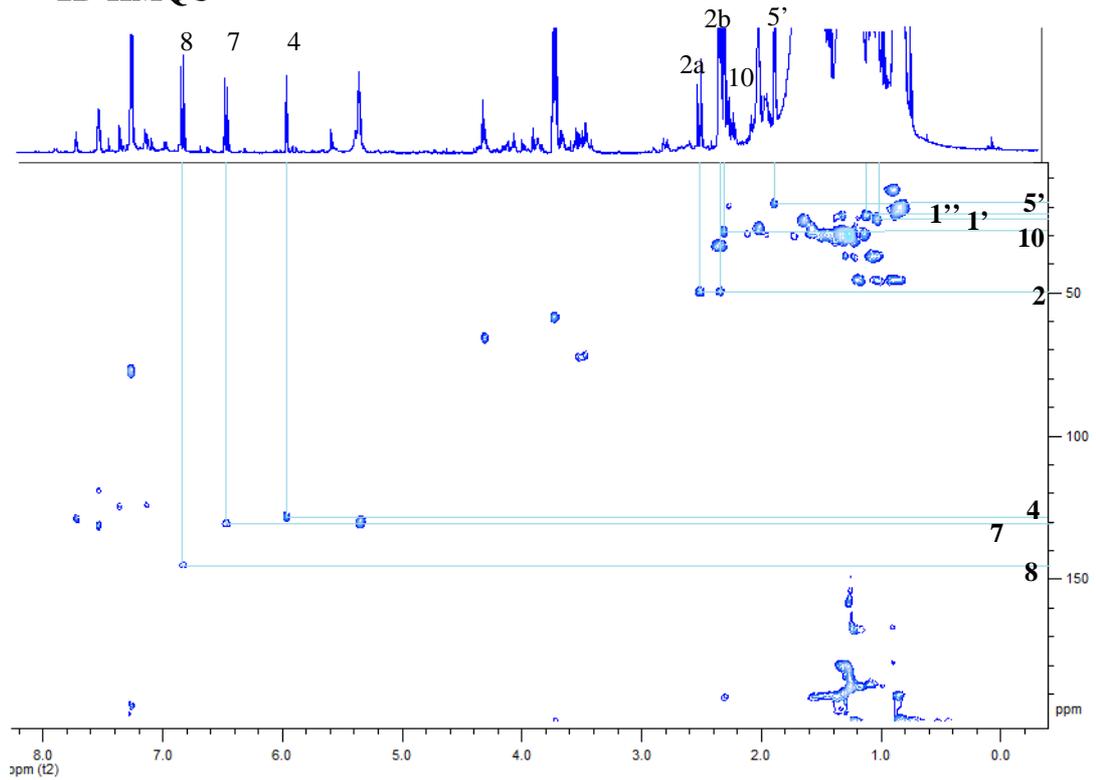


Fig. 4.27: particolare dello spettro 2D-HMQC della frazione purificata del marker (in grassetto i carboni).

• 2D-HMBC

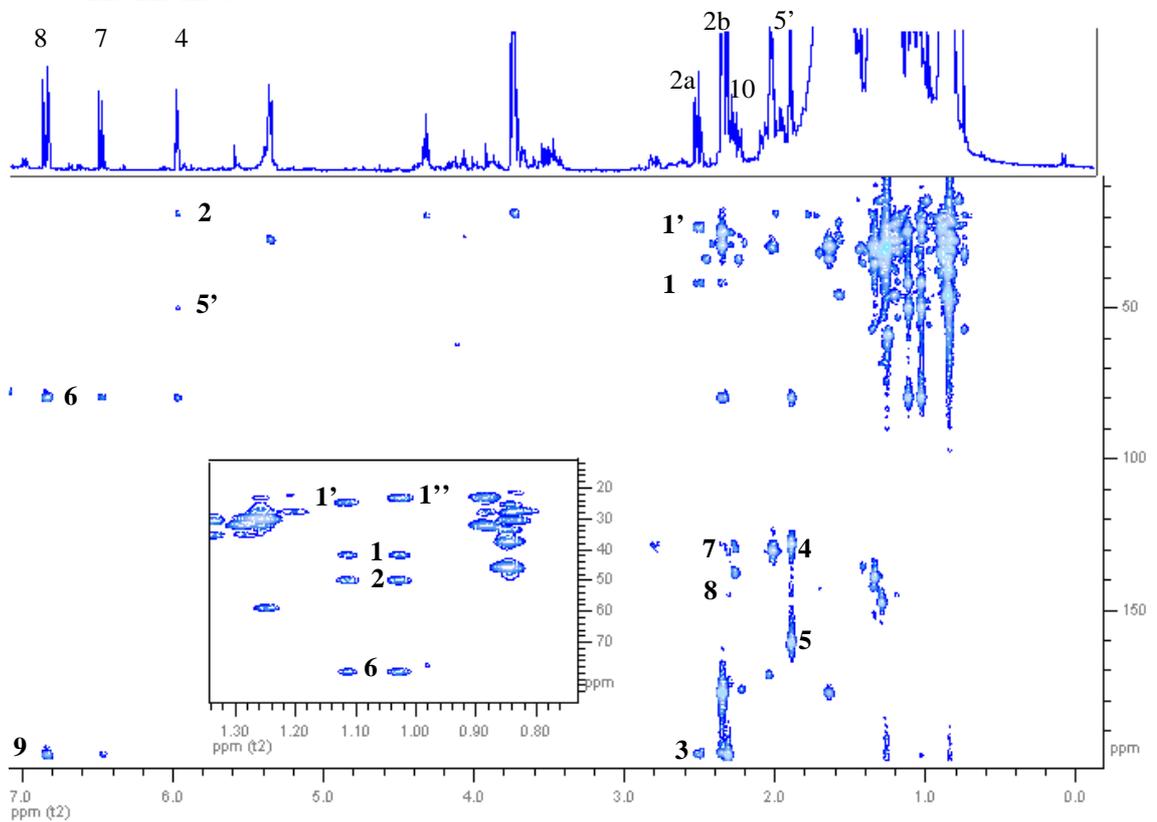


Fig. 4.28: particolare dello spettro 2D-HMBC della frazione purificata del marker con particolare della zona da 0.7 a 1.3 ppm (in grassetto i carboni).

Lo studio incrociato degli spettri HMQC (**Fig. 4.27**) ed HMBC (**Fig. 4.28**) ha dato moltissime informazioni utili (§3.3.4): nel primo si vedono le correlazioni 2J e soprattutto 3J mentre nel secondo quelle 1J . E' stato possibile identificare i carboni carbonilici e i carboni quaternari.

ANALISI STATISTICA

La seconda parte di questo elaborato è stato quello di incrementare con campioni di miele nuovi un database già esistente costituito da 97 campioni di 4 origini botaniche differenti (acacia, castagno, millefiori e tiglio). In questo lavoro sono stati aggiunti 65 campioni così suddivisi (**Tab. 4.3**):

Origine Botanica	n° di Campioni
Eucalipto	18
Acacia	15
Arancio	10
Castagno	22

Tab. 4.3: *suddivisione dei campioni analizzati per origine botanica.*

La procedura di preparazione dei campioni viene indicata nel paragrafo 6.3. L'analisi finale è stata condotta su un totale di 162 campioni di 6 origini floreali differenti e gli spettri 1H -NMR sono stati processati con il software ACDlabs, il quale ha permesso di ricavare il valore degli integrali (§6.4). Questi ultimi sono stati utilizzati come variabili nell'analisi statistica.

Al fine di ottenere un modello statistico in grado di distinguere le sei origini botaniche si è proceduto inizialmente con un'analisi delle componenti principali mettendo a confronto a due a due le diverse origini botaniche con lo scopo ultimo di selezionare le variabili più discriminanti. Si riportano di seguito tutti gli score e loading plots di tutti i confronti sui campioni di eucalipto contro le altre origini floreali. L'analisi è stata condotta dopo aver centrato le variabili rispetto alla media, scalate utilizzando la scultura pareto e trasformate con la funzione logaritmica.

Per facilitare la comprensione i campioni sono stati colorati secondo l'origine botanica: acacia **nero**, castagno **rosso**, eucalipto **arancio**, arancio **viola**, tiglio **blu**, millefiori **verde**.

CONFRONTO EUCALIPTO-CASTAGNO

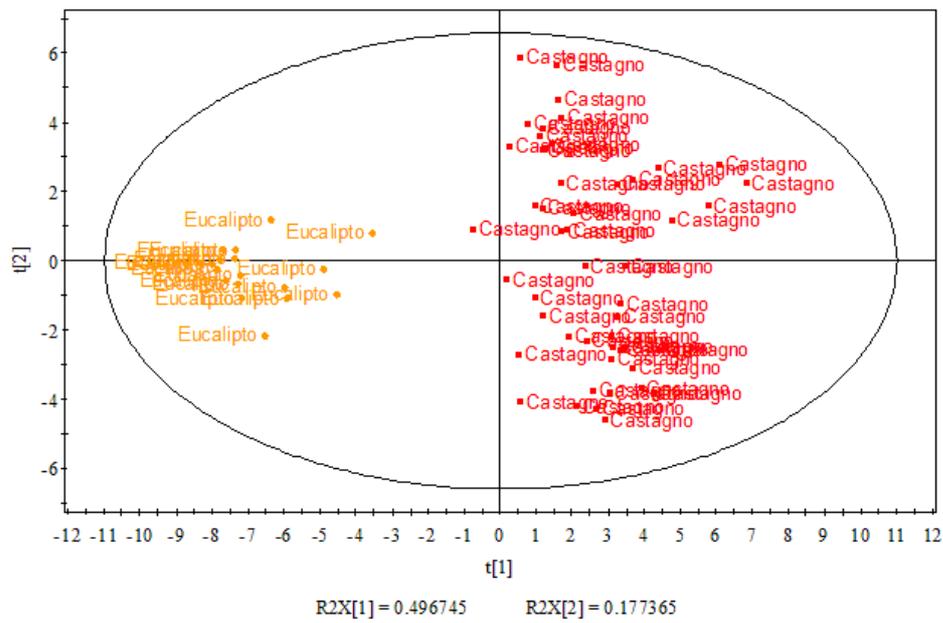


Fig. 4.29: score plot PCA relativo al confronto eucalipto-castagno.

