

Metodi cromatografici e spettroscopici nel controllo della qualità degli alimenti

Federica Pasini (email: federica.pasini5@unibo.it)

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Sede di Cesena

Ciclo di dottorato: XXIII; Anno di frequenza: III

Tutor: Prof. Maria Fiorenza Caboni.

1. Stato dell'arte

Negli ultimi anni il concetto di cibo ha subito una radicale trasformazione fino al punto da attribuire agli alimenti, oltre alle loro proprietà nutrizionali e sensoriali, anche un importante ruolo sul mantenimento della salute, sul benessere psico-fisico e sulla prevenzione di alcune patologie. Diversi sono i fattori che hanno contribuito a questa evoluzione sulla nuova interpretazione dell'alimentazione e certamente un contributo importante è derivato dalle numerose ricerche scientifiche che nell'ultimo decennio hanno evidenziato, con abbondanza di dati sperimentali, il legame stretto che esiste tra l'alimentazione e la salute. Difatti è cresciuta notevolmente l'attenzione da parte della comunità scientifica nei confronti di quegli alimenti che, per la loro particolare composizione, vengono definiti "funzionali" (*functional food*), in grado cioè di soddisfare le esigenze nutritive primarie dell'uomo e di espletare un effetto benefico sulla salute umana, associato ad una funzione preventiva nei confronti di alcune patologie degenerative dell'organismo umano, come certe tipologie di cancro e scompensi cardiocircolatori. Contemporaneamente, in campo alimentare si assiste anche ad una rivalutazione di prodotti alimentari tipici, caratterizzati da una elevata qualità organolettica ma per i quali è necessario un accurato controllo delle caratteristiche nutrizionali. Tra i vari alimenti funzionali di origine vegetale, caratteristici della Dieta Mediterranea, merita particolare attenzione l'olio extra vergine di oliva che presenta elevate qualità salutistiche e sensoriali. Infatti l'olio di oliva è caratterizzato da una composizione in acidi grassi favorevole e dalla presenza di composti secondari che svolgono un'importante azione antiossidante, i fenoli. Un altro interessante prodotto funzionale, con profonde radici nella tradizione alimentare delle popolazioni del Mediterraneo, è rappresentato dalla rucola (*Rocket salad*). Questa pianta racchiude diverse specie appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*, oggetto di molti studi per l'elevato contenuto in composti bioattivi, come i fenoli e i glucosinolati. In particolare, i glucosinolati e i loro prodotti di idrolisi (isotiocianati) suscitano grande interesse scientifico sia per le qualità salutistiche dimostrate sia per le caratteristiche sensoriali, in quanto responsabili delle note di amaro e piccante tipiche di queste piante.

Anche il grano saraceno presenta molti composti biologicamente attivi con attività antiossidante, ipotensive, anticolesterolemiche, antiglicemiche, regolatrici della funzionalità dell'intestino, antitumorali ed antimutagene. Considerando tali proprietà, il grano saraceno appare essere un potenziale ed interessante ingrediente funzionale e già molti autori studiarono il suo potere antiossidante. Dal punto di vista apistico il grano saraceno rappresenta anche un'ottima fonte nettarifera e pollinifera. Un elevato interesse per il miele di grano saraceno deriva dal contenuto di sostanze fenoliche ed che gli conferiscono un potere antiossidante particolarmente elevato. Numerosi studi clinici hanno messo in evidenza le spiccate caratteristiche antiossidanti di questo miele così come studi hanno rilevato la sua capacità anti-tosse tanto da proporlo come "alimento funzionale" per combattere la tosse, soprattutto nei bambini.

2. Bibliografia

- Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina Toschi T., Fernández-Gutiérrez A., (2005) Analytical determination of polyphenols in olive oils, *J. Sep. Sci.* 28: 837-858.
- Bennett R., Carvalho R., Mellon F. A., Eagles J., Rosa E. A. S., (2007) Identification and Quantification of Glucosinolates in Sprouts Derived from Seeds of Wild *Eruca sativa* L. (Salad Rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (Wild Rocket) from Diverse Geographical Locations, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 67-74
- D'Antuono L.F., Elementi S., Neri R., (2009) Exploring new potential health-promoting vegetables: glucosinolates and sensory attributes of rocket salads and related *Diplotaxis* and *Eruca* species, *J. Sci. Food Agric.*, in press.
- Martínez-Sánchez, A.; Llorach, R.; Gil, M. I.; Ferreres, F. Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca Vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1356–1363.
- Gheldof N., Wang X-H., Engeseth J. N., (2003) Buckwheat Honey Increases Serum Antioxidant Capacity in Humans, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1500–1505.

