

# ALIMENTAZIONE E SALUTE

LA QUALITÀ, LA SICUREZZA E LA RINTRACCIABILITÀ DEGLI ALIMENTI INCIDE PROFONDAMENTE SULLA SALUTE DELL'UOMO E SULLA QUALITÀ DELLA VITA. I RISULTATI RAGGIUNTI DAL LABORATORIO *MISSION ORIENTED QUASIORA* INDIVIDUANO LE METODOLOGIE PER SOSTITUIRE SU BASI SCIENTIFICHE LE PROCEDURE OBSOLETE SPESSO ANCORA OGGI UTILIZZATE

## La sicurezza

### La melamina nel latte

La certificazione di qualità, sicurezza ed origine degli alimenti è spesso affidata dalle regolamentazioni nazionali ed internazionali

dimostrava come, mediante spettrometria di massa a diluizione isotopica, sarebbe stato possibile ottenere informazioni, su scala semi-micro, scientificamente valide sulla presenza del potente veleno nel prodotto alimentare [1].

L'identificazione dell'inquinante presente nella matrice alimentare ed il suo dosaggio sono stati eseguiti utilizzando la procedura nota come *precursor ion scan*, con standard marcati con deuterio opportunamente sintetizzati

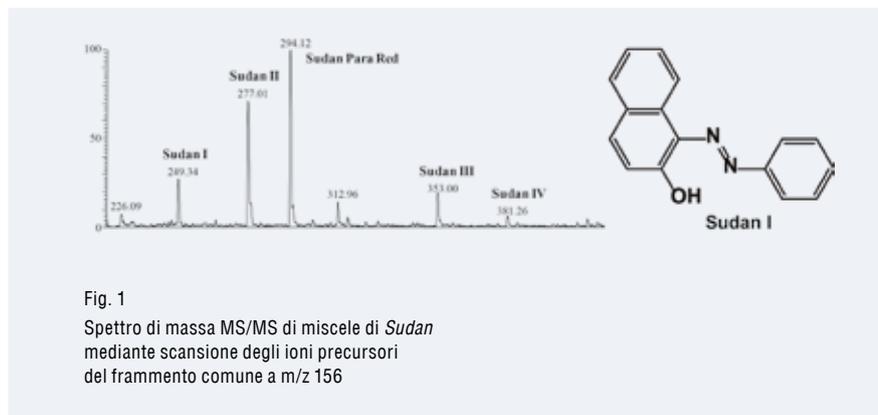


Fig. 1  
 Spettro di massa MS/MS di miscele di *Sudan* mediante scansione degli ioni precursori del frammento comune a m/z 156



Fig. 2  
 Sorgente *paper spray*. Il sistema è adattato su di uno spettrometro di massa commerciale

a metodologie di accertamento obsolete e non in grado di operare a favore delle reali esigenze della salute del consumatore. La norma ISO 8968-1|IDF 20-1:2014 propone (ancora oggi!) il metodo che il grande chimico Kjeldahl presentò nel 1883, alla Società Chimica Danese, per la determinazione del contenuto proteico nel latte ed in altri alimenti. Il metodo è stato usato, nel 2008, per *validare* una frode commerciale relativa all'introduzione sul mercato, di latte alla melamina, un composto ad alto contenuto di azoto che consentiva di spacciare il prodotto come latte intero. Il metodo Kjeldahl non è in grado, infatti, di discriminare la fonte di azoto presente in un alimento. La morte di circa 300 mila bambini suscitò l'attenzione internazionale; meno interesse fu riservata al lavoro scientifico, eseguito presso l'Università di Shanghai che

### Il Sudan negli insaccati

Un caso di duplice frode alimentare si è verificato sino al 2005 in Italia con l'introduzione sul mercato di prodotti contenenti polvere di peperoncino rosso contaminato con coloranti azoici appartenenti alla famiglia del *Sudan*. I coloranti, potenti agenti cancerogeni, venivano aggiunti per prolungare la durata del colore rosso vivo di alcuni alimenti, normalmente insaccati derivanti da carne di maiale, mentre la materia prima, la polvere di peperoncino veniva commercializzata in Italia come prodotto autoctono. Il gruppo di spettrometria di massa dell'Università della Calabria, investito del problema da parte di Confindustria Calabria, mise a punto un metodo assoluto di identificazione della frode basato sull'uso della spettrometria di massa tandem a diluizione isotopica [2].