Lo score plot (**Fig. 4.29**) evidenzia un'ottima separazione tra le due origini botaniche secondo le componenti principale ed una varianza totale del modello per le prime due componenti principali elevata pari a 67.4%.

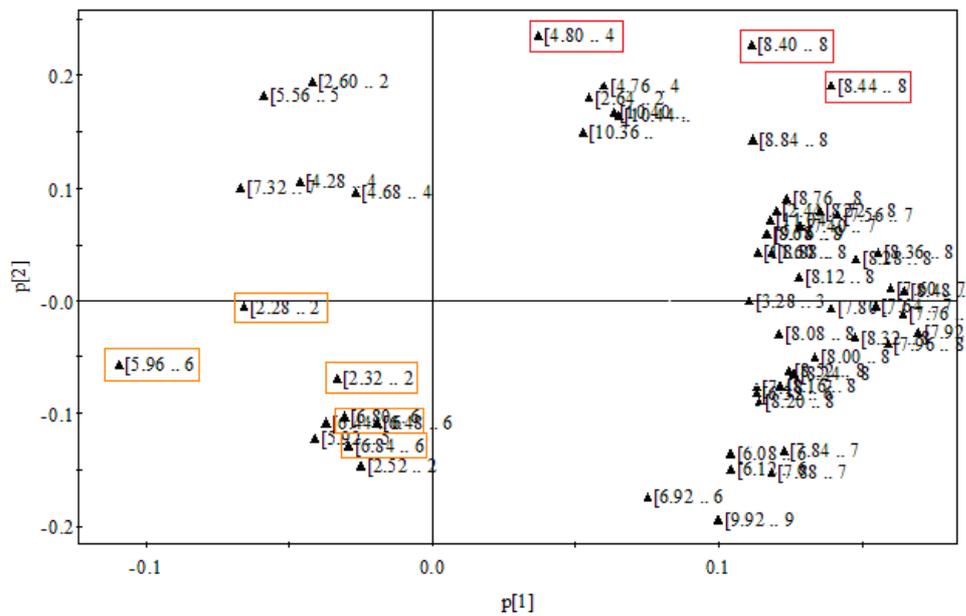


Fig. 4.30: loading plot PCA relativo al confronto eucalipto-castagno, evidenziate le risonanze dei relativi marker.

Osservando il loading plot (**Fig. 4.30**) è possibile riconoscere delle risonanze caratteristiche per le due specie: in realtà tutte quelle presenti sono importanti ma più alto è il loro loading più pesano nell'analisi statistica.

I campioni di miele di castagno dell'industria Rigoni si raggruppano nella zona indicata in **Fig. 4.31** dal quadrato rosso. Dal loading plot si deduce che questi contengono una maggior quantità del marker γ -LACT-3-PKA, come era anche risultato da un confronto visivo della sovrapposizione degli spettri monodimensionali

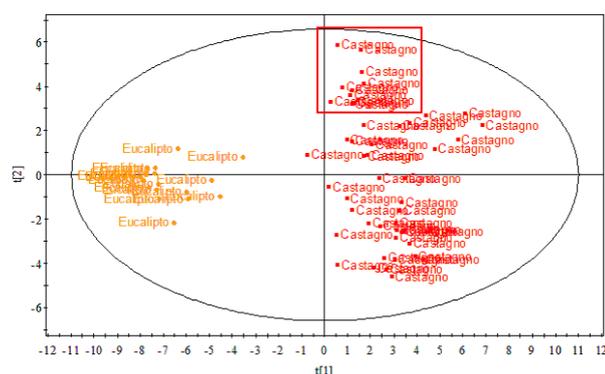


Fig. 4.31: score plot PCA relativo al confronto eucalipto-castagno, evidenziata la zona in cui cadono i campioni di miele della Rigoni

CONFRONTO EUCALIPTO-ACACIA

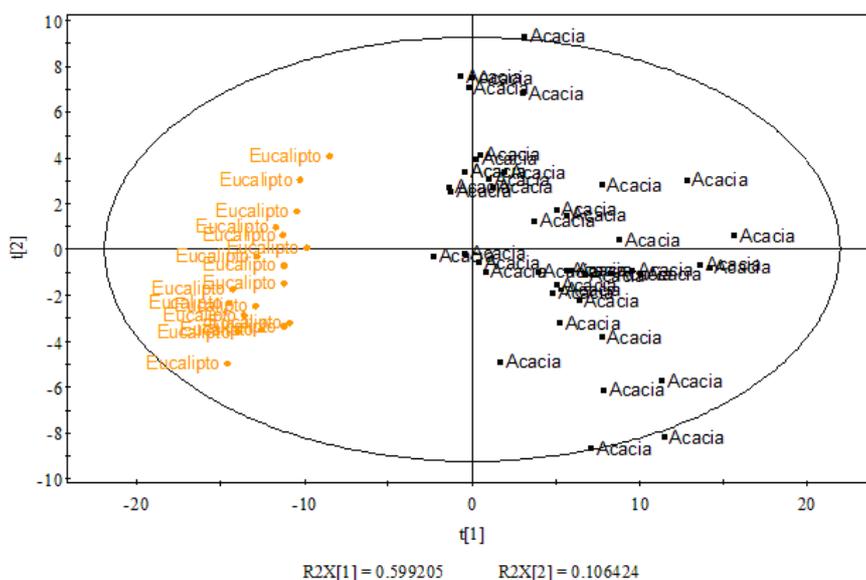


Fig. 4.32: score plot PCA relativo al confronto eucalipto-acacia.

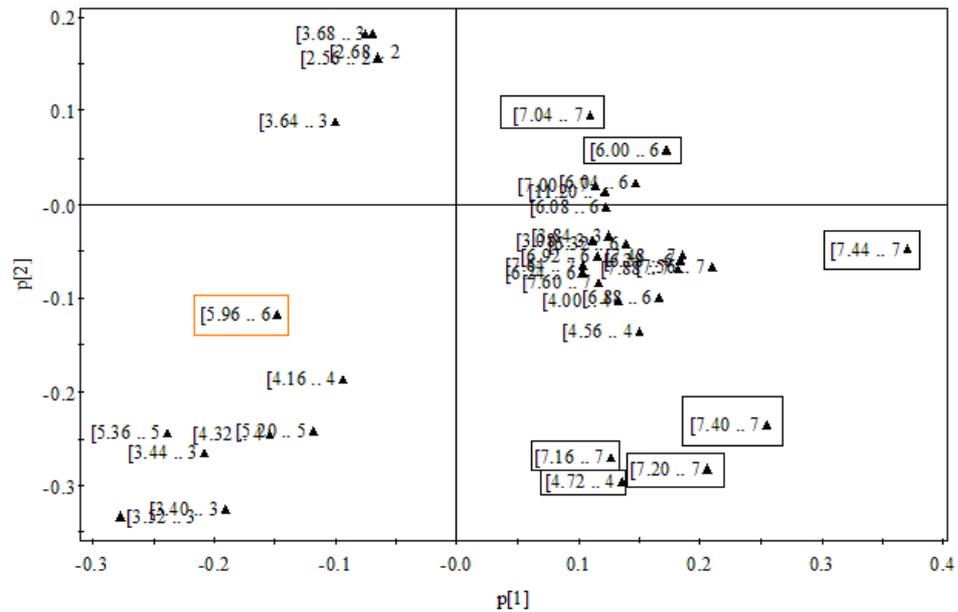


Fig. 4.33: loading plot PCA relativo al confronto eucalipto-acacia, evidenziate le risonanze del marker dell'eucalipto ed i segnali dei probabili marker dell'acacia.

Anche per queste due origini botaniche si ha una buona separazione (**Fig. 4.32**), infatti solo la prima componente principale spiega una varianza del 60% e la varianza totale è pari a 83%. Da questo confronto si può notare che l'acacia si differenzia dall'eucalipto grazie a delle risonanze derivanti da una sostanza aromatica. Precisamente, gli integrali, evidenziati con il rettangolo nero in **Fig. 4.33**, sono stati identificati anche in lavori precedenti come segnali molto importanti per la caratterizzazione dei mieli di acacia facendo presumere che siano dovuti ad un marker di tale origine floreale non ancora identificato.

CONFRONTO EUCALIPTO-ARANCIO

Anche in questo caso la separazione è molto buona secondo la PC₁ e la varianza totale risulta elevata pari al 70% (**Fig 4.34**).

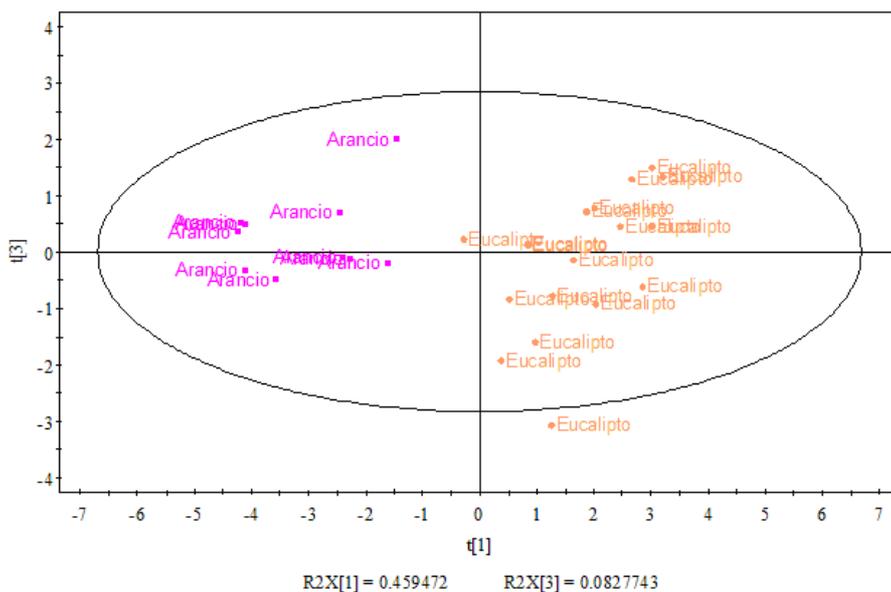


Fig. 4.34: score plot PCA relativo al confronto eucalipto-arancio.