3. Sviluppo della ricerca

Per il raggiungimento degli obiettivi del progetto della tesi di dottorato, la ricerca è stata sviluppata secondo i seguenti punti principali, riepilogati nel diagramma di Gantt (Tabella 1):

- 1) **Ricerca bibliografica** sui temi da affrontare e sviluppare nel corso del dottorato.
- 2) **Influenza degli ovoprodotti nella produzione di pasta secca.** Valutazione dello stato ossidativo primario e secondario (prodotti di ossidazione del colesterolo) durante la shelf-life di pasta secca all'uovo, prodotta a partire da materie prime differenti e stoccata a diverse condizioni di packaging.

- 3) **Valutazione del processo ossidativo in oli extra vergini di oliva (VOO) durante la shelf-life.** Studio della stabilità ossidativa e della frazione fenolica di diversi VOO, a differenti periodi e condizioni di conservazione. Panel test sugli stessi campioni effettuato da esperti ed addestrati assaggiatori di oli vergini di oliva.
- 4) **Valutazione quali-quantitativa del contenuto in composti secondari bioattivi in campioni di rucola (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia* spp.).** Caratterizzazione del contenuto in glucosinolati e composti fenolici in campioni di rucola di differente specie e provenienza. Analisi sensoriale degli stessi campioni attraverso la messa a punto di un metodo e l'addestramento di un panel di assaggiatori.
- 5) **Determinazione della composizione fenolica e aromatica di mieli di grano saraceno:** caratterizzazione di mieli di grano saraceno di diversa produzione e provenienza, in funzione delle loro proprietà chimiche, sensoriali e antiossidanti.
- 6) **Studio di composti bioattivi in matrici alimentari di diversa origine.**
- 7) **Scrittura della tesi di dottorato, pubblicazione di articoli scientifici e presentazione orale e/o poster.**

Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
A1) Ricerca bibliografica																				
A2) Influenza degli ovoprodotti nella produzione di pasta secca																				
1) Qualità delle materie prime																				
2) Sviluppo di pasta secca in impianti pilota																				
3) Confezionamento convenzionale e non																				
4) Studio del processo di ossidazione durante la shelf-life																				
A3) Valutazione dell'ossidazione in VOO durante la s-l																				
1) Caratterizzazione del profilo lipidico																				
2) Valutazione del potenziale antiossidante																				
3) Studio dei processi ossidativi																				
4) Analisi sensoriale																				
A4) Valutazione glucosinolati e fenoli in campioni di rucola																				
1) Raccolta dei campioni e loro stoccaggio																				
2) Addestramento assaggiatori e panel test dei campioni																				
3) Estrazione glucosinolati e fenoli e loro valutazione analitica																				
4) Elaborazione statistica e caratterizzazione campioni di rucola																				
A5) Studio della composizione fenolica di mieli di grano saraceno																				
1) Estrazione di fenoli in differenti campioni di miele di g.s.																				
2) Determinazione HPLC-MS dei composti fenolici																				
3) Valutazione della composizione aromatica																				
A6) Studio di composti bioattivi in diverse matrici alimentari																				
1) Caratterizzazione mediante tecniche analitiche																				
2) Valutazione del loro potenziale con test in vitro																				
A7) Preparazione della tesi, articoli e poster																				

4. Principali risultati

A4) Il progetto di ricerca riguardante la “**Valutazione quali-quantitativa del contenuto in composti secondari bioattivi in campioni di rucola (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia* spp.)**” si propone di effettuare uno studio comparativo dei composti bioattivi presenti in campioni di *Eruca Sativa* L. (rucola coltivata) e *Diplotaxis tenuifolia* L. (rucola selvatica), usati spesso come ingredienti di insalate. Tale lavoro prevede anche un confronto tra i caratteri analitici determinati e le caratteristiche sensoriali degli stessi campioni, in modo da verificare l'eventuale presenza di correlazioni tra esse.