(Fig. 1)  
 La determinazione dei Sudan è stata di recente realizzata anche mediante spettrometria di massa *ambient*, con il metodo noto come *paper spray* (Fig. 2) che permette la deposizione degli analiti su di un triangolo di carta da filtro che viene posto in un forte campo elettrico in modo da facilitare il trasferimento in fase gassosa delle specie cariche formate per electro-spray (ESI) [3].

### La qualità Il resveratrolo

Proprietà taumaturgiche sono correntemente associate ad alimenti naturali contenenti presunti principi attivi le cui proprietà nutraceutiche sono vagamente definite e mai provate sperimentalmente in indagini epidemiologi-



che. Uno di questi casi è rappresentato dagli ipotetici effetti che il resveratrolo, presente nel vino rosso, dovrebbe esercitare su patologie cardiache (*paradosso francese*). Questo fenolo (3,5,4'-triidrossi-transtilbene), spesso riferito nella letteratura culinaria e non come polifenolo (!) possiede ovvie proprietà antiossidanti *in vitro*, mai dimostrate *in vivo* [4].

Applicando la stessa metodologia di spettrometria di massa prima descritta è stato determinato il contenuto di resveratrolo *cis* e *trans* in diversi vini rossi italiani e nordafricani. Nella migliore delle ipotesi la quantità di principio attivo è dell'ordine dei 20 mg/kg [5]. Pertanto anche ipotizzando un effetto farmacologico del nutraceutico sull'uomo, della cui inconsistenza si è ormai certi, è necessario, nella migliore delle ipotesi, ingerire un chilo di vino rosso al giorno per assumere una quantità di circa 20 mg di resveratrolo!

poste in relazione dose/risposta al noto farmaco Ibuprofene. Le proprietà nutraceutiche dell'olio extravergine d'oliva si arricchirono quindi della presenza, realmente dimostrata, di antiinfiammatori non steroidei.

La loro determinazione quantitativa nell'alimento o, in genere, nei tessuti di piante della famiglia delle *oleacee* è stata eseguita mediante le metodologie di spettrometria di massa già richiamate, con qualche modifica procedurale. Era stato già dimostrato che l'identificazione diretta mediante ESI-MS delle specie 1 e 2 doveva tenere conto degli equilibri che interessavano il sistema dialdeidico in solventi polari, quali acqua/metanolo, durante la fase di ionizzazione [8]; era inoltre necessario sviluppare un metodo di sintesi degli standard interni marcati per procedere alla determinazione quantitativa con il metodo assoluto già menzionato.

metodologia *paper spray* (Fig. 2) che permette un saggio diretto degli antiinfiammatori dai campioni sottoposti ad analisi.

La quantità totale dei composti 1 e 2 (Schema 1), nei migliori campioni di olio extravergine d'oliva è dell'ordine di 300 mg/kg; in altri campioni tale valore si riduce anche di oltre il 50%.

La dialdeide contenente l'idrossitirisololo è stata anche ottenuta da fonti naturali mediante sintesi biomimetica ed utilizzata anche in esperimenti su culture cellulari [10].

### Le statine naturali del bergamotto

Il succo di bergamotto da circa due secoli viene proposto dalla medicina popolare della zona grecanica della provincia di Reggio Calabria come presidio farmacologico.

Nell'ambito del progetto QUASIORA il gruppo di ricerca dell'Unical, ha identificato, isolato e caratterizzato due nutraceutici aventi la struttura degli HMG-flavonoidi riportati nello Schema 2.