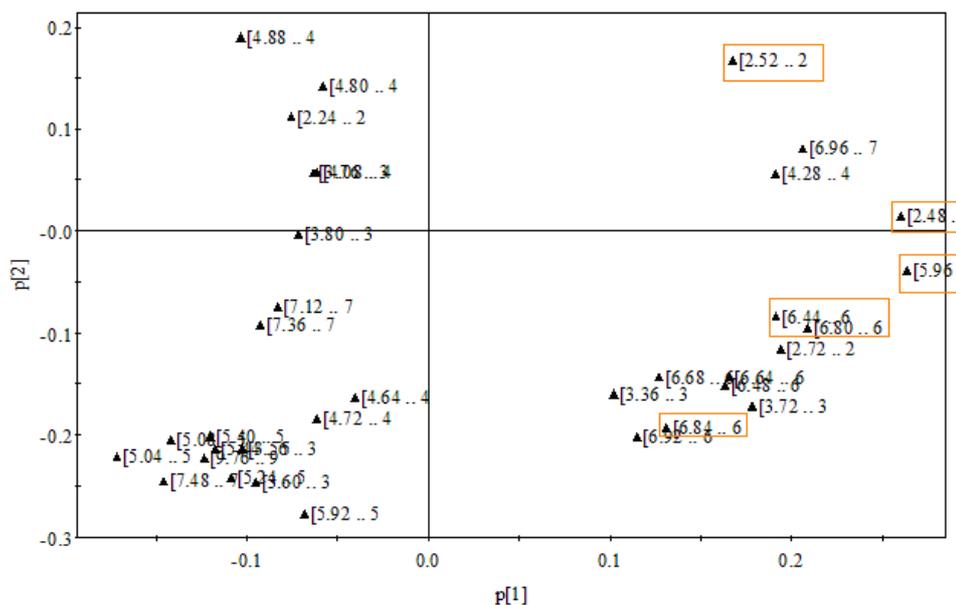


Fig. 4.35: loading plot PCA relativo al confronto eucalipto-arancia, evidenziate le risonanze del marker dell'eucalipto.

In letteratura^[51] viene riconosciuto come marker dei mieli di arancio il metilantranilato. Negli spettri ¹H-NMR, tuttavia, non sono presenti i segnali di tale molecola; può darsi che questa sia contenuta in concentrazione troppo basse per essere rilevate con la nostra procedura.

CONFRONTO EUCALIPTO-TIGLIO

Lo score plot (**Fig. 4.36**) evidenzia un'ottima separazione tra le due origini botaniche con una varianza elevata (80.9%). La prima componente principale spiega da sola già il 68.2% della varianza.

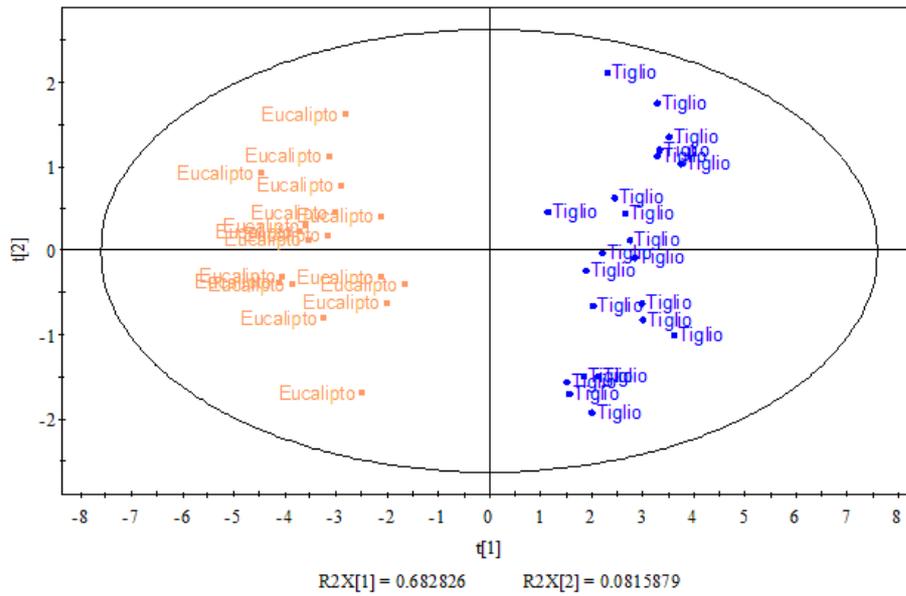


Fig. 4.36: score plot PCA relativo al confronto eucalipto-tiglio.

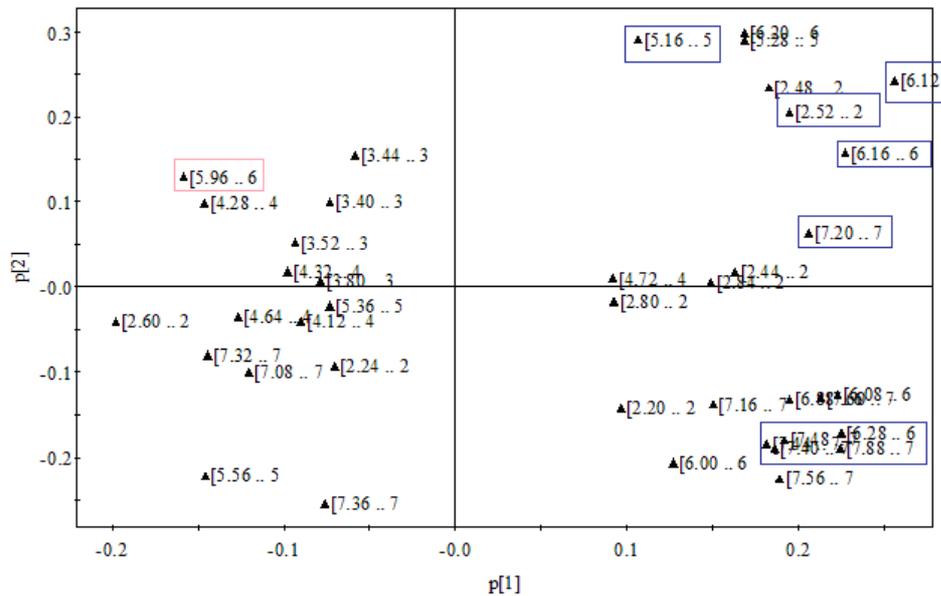


Fig. 4.37: loading plot PCA relativo al confronto eucalipto-acacia, evidenziate le risonanze del marker dell'eucalipto e del tiglio.

Le risonanze evidenziate con i rettangoli blu in **Fig. 4.37** derivano da due molecole presenti esclusivamente nel tiglio. Queste, identificate in un lavoro di tesi precedente, come l'acido 4-(1-idrossi-1-metiletil)cicloesa-1,3-diene-1-carbossilico e l'acido 4-(1-metiletilene)cicloesa-1,3-diene-1-carbossilico, trovano conferma in letteratura^[10] nella quale vengono assegnate proprio come composti markers del miele di tiglio. Il tiglio dei colli Euganei si differenzia da quello proveniente da altre regioni essendo più povero nei markers (**Fig. 4.38**).

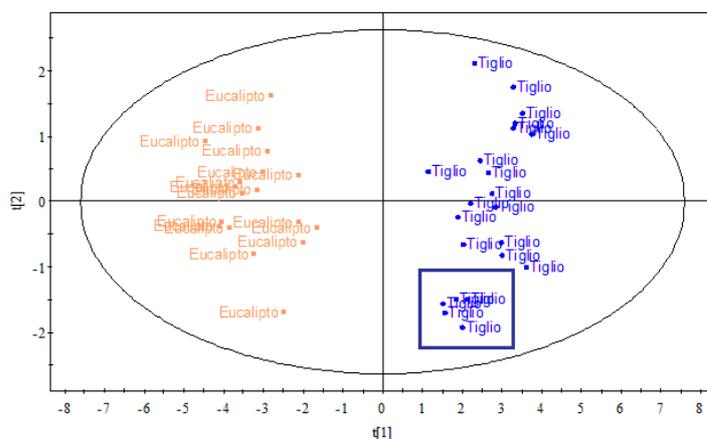


Fig. 4.38: score plot PCA relativo al confronto eucalipto-tiglio, evidenziata la zona in cui cadono i campioni di miele dei colli Euganei.

CONFRONTO EUCALIPTO-MILLEFIORI

Anche in questo confronto la separazione risulta ottimale e la varianza del modello risulta comunque alta (68.8%, **Fig. 4.39**).