A tale proposito, sono state selezionate 37 accessioni di rucola tipicamente coltivata e di differente origine geografica: 32 del genere *Eruca sativa* L. e 5 di *Diplotaxis tenuifolia* L. Le foglie raccolte sono state in parte destinate all'analisi sensoriale, effettuata attraverso la formazione di un Panel composto da 9 giudici preventivamente addestrati, e in parte destinate alle determinazioni analitiche. Quest'ultime hanno richiesto alcune operazioni preliminari (liofilizzazione e macinazione dei campioni, seguite dalla separazione ed estrazione dei composti bioattivi di interesse e infine l'iniezione degli estratti in HPLC/DAD-MS. Per quanto riguarda i glucosinolati (GLS), i campioni sono stati analizzati in due repliche, una delle quali denominata “tal quale” e l'altra “idrolizzata”, poiché preparata con l'aggiunta dell'agente riducente TCEP (tris-2-carbossietilfosfina) in grado di ridurre il dimero 4-DMB nel suo monomero 4-MER. Un esempio di cromatogramma UV dei GLS desolforati (DS-GLS) è mostrato in **Figura 1**. L'identificazione dei composti è stata eseguita sulla base dei tempi di ritenzione dei picchi del cromatogramma UV (229 nm) e dei rispettivi spettri di massa, ottenuti con ionizzazione electrospray in modalità positiva (API-ESI⁺). In particolare, ogni DS-GLS è stato identificato in funzione del rapporto m/z dei suoi addotti [M+Na]⁺ e [M+K]⁺, come è riportato in **Tabella 1**. Nei campioni

idrolizzati è stato possibile notare la scomparsa del dimer e la formazione del DS-4-mercaptobutyl GLS (4-MER), come è ben visibile in Figura 1. La quantificazione dei principali composti è stata eseguita sui cromatogrammi UV, calcolando le aree dei picchi e applicando i fattori di correzione provenienti dalla retta di taratura dello standard esterno (sinigrina). La concentrazione dei glucosinolati è stata espressa in mg/kg di sostanza secca.

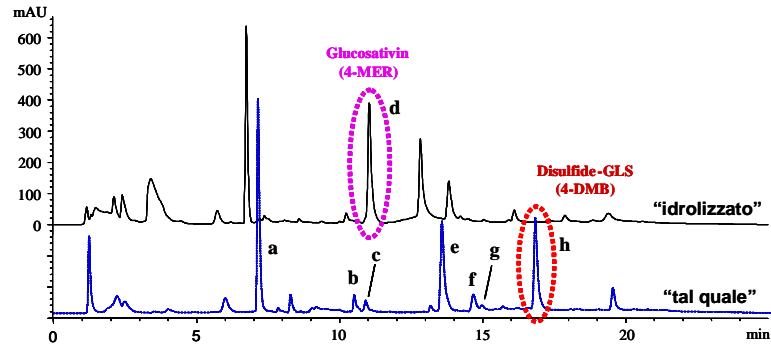


Figura 1. Cromatogramma UV dei DS-GLS nella frazione tal quale e in quella idrolizzata.

#	RT	Massa	Composto
a	6.4	380 [M+Na] ⁺ , 396 [M+K] ⁺	DS-4-(Methylsulfanyl)butyl GLS
b	9.5	544 [M+Na] ⁺ , 560 [M+K] ⁺	DS-4-(β-D-glucopyranosyldisulfanyl) butyl GLS)
c	10	407 [M+Na] ⁺ , 423 [M+K] ⁺	DS-4-iodroxy-3-indolylmethyl GLS
d	10.7	350 [M+Na] ⁺ , 366 [M+K] ⁺	DS-4-mercaptobutyl GLS (DS-4 MER)
e	12.6	364 [M+Na] ⁺ , 380 [M+K] ⁺ ,	DS-4-(Methylthio)butyl
f	13.5	332[M+Na] ⁺ , 348 [M+K] ⁺	DS-2(S)-2-Hydroxy-3-butenyl
g	14.0	391[M+Na] ⁺ , 407 [M+K] ⁺	DS-3 indolylmethyl GLS
h	16.0	675 [M+Na] ⁺ , 691 [M+K] ⁺	DS-dimeric 4-mercaptobutyl GLS (DS-4DMS)

Tabella 1. Caratterizzazione dei DS-GLSs presenti negli estratti acquosi di *Eruca* e *Diplotaxis*.