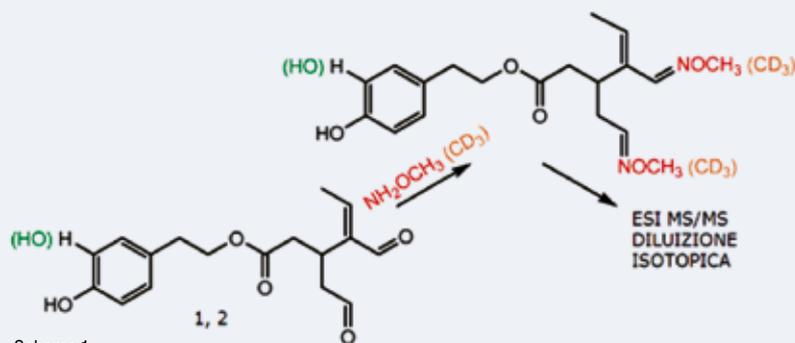
Nella stessa fonte naturale sono presenti, a diverse concentrazioni, anche altre molecole recanti l'unità HMG.

I risultati sono stati coperti da brevetto e pubblicati nel 2009 [11]. Tutte le metodologie classiche della chimica estrattiva e sistemi di riconoscimento strutturale, quali tecniche spettroscopiche e spettrometriche, sono stati utilizzati per il riconoscimento iniziale di tali nutraceutici.

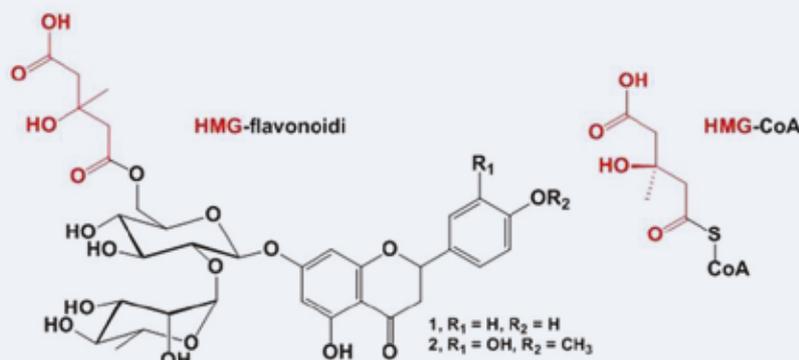
La ricerca di un metodo spettrometrico MS/MS, in analogia con quanto prima descritto, consente oggi la rapida identificazione ed il dosaggio delle specie attive in matrici naturali. Gli stessi principi attivi sono stati identificati anche nell'albedo del frutto [12]. Gli HMG flavonoidi sono una caratteristica dei tessuti del bergamotto e per la loro struttura agiscono da analoghi del substrato HMG-CoA nell'interazione con l'enzima riduttasi, la cui attività viene temporaneamente bloccata.

Tale proprietà nutraceutica è stata determinata *in vitro* e, recentemente, su cavie [13] e sono iniziati gli studi epidemiologici [14]. È stata anche verificata la stabilità delle statine naturali del bergamotto a seguito di trattamenti termici e di processi di fermentazioni naturali.

Tale presupposto è foriero di importanti applicazioni della materia prima nella preparazione di cibi funzionali.



Schema 1  
Antiinfiammatori dell'olio d'oliva



Schema 2

### Gli antiinfiammatori dell'olio d'oliva

Tra i principi attivi presenti nell'olio d'oliva ricercatori italiani [6] scoprirono la presenza di molecole a struttura dialdeidica (Schema 1). Dopo oltre un decennio le proprietà antiinfiammatorie di alcune di tali molecole furono descritte da ricercatori statunitensi [7] e

La soluzione proposta prevede il trattamento del campione con *O*-metil-idrossilammina, marcata e non con tre deuteri sul gruppo metilico, in maniera che l'analisi quali-quantitativa si effettuasse sulle ossime, marcate e non, formate *in situ* [9].

Successivamente è stata messa a punto una

**La freschezza dell'olio extravergine d'oliva**

Nel novembre 2012 è stato approvato un disciplinare relativo all'alta qualità dell'olio extravergine d'oliva (*Decreto ministeriale per l'istituzione del sistema di qualità nazionale Olio Extra Vergine di Oliva (SQN-Olio) riconosciuto a livello nazionale ai sensi dell'art. 22, paragrafo 2 del Reg. (CE) n. 1974/2006*) che definisce l'indice di invecchiamento dell'olio in funzione del rapporto 1,2-digliceridi/1,3-digliceridi (1,2-DG/1,3-DG).