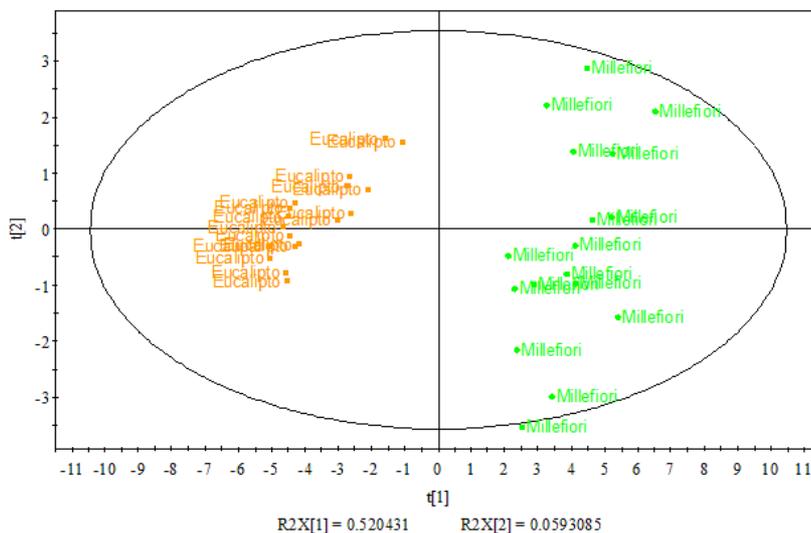


Fig. 4.39: score plot PCA relativo al confronto eucalipto-millefiori.

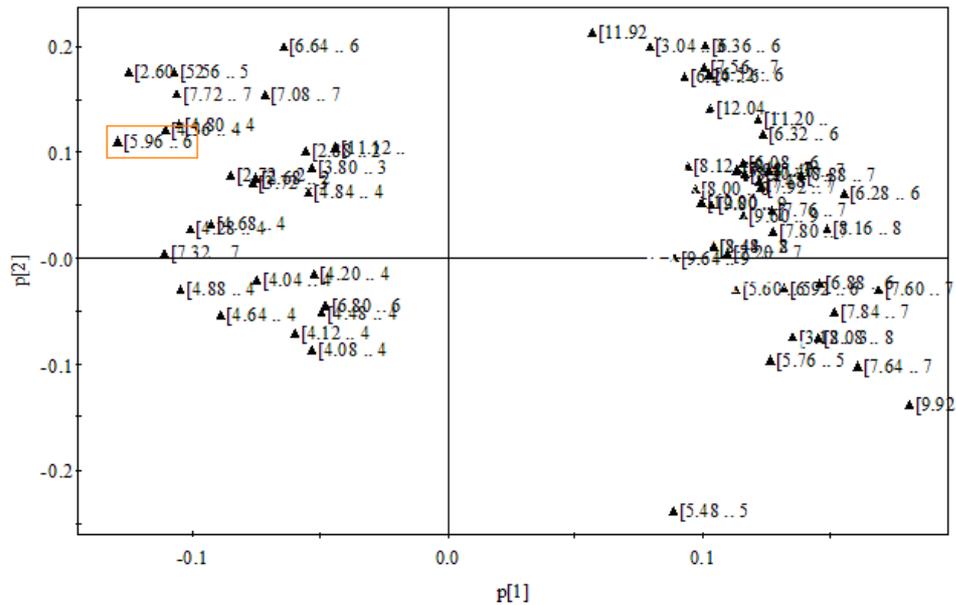


Fig. 4.40: loading plot PCA relativo al confronto eucalipto-millefiori, evidenziate le risonanze del marker dell'eucalipto.

Nei loading plots l'integrale, appartenente al DHV, che determina la separazione dagli altri tipi di mieli è quello a 5.96 ppm corrispondente al protone 4.(Fig. 4.22 e Tab 4.3).

CREAZIONE DEL MODELLO FINALE

Il lavoro svolto è servito ad ottenere un set di risonanze che ha permesso la creazione di un modello che sia in grado di distinguere le origini botaniche sia con l'analisi PCA sia con la PLS-DA.

Sono stati eseguiti due approcci che permettano una classificazione dei campioni. Il primo si basa sul metodo detto *DModX* (Distance to the Model). Ogni classe di osservazioni viene modellata separatamente da modelli disgiunti di PCA. Basandosi sulla varianza residua di ciascuna classe viene calcolato il *DmodX* per ogni osservabile.

Il secondo si basa sulla PLS-DA nella quale viene assegnata a priori la classe di appartenenza delle osservabili; essa viene elaborata dalle PCA. Questo metodo è ottimale fino ad un numero massimo di 4 classi ed il software SIMCA-P consiglia l'utilizzo del metodo *DmodX* qualora si analizzi un numero di classi superiore. Tuttavia nel nostro caso il metodo ha dato buoni risultati anche con 6 classi.

DModX

I grafici seguenti rappresentano dei *DModX* plots nei quali è visibile una linea che rappresenta il limite critico calcolato con un intervallo di confidenza di 0.95 e indica quanto bene un'osservabile è descritta da quel modello. Valori di *DModX* maggiori del limite critico indicano che il soggetto devia nello spazio X e quindi non è ben rappresentato dal modello. A tal scopo è stato calcolato *DModX* delle PCA costruite per ogni classe per ciascun'osservabile.

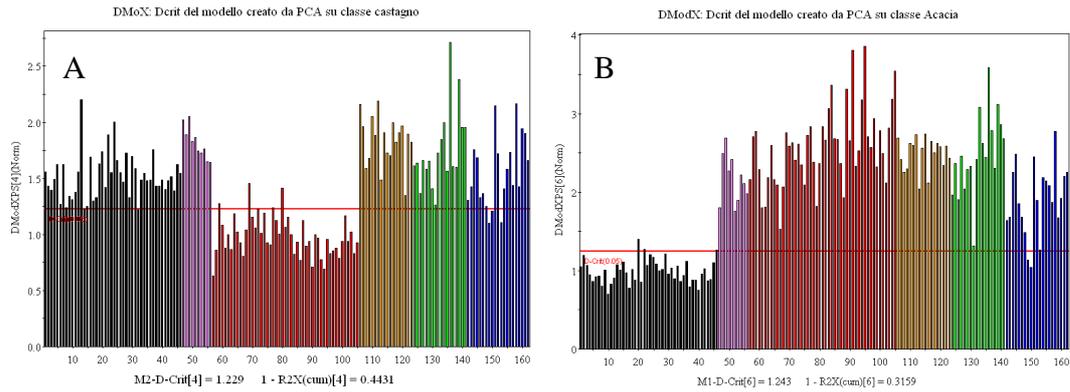


Fig. 4.41: *DModX* delle PCA per le classi castagno (A) e acacia (B).

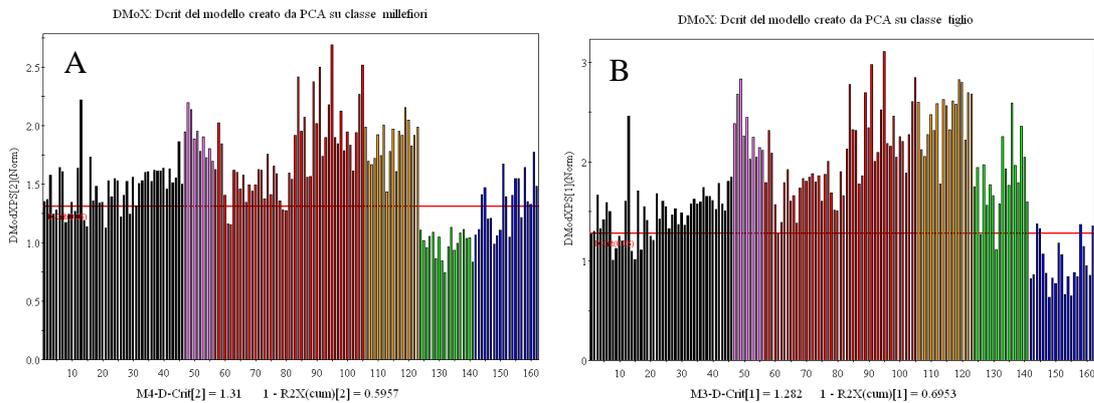


Fig. 4.42: *DModX* delle PCA per le classi millefiori(A) e tiglio (B).

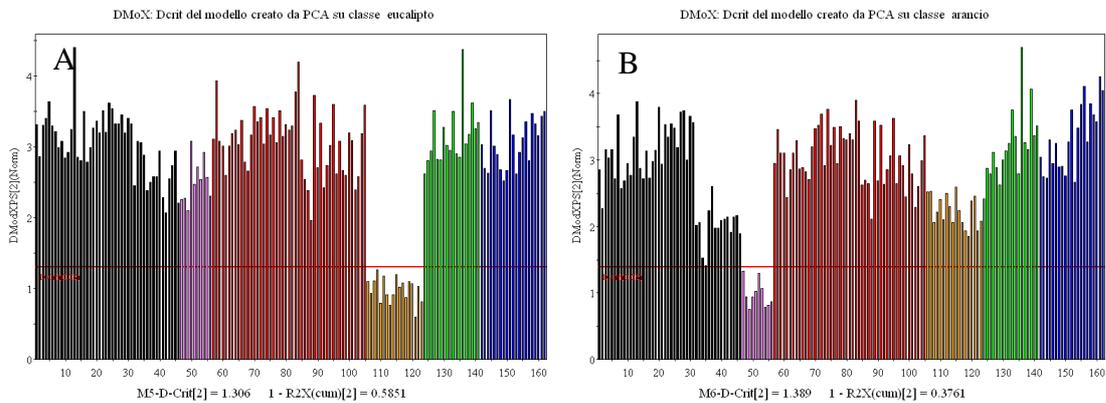


Fig. 4.43: *DModX* delle PCA per le classi eucalipto (A) ed arancio (B).

Nel grafico di **Fig. 4.41A** si può osservare come il modello delle PCA costruito sui campioni appartenenti alla classe castagno riconoscano abbastanza bene i corrispondenti tipi di miele rispetto agli altri: tre campioni di castagno presentano un Dcritico maggiore della soglia (sono dei falsi negativi) e tre campioni di tiglio risultano falsi positivi. Come si può notare nel grafico **Fig. 4.42B**, eccetto due tigli falsi positivi ed un'acacia falso negativo, il modello delle PCA costruito sui campioni appartenenti alla classe acacia risulta avere una buona specificità.