La caratterizzazione della componente fenolica dei campioni oggetto di studio è stata condotta anche sempre con una cromatografia liquida in fase inversa accoppiata ad un detector DAD e ad uno spettrometro di massa con analizzatore quadrupolo. L'identificazione è stata condotta sulla base dei tempi di ritenzione dei picchi nel cromatogramma UV (330 nm) e dei rispettivi spettri di massa, ottenuti con ionizzazione electrospray positiva e negativa (API-ESI+/-). A differenza dei glucosinolati, i fenoli presentano profili differenti tra i campioni di *Eruca* e *Diplotaxis* (Figura 2) e i corrispondenti composti identificati, con i rispettivi frammenti, sono indicati in Tabella 2. L'analisi HPLC/UV-DAD/ESI-MS dell'estratto idroalcolico del genere *Diplotaxis* rivela la presenza di flavonoidi diversi, principalmente derivati di tri-glicosidi della quercetina, alcuni di loro acilati con acidi idrossinamici, i più importanti di questi sono il composto 1, il 5 e il composto 8.

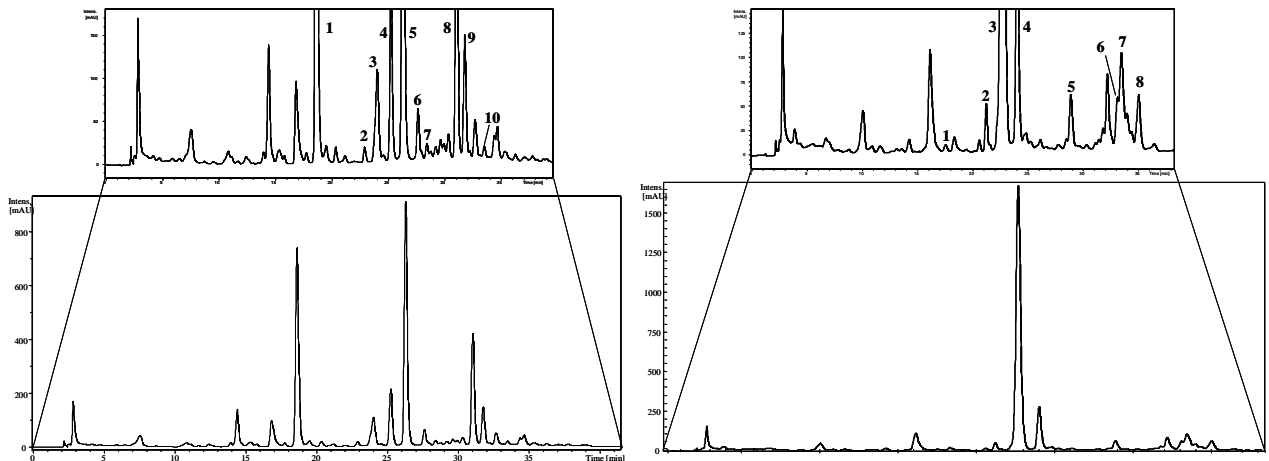


Figura 2: Cromatogramma UV dell'estratto idroalcolico di un campione del genere *Diplotaxis* (a sinistra) e *Eruca* (a destra)..

Per quanto riguarda il campione di *Eruca*, lo studio HPLC/UV-DAD/ESI-MS mostra che il composto principale è un canferolo di glucoside con lo ione [M-H]⁻ a 609 m/z; l'analisi dei frammenti di massa ha dato un derivato di canferolo monoglicosilato con un idrossile libero in posizione 3 [M: 447, 301]. Questo composto è stato identificato provvisoriamente perciò, come canferolo-3,4'-di-O-glucoside.

Analogamente ai glucosinolati, i composti fenolici naturalmente presenti nei campioni analizzati sono stati quantificati attraverso l'utilizzo di uno standard esterno e quindi espressi in rutina equivalenti (mg rutina/g sostanza secca), poiché gli standard commerciali di questi composti non sono disponibili. A differenza del profilo fenolico, la quantità di tali composti bioattivi totali, è indipendente dal genere di rucola.