Tale disciplinare, ancora non applicato, rappresenta un esempio virtuoso di come la ricerca di base possa essere trasferita alla certificazione di alimenti di qualità, utilizzando metodologie, quali la risonanza magnetica (NMR), che, come la spettrometria di massa prima impiegata, fanno parte del bagaglio culturale del chimico, ma che spesso, per ignoranza o malafede non vengono considerate. I digliceridi sono presenti in tracce nell'olio d'oliva e sono interessati all'equilibrio di isomerizzazione da 1,2-DG ad 1,3-DG, derivante dal controllo termodinamico del processo (Fig. 3). Ricercatori greci hanno razionalizza-

to tale particolare trasformazione chimica seguendo mediante <sup>31</sup>P-NMR l'andamento dell'equilibrio a seguito di fosforilazione dell'ossidrile gliceride libero [15]. Il gruppo di ricerca dell'Unical ha sviluppato una metodologia NMR che presenta come vantaggio la determinazione dell'età di un olio senza ricorrere al pretrattamento del campione ma per campionamento diretto della matrice alimentare. L'olio solubilizzato in CDCl<sub>3</sub> nel tubicino NMR e trattato con un agente fosforilante facilmente reperibile in commercio e sottoposto all'acquisizione degli spettri NMR al <sup>31</sup>P. Non è stata osservata formazione di sottoprodotti. Il procedimento si presta alla preparazione del campione per analisi anche direttamente presso l'azienda [16]. Nella Fig. 3 sono riportati, oltre alle formule di struttura, i parametri dettati dalla normativa circa la percentuale di 1,2-DG in funzione dell'invecchiamento dell'alimento. Sono riportati anche parte degli spettri NMR che si riferiscono ad olio extravergine di oliva della cultivar *Carolea* in funzione dell'invecchiamento.

**L'origine geografica degli agroalimenti**

La rintracciabilità di un agroalimento è diventata ormai di primaria importanza per l'introduzione sul mercato di prodotti tipici, quali quelli delle filiere autoctone nazionali. Le metodologie esistenti per l'individuazione dell'origine sono purtroppo ancora basate su controlli burocratici oppure vengono eseguiti con tecniche di nessuna affidabilità scientifica. Una delle *mission* dell'attività nell'ambito del progetto QUASIORA è rappresentata dal trasferimento di approcci high tech alla normale pratica del riconoscimento della qualità, sicurezza ed origine di prodotti autoctoni, con l'intento di promuovere nuova imprenditorialità e di offrire un sostegno agli operatori del settore a vincere concorrenze sleali presenti sul mercato italiano.

**La passata di pomodoro**

Un importante contributo per il mercato italiano è stato rappresentato dalla certificazione d'origine della passata di pomodoro, basata sulla determinazione dei macro- e micro-elementi presenti su campioni standard e campioni commerciali di passate di pomodoro provenienti da zone di produzione locali, nazionali ed internazionali.

Tale ricerca ha avuto già una ricaduta immediata nella filiera di riferimento in quanto un'azienda calabrese ha già introdotto sul mercato passata di pomodoro esclusivamente prodotta da vegetali la cui origine è stata controllata scientificamente.

Il metodo introdotto è superiore a quelli esistenti in quanto valuta la tipologia e la concentrazione di microelementi presenti nella passata, i quali hanno memoria del territorio dove il frutto è prodotto.

I dati, ottenuti mediante ICP-MS, sono valutati con l'applicazione di metodi statistici riconosciuti [17].

L'indagine è stata condotta su campioni italiani e stranieri e su campioni provenienti dall'Italia meridionale (Fig. 4).

I risultati ottenuti sono di notevole importanza sia per le aziende produttrici che per quelle della trasformazione.

Come si può rilevare dalla Fig. 4, infatti, le zone di produzione sono ben individuate e riconoscibili ed è quindi possibile valutare la opportunità di porre in etichetta informazioni utili al consumatore e basate su indagini ad elevato contenuto scientifico.