Nella **Fig. 4.42A** è rappresentato il modello basato sulle PCA dei millefiori. Questo non è molto esemplificativo. Nel caso del millefiori tutti i campioni vengono sì predetti all'interno della distanza critica, ma ce ne sono molti delle altre origini che vengono classificati in questa classe. Nel caso del tiglio (**Fig. 4.43B**) il modello risulta poco specifico: alcuni campioni di acacia rientrano come falsi positivi.

I grafici di **Fig. 4.43** riportano i *DModX* dell'eucalipto e dell'arancio; questi modelli sono molto specifici poiché tutti i campioni vengono correttamente classificati. In **Tab. 4.4** vengono riassunte le osservazioni precedenti attraverso la "misclassification table". In particolare in questa viene calcolata la probabilità di appartenere ad un modello di PCA: quando la probabilità è superiore al 10% l'osservazione è considerata membro di quella particolare classe; quando la probabilità è inferiore al 10%, l'osservazione non appartiene al modello.

	n. di Campioni	Classe 1 Acacia	Classe 2 Castagno	Classe 3 Tiglio	Classe 4 Millefiori	Classe 5 Eucalipto	Classe 6 Arancio	No Classe
Acacia	46	42	0	0	0	0	0	4
Castagno	49	0	44	0	2	0	0	5
Tiglio	21	2	1	19	10	0	0	2
Millefiori	18	0	0	1	18	0	0	0
Eucalipto	18	0	0	0	0	18	0	0
Arancio	10	0	0	0	0	0	10	0

Tab. 4.4: misclassification table.

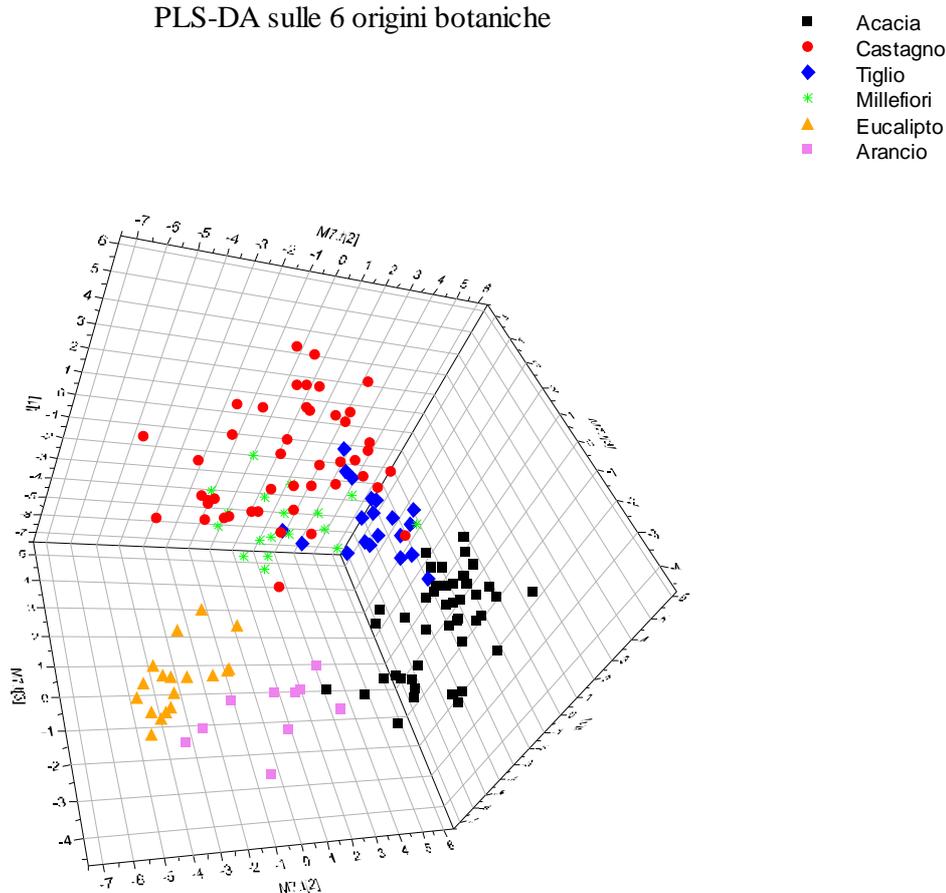
Con questo modello sono correttamente classificati il 93 % dei campioni del training set.

PLS-DA

Per migliorare ulteriormente la classificazione dei campioni analizzati si è proceduto con l'analisi PLS-DA. Per visualizzare al meglio la separazione tra le classi ottenuta con la PLS-DA, si riporta il loading plot considerando anche la terza componente (**Fig. 4.44**). Questa risulta, nonostante l'elevato numero di classi cui è applicata, molto efficace nella clusterizzazione. Infatti il programma fornisce un coefficiente di correlazione R^2 di 0.699 su X e di 0.875 su Y ed un indice di predizione Q^2 di 0.760 molto buoni.

Visivamente non è risolutivo ma la capacità predittiva del modello è stata testata tramite la *misclassification list* (Tab. 4.5): il programma assegna alle osservabili, cioè ad ogni classe, un coefficiente y che rappresenta l'appartenenza a questa. Nella *classification list* i campioni vengono classificati in una classe se la y di questa è maggiore di 0.5; se è presente una classe con indice y compreso tra 0.5 e 0.3 questa risulta essere non trascurabile e quindi viene indicata; se per una determinata classe si ha y minore di 0.3 si considera la non appartenenza a tale classe.

PLS-DA sulle 6 origini botaniche



SIMCA-P 11 - 9/15/2009 3:34:36 PM

Fig. 4.44: 3D score plot del modello finale relativo alla PLS-DA di tutte le origini botaniche. $R^2X = 0.699$, $R^2Y = 0.875$, $Q^2 = 0.76$.

CLASSI	N° campioni	Correttamente Classificati	Altra Classe Non Trascurabile
Acacia	46	46	-
Castagno	49	49	1 (acacia)
Tiglio	21	21	3 (acacia)
Arancio	10	10	
Eucalipto	18	18	1 (castagno)
Millefiori	18	18	1 (acacia); 1 (tiglio)

Tab. 4.5: classificazione dei campioni usati per il test set.

In seguito si è validato il modello con un test set contenente 12 campioni di miele da supermercato o forniti direttamente dall'apicoltore e campioni di arancio filtrati (**Tab. 4.6**).

Codice Campione	Classe da Modello	Origine Dichiarata
C-02	Castagno	Castagno
C-04	Castagno	Castagno
A-03	Acacia	Acacia
A-07	Acacia	Acacia
T-01	Tiglio	Tiglio
M-01	Millefiori	Millefiori
M-02	Millefiori	Millefiori
M-03	Millefiori	Millefiori
M-04	Millefiori	Millefiori
A-06	Agrumi	Arancio
LEDO4	Arancio	Arancio
COST3	Arancio	Arancio

Tab. 4.6: classificazione da modello e dichiarata di 12 campioni di miele (codice vedi **Tab. 6.2**).

Si nota che tutti i campioni sono stati classificati come da etichetta. Il campione di agrumi è stato visto come un arancio a causa della mancanza della classe specifica. Da questo consegue che il modello creato ha una capacità predittiva del 100 %.

Si riporta in **Fig. 4.45** il grafico VIP (*variable importance in projection*), ottenuto del modello della PLS-DA, che ordina le variabili che mostrano maggior influenza sul valore del coefficiente y.

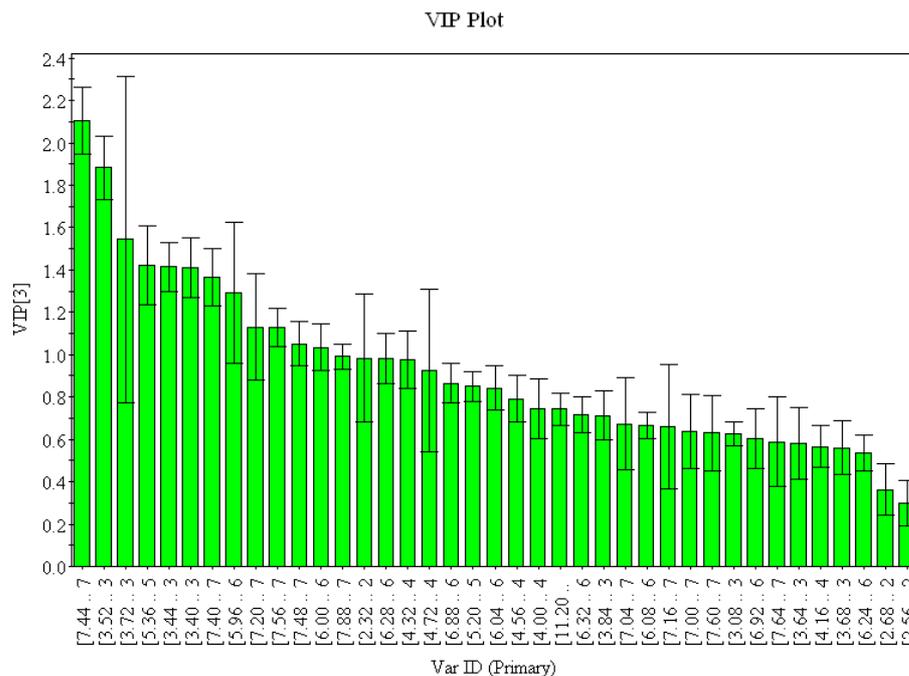


Fig. 4.45: VIP plot.