Inoltre, è bene sottolineare che, sia per i glucosinolati sia per i fenoli, non è stato possibile trovare delle differenze significative e/o marker in grado di distinguere l'origine geografica dei semi dai quali provenivano i campioni

#	RT	Massa	Composto
1	17.6	787 [M-H] ⁻ , 625	Q-3,3',4'-Tri-G
2	22.0	979 [M-H] ⁻	Q-3,4'-di-G-3'-(6-MC-G)
3	22.8	949 [M-H] ⁻ , 787, 625	Q-3,4'-di-G-3'-(6-C-G)
4	24.2	639 [M-H] ⁻ , 447	I-3,4-di-G
5	25.5	993 [M-H] ⁻ , 831	Q-3,4'-di-G-3'-(6-S-G)
6	26.7	963 [M-H] ⁻ , 801	Q-3,4'-di-G-3'-(6-F-G)
7	27.7	933 [M-H] ⁻ , 771	Q-3,4'-di-G-3'-(6-pC-G)
8	30.3	1199 [M-H] ⁻ , 1037	Q-3-(2-S-G)-3'-(6-S-G)-4'G
9	31.0	1169 [M-H] ⁻ , 831	Q-3-(2-F-G)-3'-(6-S-G)-4'G
10	32.7	1139 [M-H] ⁻	Q-3-(2-F-G)-3'-(6-F-G)-4'G

#	RT	Massa	Composto
1	17.7	771 [M-H] ⁻	C-3-di-G-7-G
2	21.4	1139 [M-H] ⁻ , 963	Q-3-(F/F-tri-G)-7-R
3	22.8	609 [M-H] ⁻	C-3,4-di-G
4	24.3	639 [M-H] ⁻ , 447	I-3,4 di-G
5	29.6	463 [M-H] ⁻	Q-3-G
6	33.7	447 [M-H] ⁻	C-3-G
7	33.9	477 [M-H] ⁻	I-3-G
8	35.0	817 [M-H] ⁻	C-3-(2-S-G)-4'-G

Tabella 2: Composti fenolici identificati nel genere *Diplotaxis* (sopra) e *Eruca* (sotto).

5. Elenco delle pubblicazioni prodotte nell'ambito dell'attività di dottorato

- V. Verardo, F. Pasini, M.C. Messina, G. Iafelice, E. Marconi, M.F. Caboni. (2007) "I prodotti di ossidazione del colesterolo e la shelf life della pasta all'uovo". In: 7° Convegno AISTEC 2007, Campobasso (Italia) 3-5 ottobre 2007. (pp.207-211). ISBN-978-88-901055-4-8.
- F. Pasini, L. Cerretani, A. Bendini, A. Rossi, M.F. Caboni, G. Lercker. (2008) "Effect of the storage of virgin olive oil at controlled temperature (12°C) respect to room temperature (25°C)". In: Proceedings of the 6th Euro Fed Lipid Congress. Oils, Fats and Lipids in the 3rd Millenium: Challenges, Achievements and Perspectives. Athens (Greece), 7-10 September 2008 (pp.241).
- F. Pasini, L. Cerretani, A. Bendini, A. Rossi, M.F. Caboni. "Evaluation of different storage temperature on the shelf-life of extra virgin olive oils". Agro Food Ind Hi Tec. in stampa (2009).
- F. Pasini, L. Cerretani, M.F. Caboni, L.F D'Antuono (2009) "Relating rocket salad (*Diplotaxis* and *Eruca* spp.) glucosinolate and sensory attributes". In: Proceedings of 8th Pangborn Sensory Science Symposium 2009, Firenze (Italia) 26-30 luglio 2009 (P1.1.133).
- F. Pasini, "Glucosinolate content and sensory attributes of Rocket Salad samples (*Diplotaxis* and *Eruca* spp.)". In: Atti del 14th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology, University of Sassari-Oristano, September 16-18, 2009. (pp.340-341).
- V. Verardo, F. Pasini, M.C. Messina, G. Iafelice, E. Marconi, M.F. Caboni. "Influence of storage conditions on lipid oxidation in egg pasta from different egg co-products". DOI:10.1021/jf904143p.