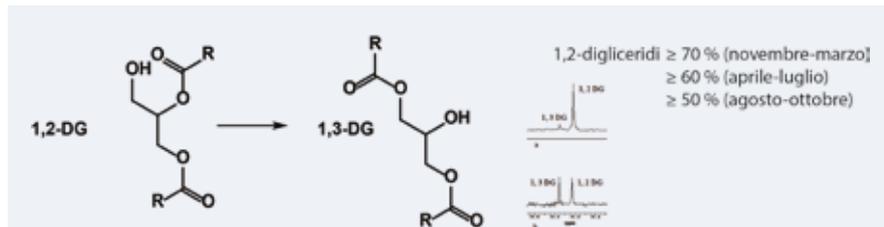


Fig. 3 Isomerizzazione di digliceridi nell'olio extra vergine d'oliva di qualità. Gli spettri <sup>31</sup>P-NMR si riferiscono a olio di *Carolea* dopo 4(a) e 12(b) mesi

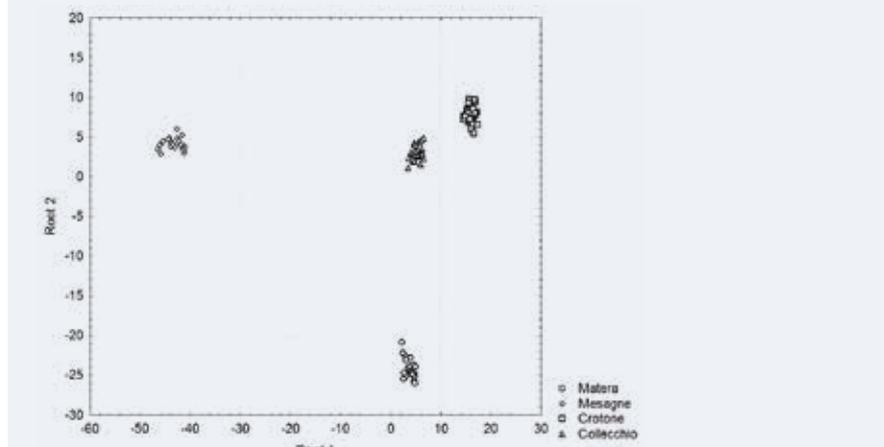


Fig. 4 Trattamento statistico dei dati ICP-MS ottenuti da campioni italiani



### Le clementine e altri prodotti

Lo stesso approccio è stato utilizzato allo scopo di verificare l'origine geografica di altri prodotti agroalimentari. Infatti, l'analisi del *fingerprint* degli elementi e la successiva analisi chemiometrica ha permesso di ottenere ottimi risultati in termini di capacità predittiva per la determinazione dell'origine delle "Clementine di Calabria" [18], della "Cipolla Rossa di Tropea" [19], dell'olio extravergine di oliva [20]. Anche nel caso delle clementine, in analogia a quanto successo per la passata di pomodoro, l'impatto commerciale del metodo proposto è stato colto da una start up calabrese che ha richiesto la verifica dell'origine con l'obiettivo di proporre al consumatore una scelta più consapevole e, soprattutto, la garanzia dell'origine dichiarata in etichetta.

### Proteomica vegetale

La proteomica rappresenta una linea di ricerca scientifica che ha ricevuto notevole impulso dalla spettrometria di massa sino a raggiungere una rapporto di interdipendenza ormai unico. In campo agroalimentare ha applicazioni che rientrano in tutte le finalità

la determinazione precoce di insorgenza di mastiti nelle mucche da latte [22].

Sono state sviluppate anche metodologie per l'estrazione in fase solida di specifiche proteine da miscele complesse, presenti anche negli alimenti, e la determinazione della loro struttura mediante spettrometria di massa MALDI-TOF/TOF sui loro digeriti triptici. In particolare si è proceduto alla progettazione di un sistema molecolare di marcatura, denominato SPIMT per semplificare l'identificazione di peptidi in miscela [23]. La Fig. 5 mette in evidenza come un peptide, derivante dalla digestione triptica dell'albumina bovina (BSA) derivatizzata con il gruppo SPIMT, possa essere agevolmente identificato per spettrometria di massa dalle sue dissociazioni unimolecolari in fase gassosa ottenute da precursori a diversa energia interna.