OSSERVAZIONI

Tutti i campioni di miele, forniti dall'industria Rigoni, presentano sempre, nello spettro NMR, dei segnali appartenenti ad una molecola, probabilmente un estere alifatico (δ 4.04, **Fig. 4.46**) non ancora identificato. Questi segnali sono particolarmente intensi ma fortunatamente non disturbano l'analisi statistica.

I primi campioni di arancio derivanti dalla raccolta 2008, dopo la procedura di estrazione, presentano una sostanza poco solubile in cloroformio deuterato, rendendo così impossibile l'analisi NMR. Gli spettri sono stati acquisiti solo dopo una filtrazione e questi campioni sono stati inseriti ugualmente nel test set. Nonostante la differente procedura questi vengono correttamente classificati.

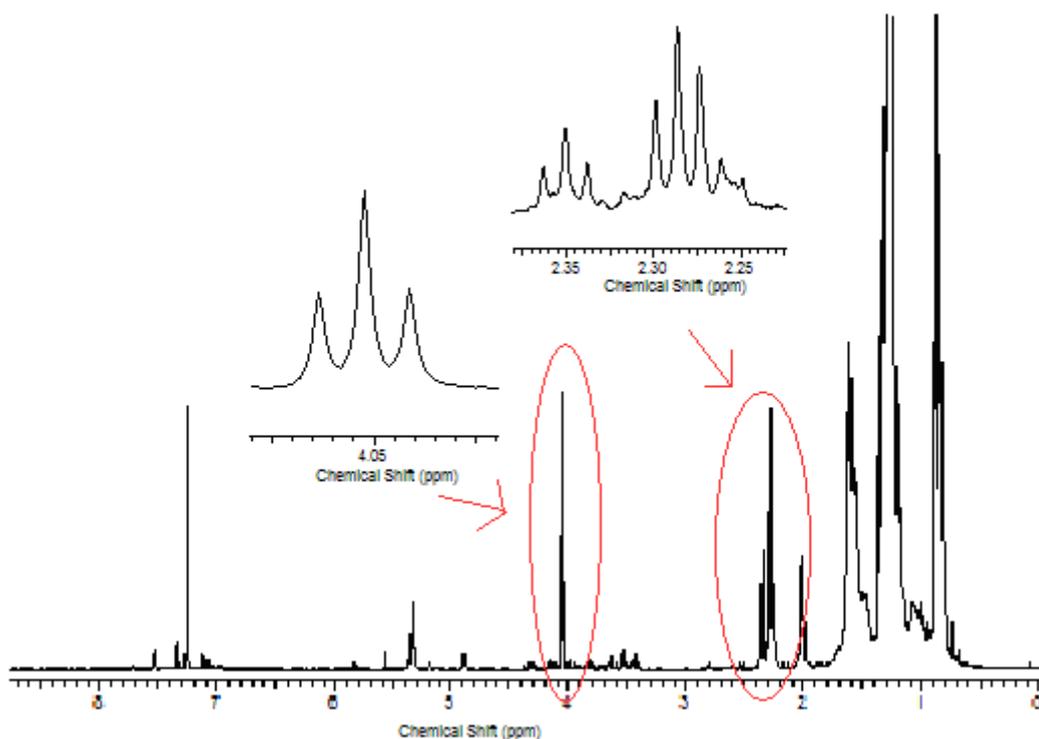


Fig. 4.46: spettro $^1\text{H-NMR}$ di un campione di arancio del primo lotto, con l'ingrandimento dei segnali del probabile estere alifatico.

CONCLUSIONI

Lo studio effettuato attraverso l'elaborazione degli spettri NMR mediante il software ACD\labs e sulla base dell'analisi statistica multivariata (PLS-DA) ha portato alla creazione di un modello che è in grado di distinguere e classificare i campioni di miele in base alla loro origine botanica con una capacità predittiva del 100%.

Il metodo risulta molto semplice, rapido ed affidabile. La procedura di estrazione richiede un'ora per otto campioni mentre l'acquisizione ed analisi degli spettri richiede circa trenta minuti. I tempi di analisi risultano paragonabili o addirittura migliori se paragonati con altre tecniche. Lo spettro NMR dell'estratto organico così ottenuto rappresenta una sorta di "fingerprint" del campione ed i dati che si estraggono da esso sono in grado di distinguere le diverse origini botaniche. Altri metodi, rappresentati in letteratura, si basano su un'analisi statistica di parametri ottenuti da diverse misure ottenute con metodi tra loro indipendenti (§1.2.5, §1.2.6) che causano un aumento dei tempi di analisi e dei costi. Mancando uno studio specifico riguardo l'origine geografica del miele questo potrebbe essere una proposta per tesi future.

L'identificazione e la caratterizzazione del marker del miele di castagno ha impiegato molto parte del mio lavoro di tesi a causa di molte difficoltà derivanti dal fatto che la molecola non risultava ancora individuata in letteratura. Purtroppo, contemporaneamente all'identificazione della molecola, è uscito un articolo che ci ha preceduto. Questo non toglie niente al lavoro svolto, anzi ne conferma la validità. Inoltre sono state identificate altre due sostanze presenti nell'estratto.

La ricerca del marker del miele di eucalipto è stato molto più veloce rispetto al precedente. Il dehydrovomifoliol comunque non è specifico per il miele di eucalipto perché era già stato identificato nel miele di erica. Inoltre sia per il miele di castagno che per quello di eucalipto sono state identificate e parzialmente isolate altre molecole probabili markers; l'identificazione sarà oggetto del prossimo lavoro di tesi.

PROCEDURA SPERIMENTALE

STRUMENTAZIONE

SPETTRI NMR

Gli spettri NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro BRUKER AVANCE DMX 600 operante a 600.01 MHz per il protone e con probe a gradienti. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati alla temperatura di 298 K con un flusso di azoto di 400 l/h. Il software utilizzato inizialmente è XWINNMR 2.6, poi sostituito da TOPSPIN.

Le condizioni sperimentali utilizzate per esperimenti 1D ¹H-NMR per l'analisi statistica sono riportate in **Tab. 6.1**



Fig. 6.1: NMR 600 BRUKER

Esperimento	NS	TD	D1 (sec)	SW (ppm)	PL9 (db)	RG	t (min,s)
Sequenza selettiva	256	64 k	2	13.982	100	4096	25' 45"

Tab. 6.1: parametri impostati per la sequenza selettiva.

I parametri per l'acquisizione degli spettri NMR mono e bidimensionali per lo studio del marker sono stati modificati di volta in volta, in base alla concentrazione e alla purezza, per ottimizzare l'analisi.

La fase di processamento degli spettri protonici monodimensionali è stata ottimizzata e utilizzata per tutti gli spettri in modo tale da favorire la riproducibilità della determinazione, utilizzando il software ACD/labs.

Prima di effettuare la trasformata di Fourier s'impostano alcuni parametri utili per l'elaborazione: si esegue lo Zero Filling del FID fino ad ottenere un numero di punti pari a 262144 in modo d'aumentare la risoluzione digitale e si applica una funzione finestra esponenziale definita dal parametro LB (0.50 Hz). In seguito si effettua la trasformata di Fourier, si fasa lo spettro, si corregge la linea di base (cercando di utilizzare sempre gli stessi punti) e si esegue una calibrazione sul cloroformio (7.27 ppm). Si escludono le regioni che non interessano (la zona del cloroformio, la zona a $\delta > 13$ e a $\delta < 2.16$) e si fa l'integrazione. Quest'ultima, per rendere riproducibile l'analisi, è una Bucket integration, cioè un'integrazione standard d'intervalli definiti, effettuata automaticamente dal software

indipendentemente dai segnali presenti (opzioni: width of bucket 0.04 ppm; all integral 1000). I valori degli integrali così ottenuti sono stati inseriti in un foglio di excel.

CENTRIFUGAZIONE

La centrifugazione è stata fatta utilizzando una centrifuga Allegra™ 25R centrifuge BECKMAN COULTER. Si è operato utilizzando i seguenti parametri: rpm 10000; rotor A-10; time 15; accel. 9; temp. 5 °C.



Fig. 6.2: centrifuga Allegra™ 25R

MISURE DI MASSA

Gli esperimenti di spettrometria di massa sono stati effettuati utilizzando uno spettrometro LC/MSD Trap SL dell'Agilent Technologies e analizzatore di massa a trappola ionica e filtro a esapolo. Si è operato mediante infusione diretta di una soluzione 1:1 di acetonitrile e acqua + 1% HCOOH del campione sciolto in metanolo.

ANALISI IR, UV-Vis E CD

Lo spettro IR è stato registrato con uno spettrometro Perkin Elmer – FT-IR 1720X ed elaborato con i programmi GRAMS32 e SPECTRACALL, è stata utilizzata una cella CaF₂ di 1 mm. Lo spettro CD è stato registrato con uno spettrometro JASCO – J715. Lo spettro UV-Vis è stato registrato con uno spettrometro SHIMADZU UV-2501PC. Gli spettri sono stati acquisiti su una soluzione dell'analita in cloroformio o metanolo.

MATERIALI

I solventi e i reattivi impiegati, perlopiù cloroformio, sono prodotti commerciali e sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

Per gli spettri NMR sono stati utilizzati solventi deuterati, commercialmente disponibili. Per le spettrometrie sono stati utilizzati solventi per HPLC.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

CAMPIONI PER L'ANALISI STATISTICA

I campioni studiati in analisi statistica sono preparati utilizzando il seguente metodo. Si pesano 6 g di miele in un provettone di plastica da 50 mL; a questi si aggiunge 15 mL di acqua distillata e, dopo aver sciolto il miele, si aggiunge 15 mL di cloroformio. È molto importante versare nel provettone prima l'acqua, che serve a sciogliere bene tutta la sostanza, e dopo il cloroformio; in tal modo si ottiene una buona separazione delle fasi, nelle quali saranno distribuiti i vari componenti presenti nel miele in base alla loro affinità con l'uno o con l'altro solvente. È stato verificato che non è possibile estrarre le sostanze organiche dal miele trattandolo direttamente con cloroformio.