### Considerazioni finali

La chimica, almeno quella italiana, ha spesso sottovalutato l'opportunità del trasferimento tecnologico del grande patrimonio di invenzioni prodotte verso attività produttive sia nel settore agroalimentare, che nel controllo della

ranti che hanno legittimato l'uso improprio di termini come *polifenoli*, il più noto dei quali è la *bachelite* materiale plastico termoindurente non edibile, e bio-fenoli o bio-flavonoidi, come sinonimi di sostanze ad attività nutra-ceutica, in assenza di alcuna dimostrazione medico-scientifica. Negli ultimi dieci anni il progetto *mission oriented* QUASIORA ha prodotto risultati, alcuni dei quali descritti in precedenza, che vanno verso la proposizione del ruolo dei chimici in un settore, quale quello dell'ambiente e salute che necessita, anche nella direzione di creare nuove attività produttive e quindi opportunità di lavoro, di un impegno sul territorio di fondamentale importanza.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] Q.Q. Wu *et al.*, *Chinese Sci. Bull.*, 2009, **54**, 732.
- [2] a) G. Sindona *et al.*, *Anal. Chem.* 2004, **76**, 5104; b) G. Sindona *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 1057; c) G. Sindona *et al.*, *Synthesis*, 2008, **3**, 459; G. Sindona *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 63.
- [3] G. Sindona *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2013, **48**, 544.
- [4] D.A. Pratt, C.R.J. Stephenson *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 3754.
- [5] G. Sindona *et al.*, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 8603.
- [6] G.F. Montedoro *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 2228.
- [7] G.K. Beauchamp *et al.*, *Nature*, 2005, **437**, 45.
- [8] G. Sindona *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2000, **35**, 461.
- [9] G. Sindona *et al.*, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 1990.
- [10] a) A. Caruso, G. Sindona *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 4006; b) A. Procopio, G. Sindona *et al.*, *Food Chem.*, 2014, **162**, 89.
- [11] a) L. Di Donna, V. Dolce, G. Sindona, brevetto ITCS20080019; b) L. Bartella, A. Cappello, L. Di Donna, G. Gallucci, G. Sindona, brevetto UB2015A000297; c) L. Di Donna, G. Sindona *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 2009, **72**, 1352.
- [12] L. Di Donna, G. Sindona *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **125**, 438.
- [13] V. Dolce, G. Sindona *et al.*, *J. Functional Food*, 2014, **7**, 558.
- [14] In collaborazione con UOC di cardiologia

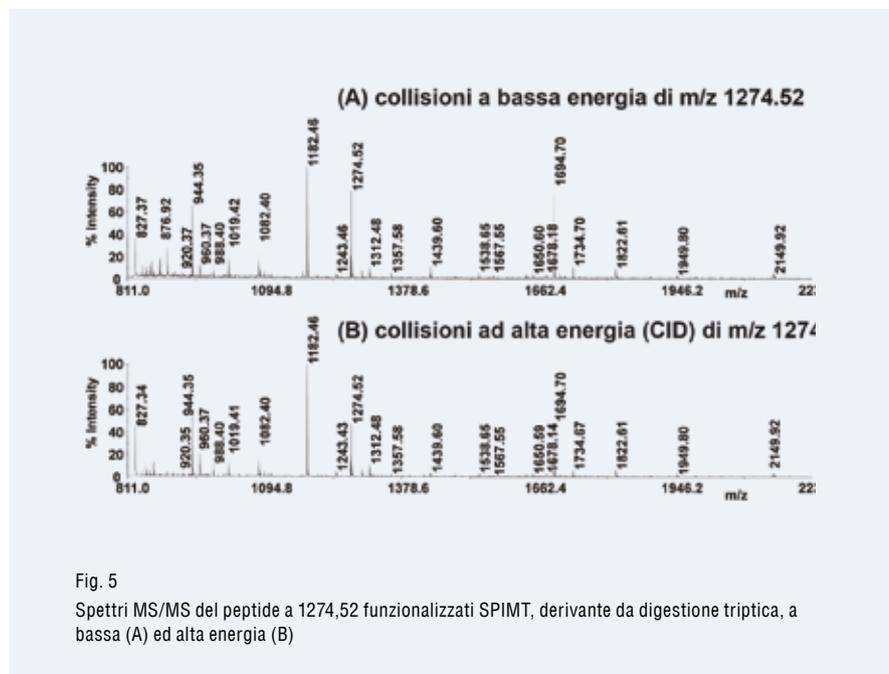


Fig. 5 Spettri MS/MS del peptide a 1274,52 funzionalizzati SPIMT, derivante da digestione triptica, a bassa (A) ed alta energia (B)