Dopo l'aggiunta del cloroformio si mescolano le due fasi agitando manualmente e in seguito si mettono in un agitatore meccanico per 15 minuti; in questa fase di mescolamento si crea un'emulsione che viene rotta mettendo il campione in centrifuga per 15 minuti. Si ottengono 2 fasi separate da un sottile strato di cere che si deve aver cura di non portare nel campione da analizzare. Per estrarre la fase organica si buca il fondo del provettone e si raccolgono 10 mL di soluzione (come se fosse un imbuto separatore). In seguito si evapora il cloroformio sotto flusso d'azoto e si porta l'estratto a completa secchezza. Questo si scioglie in 600 μ L di cloroformio deuterato (prelevati con una pipetta tarata Nichipetex 1000 μ L) e trasferito in un tubo NMR. Quest'ultima operazione viene fatta poco prima dell'analisi in modo da evitare l'evaporazione del solvente e l'ingresso di umidità. I tubi non vengono sigillati perché si è osservato che alcune sostanze fotosensibili vengono degradate con questa procedura.

ESTRAZIONE DEI MARKERS

La procedura di estrazione è simile a quella del paragrafo precedente. Precisamente l'estrazione è stata ottenuta da circa 22 g di miele diviso in tre aliquote. Le estrazioni di queste sono state fatte utilizzando la stessa fase organica al fine di ottenere un estratto più concentrato.

In seguito si riporta il metodo finale di purificazione; è stato scelto dopo vari tentativi, al fine di ottimizzare la separazione e perdere la minor quantità di analita. Questo è stato applicato sia per l'isolamento del marker del castagno che dell'eucalipto.

Prima si verifica, attraverso TLC, che la sostanza corra con una soluzione al 5% di CH₃OH in cloroformio (la sostanza si vede all'UV). In seguito si eseguono due colonne in gel di silice (6 cm³) utilizzando come eluente un gradiente di metanolo in cloroformio. La silice viene più volte lavata con cloroformio e, preparata la colonna, si carica l'estratto. Si utilizza il seguente gradiente: 50 mL di CHCl₃, 15 mL di CHCl₃ + 0.5% CH₃OH; 15 mL di CHCl₃ + 1% CH₃OH; 25 mL di CHCl₃ + 2% CH₃OH. Le frazioni estratte vengono portate a secco con azoto e si analizzano con l'¹H-NMR; le frazioni della prima colonna contenente l'analita ricercato vengono ulteriormente purificate in una seconda colonna.

Nel caso del miele di castagno, partendo da 600 g, sono stati ottenuti 5 mg di marker, che si presenta come un solido giallognolo, con una purezza superiore dell'80% e 3.5 mg con una purezza intorno al 50%. La molecola può essere purificata in cloroformio; in quest'analisi, tuttavia, non è stato necessario ricorrere a tale metodo.

ANALISI STATISTICA

I campioni di miele delle varie origini botaniche (acacia, tiglio, castagno, millefiori, eucalipto, arancio, agrumi; annata 2008), che sono stati estratti, elaborati e analizzati con ACD e SIMCA-P, sono riportati nella seguente tabella (**Tab. 6.2**).

Codice	Apicoltore o azienda	Zona di provenienza	Tipo di miele
C-02	Ballone Franco	Padova	Castagno
A-06	Zafferana Etnea	Catania	Agrumi
C-04	Margotto Luciano	Padova (colli)	Castagno
E-05	Zafferana Etnea	Catania	Eucalipto
A-03	Norbato Carlo	Vigodarzere	Acacia
T-01	Bravape	Padova (colli)	Tiglio
A-07	Mielizia		Acacia
M-01	Rigoni	Asiago	Millefiori
M-02	Ambrosoli	Ronago	Millefiori
M-03		Lituania	Millefiori
M-04	A. Darbo	Austria	Millefiori
CAAL	R - Coco A.	Sicilia	Eucalipto
COSA	R - Coco S.	Sicilia	Eucalipto
COST	R - Coco S.	Sicilia	Eucalipto
LICA	R - Licardi	Sicilia	Eucalipto
TORR	R - Torrisi	Sicilia	Eucalipto
FARO	R - Faro	Sicilia	Eucalipto

Determinazione dell'origine botanica del miele

BONG	R - Bongiorno	Sicilia	Eucalipto
PATA	R - Patanè	Sicilia	Eucalipto
GRAS	R - Grasso	Sicilia	Eucalipto
TOGIU	R - Tomarchio G.	Sicilia	Eucalipto
RUGIU	R - Russo G.	Sicilia	Eucalipto
LEAL	R - Leonardi A.	Sicilia	Eucalipto
AGA	R - D'Agata	Sicilia	Eucalipto
LORE	R - Lorenzo	Sicilia	Eucalipto
MARI	R - Marino	Sicilia	Eucalipto
TOSA	R - Tomarchio S.	Sicilia	Eucalipto
RINO	R - Rino	Sicilia	Eucalipto
CAVA	R - Cavallaro	Sicilia	Eucalipto
PATA	R - Patanè	Sicilia	Arancio
LEDO4'	R - Leonardi D.	Sicilia	Arancio
LEDO2	R - Leonardi D.	Sicilia	Arancio
LEAL1	R* - Leonardi A.	Sicilia	Arancio
LEAL	R - Leonardi A.	Sicilia	Arancio
LEDO1	R* - Leonardi D.	Sicilia	Arancio
LEDO2	R* - Leonardi D.	Sicilia	Arancio
LEDO3	R* - Leonardi D.	Sicilia	Arancio
LEDO5	R* - Leonardi D.	Sicilia	Arancio
PATA	R* - Patanè	Sicilia	Arancio
COST3'	R - Coco S.	Sicilia	Arancio
APA	R - Apostolo L.A	Novara	Acacia
APIM	R - Apostolo L.IM	Novara	Acacia
APU	R - Apostolo L.U	Novara	Acacia
APCM	R - Apostolo L.CM	Novara	Acacia
APVA	R - Apostolo L.VA	Novara	Acacia
AP00	R - Apostolo L.OO	Novara	Acacia
CA84	R - Cauda 284	Cuneo	Acacia
CA83	R - Cauda 283	Cuneo	Acacia
SCOL	R - Scolari	Arezzo	Acacia
ABRA	R - Abrate	Cuneo	Acacia
AGA	R - Agazzoni	Novara	Acacia
CAMI	R - Casa del Miele	Rimini	Acacia
SOLDA	R - Soldavini	Varese	Acacia
AGOS	R - Agostini	Belluno	Acacia
CA38	R - Cauda 38	Cuneo	Castagno
BORT	R - Bortolato	Perugia	Castagno
ABRA	R - Abrate	Cuneo	Castagno

Determinazione dell'origine botanica del miele

ARA	R - Ara	Ravenna	Castagno
GRAS	R - Grassone	Torino	Castagno
ZUCC	R - Zuccari	Arezzo	Castagno
LEDO	R - Leonardi D.	Sicilia	Castagno
CRIS	R - Cristaudo	Sicilia	Castagno
CAVA	R - Cavallaro	Sicilia	Castagno
TORR	R - Torrisi	Sicilia	Castagno
MARI	R - Marino	Sicilia	Castagno
PASA	R - Pappalardo S.	Sicilia	Castagno
DAAN	R - D'Agata	Sicilia	Castagno
CAAN	R - Cavallaro A.	Sicilia	Castagno
TOGIU	R - Tomarchio G.	Sicilia	Castagno
PAAL	R - Pappalardo A.	Sicilia	Castagno
LICA	R - Licardi	Sicilia	Castagno
COSA	R - Coco S.	Sicilia	Castagno
COST	R - Coco S.	Sicilia	Castagno
PASA	R - Pappalardo S.	Sicilia	Castagno
SALE	R - Salemi	Sicilia	Castagno
VAAL	R - Vasta A.	Sicilia	Castagno

Tab. 6.2: *origine botanica, geografica ed apicoltore dei campioni di miele analizzati. R abbreviazione di industria Rigoni; R* miele appartenente al secondo lotto, consegnato dalla Rigoni a settembre 2009; ‘ sono stati filtrati o variato il parametro rg.*

Bibliografia

- [1]: Conti M.E., Stripeikis J., Campanella L., Cucina D., Tudino M.B., **“Characterization of Italian honey (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical qualità parameters”** *Chemistry Central Journal* (2007)
- [2]: Bonvehi S.J., **“Physicochemical characteristics and composition of eucalyptus honey produced in Spain”**, *Anales De Bromatologia* (1989), 41-56
- [3]: Devillers J., Doré J. C., Marengo M., Poirier-Duchêne F., Galand N., Viel C., **“Chemometrical Analysis of 18 Metallic and Nonmetallic Elements Found in Honeys Sold in France”** *J. Agric. Food Chemistry* (2002), 50, 5998-6007
- [4]: Sevimli H., Bayulgem N, **“Determination of trace elements in honey by INAA (instrumental neutron activation analysis) in Turkey”**, *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (1992), 165, 319-325
- [5]: Gonzalez-Miret M. L., Terrab A., Hernanz D., Fernandez-Recamales M. A., Heredia F. J., **“Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin”** *J. Agric. Food Chemistry* (2005), 2574-2580
- [6]: Rashed M. N., Soltan M.E., **“Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys”**, *Journal of Food Composition and Analysis* 17 (2004), 725-735
- [7]: Iglesias M. T., De Lorenzo C., Del Carmen Polo M., Martín-Álvarez P. J., Pueyo E., **“Usefulness of Amino Acid Composition to Discriminate between Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area”**, *J. Agric. Food Chemistry* (2004), 52, 84-89
- [8]: Guyot C., Bouseta A., Scheirman V., Collin S., **“Floral Origin Markers of Chestnut and Lime Tree Honeys”**, *J. Agric. Food Chemistry* (1998), 46, 625-633
- [9]: Bonvehi S.J., Coll F. V., **“Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys”**, *J. Sci. Food Agric.* (2003), 83, 275-282
- [10] Frérot E., Velluz A., Decorzant E., Naef R. **“From Linden Flower to Linden Honey”**, *Chemistry & Biodiversity – vol. 3* (2006), 94-100
- [11]: Viñas P., Soler-Romera M. J., Hernández-Córdoba M., **“Liquid chromatographic determination of phenol, thymol and carvacol in honey using fluorimetric detection”**, *Talanta* (2006)

- [12]: Tomás-Barberán F. A., Ferreres F., García-Viguera C., Tomás-Lorente F., **“Flavonoids in honey of different geographical origin”**, *Z Lebensm Unters Forsch* (1993), 196, 38-44
- [13] *Gazzetta Ufficiale N. 185 del 11 Agosto 2003* **“Approvazione dei metodi ufficiali di analisi da applicarsi per la valutazione delle caratteristiche di composizione del miele”**, decreto 25 luglio 2003
- [14]: Gonzalez-Miret M. L., Terrab A., Hernanz D., Fernandez-Recamales M. A., Heredia F. J., **“Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin”** *J. Agric. Food Chemistry* (2005), 2574-2580
- [15] Inoue K., Murayama S., Seshimo F., Takeba K., Yoshimura Y., Nakazawa H., **“Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection”** *J. Sci. Food Agric.* (2005), 872-878
- [16] Berretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R., **“Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric assays and chemometrics”** *Anal. Chi. Acta* (2005), 185-191
- [17] Chalhoub C., Gotsius P., Lydakis-Simantiris N., Kefalas P., **“Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity”** *J. Food Sci. Nutr.* (2005), 45, 193-203
- [18] Kukuk M., Kolayh S., Ulusoy E., Baltaci C., Candan F., **“Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia”** *Food Chem.* (2005), 100, 526-534
- [19] Dongmo A. B., Miyamoto T., Yoshikawa K., Arihara S., Lacaille-Dubois M., **“Flavonoids from Acacia pennata and their cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory activities”** *Planta Med.* (2007), 73, 1202-1207
- [20] Berretta G., Caneva E., Maffei Facino R., **“Kynurenic acid in honey from arboreal plants: MS and NMR evidenci”** *Planta Med.* (2007), 73, 1592-1595
- [21]: Piana L., Persano Oddo L. **“La valorizzazione del miele - in Miele e territorio. Guida alla valorizzazione del miele attraverso le denominazioni di origine. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali”**. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, (2001), 9-21
- [22]: Persano Oddo L. **“La qualità e la valorizzazione del miele - in I mieli uniflorali italiani. Nuove schede di caratterizzazione”**. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, Roma, (2000), 11-19

- [23]: Sabatini A.G. **“Analisi del miele - in Conoscere il miele.”** Edizioni Avenue media. CRA Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna, (2007), 125-172.
- [24]: Mendes E., Brojo Proença E., Ferreira I.M.P.L.V.O., Ferreira M. A., **”Quality evaluation of Portuguese honey”**, *Carbohydrate Polymers* (1998), 37, 219-223
- [25]: Devillers J., Morlot M., Pham-Delegue M. H., Dore J. C., **”Classification of monofloral honeys based on their quality control data”**, *Food Chemistry* (2004), 86, 305-312
- [26]: Nalda M. J. N., Yague J. L., Calva J. C., Gomez M. T., **”Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis”** *Anal. Bioanal. Chem.* (2005), 382, 311-318
- [27]: Terrab A., Vega-Perez J. M., Diez M. J., Heredia F. J., **”Characterization of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components”** *J. Sci. Food Agric.* (2002), 82, 179-185
- [28]: Cotte J. F., Casabianca H., Giroud B., Albert M., Lheritier J., Grenier-Loustalot M. F., **”Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity”** *Anal. Bioanal. Chem.* (2004), 378, 1342-1350
- [29] Yao L., Jiang Y., Singanusong R., Datta N., Raymont K., **“Phenolic acids and abscisic acid in Australian eucalyptus honeys and their potential for floral authentication”** *Food Chem.* (2004), 86, 169-177
- [30] Radovic B.S., Careri M., Mangia A., Musci M., Gerboles M., Anklam E., **“Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey”** *Food Chem.* (2001), 72, 511-520
- [31]: Davies A. M., Radovic B., Fearn T., Anklam E. A., **“A preliminary study on the characterization of honey by near infrared spectroscopy”** *J. Near Infrared Spectroscopy* (2002), 10, 121-135
- [32] Ruoff K., Luginbuhl W., Amado R., **“Authentication of the botanical and geographical origin of honey by MIR”** *J. Agric. Food Chem.* (2006), 54, 6837-6850
- [33] Ruoff K., Luginbuhl W., Amado R., **“Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front-face spectroscopy”** *J. Agric. Food Chem.* (2006), 54, 6858-6866
- [34] Donarski J. A., Jones S. A., Charlton A. J., **“Application of cryoprobe ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the verification of Corsican honey”** *J. Agric. Food Chem.* (2008), 56, 5451-5456

- [35] Berretta G., Caneva E., Regazzoni L., Maffei Facino R., **“A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H-NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey”** *Anal. Chim. Acta.* (2008), 620, 176-182
- [36] Tomas-Barberan F. A., Martos I., Ferrerea F., Radovic B. S., Anklam E., **“HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys”** *J. Sci. Food Agric.* (2001), 81, 485-496
- [37] Rebane R., Herodes K., **“Evaluation of botanical origin of estonian uni- and polyfloral honeys by amino acid content”** *J. Sci. Food Agric.* (2008), 56, 10716-10720
- [38] Daher S., Gulacar F., **“Analysis of phenolic and other aromatic compounds in honeys by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry”** *J. Agric. Food. Chem* (2008), 56, 5775-5780
- [39] Sandusky P., Raftery D., **“Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixture: application to the metabonomics of amino acids in honey.”** *Anal. Chem.* (2005), 77, 2455-2463
- [40] Nozal M. J., Bernal J. L., Toribio L., Alamo M., Diego J. C., **“The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin”** *J. Agric. Food Chem* (2005), 53, 3095-3100
- [41] Lolli, M., Bertelli, D., Plessi M., Sabatini A.G & Restani C., **“Classification of Italian honeys by 2D-HR-NMR”** *J. Agric. Food Chem.* (2008), 56,1298-1304
- [42] Consonni R. & Cagliani L., **“Geographical Characterization of Polyfloral and Acacia Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics.”** *J. Agric. Food Chem.* (2008), 56, 6873–6880
- [43] Magon G., **“Risonanza magnetica nucleare e chemiometria applicata a miele dei colli Euganei”** (2006/2007) – Cariglia F., **“Analisi di estratti organici del miele mediante NMR e chemiometria per la determinazione dell'origine botanica”** (2007/2008)
- [44] Guido F. Paoli, **“Reviews NMR”** *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 133
- [45] A. Kumar, G. Wagner, R.R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.*, (1994), 103, 3654-3658;
- [46] Berretta G., Vistoli G., Caneva E., Orlandini S., Anselmi R., Maffei Facino R., **“Structure elucidation and NMR assignment of two pyrrolidinyl quinoline alkaloids from chestnut honey”** *Magn. Res. Chem.* (2009), 47, 456-459
- [47] Berretta G., Artali R., Caneva E., Orlandini S., Centini M., Maffei Facino R., **“Quinolone alkaloids in honey: further analytical HPLC-DAD-ESI-MS,**

multidimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy), theoretical and chemometric studies” *J. Pha. Biom. Anal.* (2009), 50, 432-439

[48] Truchado P., Martos I., Bortolotti L., Tomas-Barberan F. A., **“Use of quinoline alkaloids as markers of the floral origin of chestnut honey”** *J. Agric. Food. Chem.* (2008)

[49] Zalibera L., Milata V., Ilavsky D., **“¹H and ¹³C NMR spectra of 3-substituted 4-quinolones”** *Magn. Res. Chem.* (1998), 36, 681-684)

[50] Guyot C., Scheirman V., Collin S., **“Floral origin markers of heather honeys: calluna vulgaris and Erica arborea”** *Food. Chem* (1999), 64, 3-11

[51] Papotti G., Plessi M., Bertelli D., Sabatini A.G., **“Determinazione di metile antranilato in mieli di agrumi italiani mediante HS-SPME-GC”** poster

[52] Rastrelli F., Schievano E., Bagno A. & Mammi S., **“NMR quantification of traces componends in complex matrices by band-selective excitation with adiabatic pulses”** *Magn. Res. Chem.* (2009)

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la professoressa Elisabetta Schievano e tutto lo staff del professor Stefano Mammi... Grazie per avermi assistito ed aiutato durante questo interessante e appagante lavoro di tesi.

Ringrazio, in ritardo, lo staff del professor Paolo Maria Scrimin ed in particolare Giulio e Leonard... Grazie a loro ho deciso di continuare nella mia carriera universitaria e di non fermarmi ai 3 anni.

Ringrazio tutti i miei professori...

Ringrazio gli amici di Padova e ringrazio i miei amici di Pergine...

Anche se questi ultimi non hanno ancora capito cosa faccio.

Un ringraziamento speciale a Milena... Grazie per essermi stata vicina, per avermi aiutato e per aver corretto il mio pessimo italiano.

Un ringraziamento a me stesso... Ce l'ho fatta!

Un ringraziamento a mio padre e soprattutto un grandissimo ringraziamento a mia madre...

MAMMA, QUESTO LAVORO è DEDICATA A TE!