del progetto QUASIORA. Alcune ricerche di proteomica, hanno riguardato la caratterizzazione del corredo proteico del polline di olivo [21]; lo stesso approccio è stato utilizzato per

qualità della vita e quindi della salute dell'uomo. L'opinione pubblica, anche se sensibilizzata, di recente, da informazioni sulla stampa specializzata [24], è ancora succube di igno-

dell'ospedale di Castrovillari (CS), dott. G. Bisignani.

[15] A. Spyros *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 577.

[16] G. De Luca, L. Maiuolo, G. Sindona brevetto CCIAA CS2014A000011, 05/03/2014.

[17] a) G. Sindona, A. Tagarelli *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3801; b) G. Sindona, A. Tagarelli *et al.*, *Food Res. Int.*, 2011, **44**, 781.

[18] G. Sindona, A. Tagarelli *et al.*, *J. Agric.*

*Food Chem.*, 2012, **60**, 3717.

[19] G. Sindona, A. Tagarelli *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 8450.

[20] G. Sindona, A. Tagarelli *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **585**, 366.

[21] A. Napoli, G. Sindona *et al.*, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 3434.

[22] A. Napoli, G. Sindona *et al.*, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 5941.

[23] A. Napoli, G. Sindona *et al.*, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5552.

[24] *Il Fatto Alimentare*, giugno 2015.

## Nutrition and Health

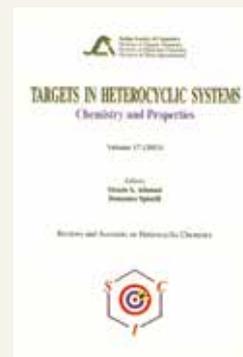
Quality, safety and traceability of foods deeply affect both human health and life outcomes. The results obtained by the *mission oriented* QUASIORA laboratory set out the procedures to replace on scientific bases those dated approaches often still-in use.

GIUSEPPINA DE LUCA - LEONARDO DI DONNA-  
ANNA NAPOLI - GIOVANNI SINDONA -  
ANTONIO TAGARELLI

DIPARTIMENTO DI CHIMICA E TECNOLOGIE  
CHIMICHE

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

GIOVANNI.SINDONA@UNICAL.IT



Targets  
in Heterocyclic  
Systems

Vol. 17

È uscito il 17°  
volume  
della serie  
"Targets in  
Heterocyclic  
Systems", a  
cura di Orazio A.  
Attanasi  
e Domenico  
Spinelli.

Sono disponibili

anche i volumi 1-16 della serie

I seguenti volumi sono a disposizione dei Soci gratuitamente, è richiesto soltanto un contributo spese di € 10:

- G. Scorrano "La Storia della SCI", Edises, Napoli, 2009 (pp. 195)
- G. Scorrano "Chimica un racconto dai manifesti", Canova Edizioni, Treviso, 2009 (pp. 180)
- AA.VV. CnS "La Storia della Chimica" numero speciale, Edizioni SCI, Roma 2007 (pp. 151)
- AA.VV. "Innovazione chimica per l'applicazione del REACH" Edizioni SCI, Milano, 2009 (pp. 64)

Oltre "La Chimica e l'Industria", organo ufficiale della Società Chimica Italiana, e "CnS - La Chimica nella Scuola", organo ufficiale della Divisione di Didattica della SCI ([www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo](http://www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo)), rilevante è la pubblicazione, congiuntamente ad altre Società Chimiche Europee, di riviste scientifiche di alto livello internazionale:

- ChemPubSoc Europe Journal
- Chemistry A European Journal
- EURJOC
- EURJIC
- ChemBioChem
- ChemMedChem
- ChemSusChem
- Chemistry Open
- ChemPubSoc Europe Sister Journals
- Chemistry An Asian Journal
- Asian Journal of Organic Chemistry
- Angewandte Chemie
- Analytical & Bioanalytical Chemistry
- PCCP, Physical