

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Applicazioni di metodi molecolari e di
fingerprinting dei composti volatili per analisi di
autenticità alimentare in spezie ed erbe
aromatiche

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Valentina Pettinari

RELATORE

Dott.ssa Alessandra Stefan

CORRELATORE

Dott.ssa Sonia Scaramagli

Anno Accademico 2017-2018

SEDE DI SVOLGIMENTO DEL TIROCINIO
In Ente esterno

Ente: COOP ITALIA Società Cooperativa COOP
Indirizzo: Via del Lavoro 6/8, Casalecchio di Reno (BO)

Laboratorio: Biologia Molecolare

ABSTRACT

The term “food” does not only indicate a nutritive concept, but it contains within itself an ethical, religious and cultural meaning, themes that are strongly felt by the public opinion. Food frauds, since ancient times, have always been considered criminal acts to be punished. Several different types of frauds can be associated to foods. Due to the relevance of this topic, continuous efforts have been made to the technological improvement of new techniques, faster and more accurate, able to detect potential adulteration in food.

The aim of this work is to find and to optimize different analytical methods, such as DNA barcoding and fingerprints of volatile compounds, for the identification of plant species in samples of spices, such as saffron, and aromatic herbs.

Concerning the DNA-based methods, the identification of species through DNA, called DNA barcoding, features high specificity and sensitivity. In this work, DNA samples were amplified and sequenced either with capillary electrophoresis (Sanger method) and with Ion Torrent next generation sequencing (NGS) technology. In addition to DNA-based analysis, chemical methods can be employed for the authentication and traceability of several foods. In this study, the analysis of volatile compounds was performed by ultra-fast Gas Chromatography (Heracles II GC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Data obtained with these methods were used for the statistical analysis based on chemometric approaches (PCA and LDA).

We can conclude that a synergistic study, including biological and chemical analysis, represents a powerful tool to identify food authenticity and frauds: analyses are simple, economically affordable, non-contaminating, quick and automated. Moreover, the approach used in this study could be improved by adding new samples of spices and aromatic herbs, in order to obtain more reliable results.

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	7
Autenticità e frodi	7
Organismi e sistemi di controllo.....	9
La tracciabilità e la rintracciabilità	9
L’etichettatura.....	11
Le spezie e le erbe aromatiche.....	12
Mercati commerciali	13
Processi tecnologici	14
Il ruolo funzionale	17
I parametri di qualità nelle spezie ed erbe aromatiche	18
Le principali specifiche internazionali di qualità	19
The American Spice Association (ASTA).....	20
The European Spice Association (ESA).....	22
I sistemi di garanzia della qualità	24
Lo zafferano, una spezia a rischio adulterazione	25
La pianta “Crocus sativus”	25
La coltivazione.....	26
I metaboliti secondari dello zafferano	28
I composti volatili dello zafferano	30
Gli usi.....	31
Il ruolo in medicina.....	32
Le pratiche di adulterazione.....	33
Metodi analitici per la ricerca di adulterazioni nelle spezie.....	35
Analisi del DNA.....	36
Il DNA barcoding.....	38
Metodi basati sull’amplificazione PCR	40
Metodi basati sul sequenziamento	44

Metodo SANGER	44
Next generation sequencing (NGS)	45
Fingerprinting dei composti volatili per l'autenticità alimentare nelle spezie	49
I principi generali di gas cromatografia (GC).....	49
Heracles II.....	50
I componenti di Heracles II.....	51
Analisi statistica multivariata	53
L'analisi dei componenti principali (PCA).....	54
SCOPO.....	55
MATERIALI E METODI	56
I campioni di spezie ed erbe aromatiche utilizzati.....	56
Metodi di analisi per l'identificazione di specie mediante DNA	57
Estrazione e purificazione DNA	57
Quantificazione DNA	58
Precipitazione del DNA.....	59
End-point PCR.....	59
Controllo delle amplificazioni mediante elettroforesi su gel d'agarosio	61
Sequenziamento con metodo Sanger	61
Analisi NGS	62
Metodi di analisi per l'identificazione di specie mediante composti volatili.....	66
Estrazione a caldo con ultrasuoni	66
Analisi spettrofotometrica	66
Analisi HPLC.....	66
Analisi Heracles II (ALPHA M.O.S)	67
RISULTATI E DISCUSSIONI	72
DNA barcoding	72
Sequenziamento con metodo Sanger	76
NGS.....	84

Analisi di fingerprinting	93
CONCLUSIONI.....	101
BIBLIOGRAFIA	101

INTRODUZIONE

Autenticità e frodi

In campo alimentare per autenticità si intende la garanzia che un alimento sia stato ottenuto, trasportato e venduto secondo modalità rispondenti a quanto dichiarato. Questo vuol dire che le informazioni iconografiche e testuali, che accompagnano gli alimenti, devono descrivere in maniera accurata l'origine, il contesto ed i metodi produttivi utilizzati.

Le frodi alimentari sono state definite come: “la piaga sociale, frutto dell'imperante egoismo umano di potersi arricchire a danno del prossimo e un crimine odioso che colpisce con l'inganno le categorie più deboli dei consumatori che perciò deve essere combattuto con decisione e coraggio” (Rossi, 2011) La frode, infatti, viene intesa come una condotta illecita dettata da intenzione dolosa e tale da creare danno ad altri.

Nel settore alimentare sono considerate condotte illecite quelle che ledono i diritti sia legali che commerciali del consumatore. Quando ci si riferisce ad una frode alimentare si intende: produzione, commercio, detenzione, vendita o somministrazione di alimenti non conformi alla normativa vigente. L'Articolo 2 del Regolamento (CE) n.178 del 28 gennaio 2002 definisce “alimento” una “qualsiasi sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato ad essere ingerito, o di cui si prevede ragionevolmente che possa essere ingerito, da esseri umani”. Oggi, secondo le normative vigenti, si distingue tra due forme di inganno: la frode sanitaria e la frode commerciale.

- Frode sanitaria: il presupposto della frode è insito nella probabilità o certezza di procurare un danno alla salute dei cittadini, di rendere potenzialmente o sicuramente nocive le derrate alimentari (art. 439 c.p. e L. 30 aprile 1962, n. 283). Il reato si configura anche per il solo fatto di porre in commercio, o anche solo in distribuzione sostanze pericolose.

- Frode commerciale: comprendono tutte le azioni fraudolente sugli alimenti o sulle loro confezioni che, pur non determinando concreto o immediato nocimento per la salute pubblica, favoriscono illeciti profitti a danno del consumatore. Affinché si realizzi una frode in commercio è sufficiente una piccola differenza sull'origine del prodotto o sulla sua provenienza o sulla qualità (art. 515, 516 e 517 c.p.).

Le frodi alimentari sono fra le attività criminose più antiche e più radicate nella storia sociale dell'uomo, si può dire che le frodi siano vecchie come il mondo. Esse trovano origine con la comparsa dei primi scambi commerciali; le più lontane testimonianze risalgono, infatti, all'antico Egitto, dove era prevista la condanna a morte per chi effettuasse frodi alimentari

(Nebbia, 1962). Si possono trovare numerosi esempi di frodi alimentari che ripercorrono la storia dell'uomo fino ai nostri giorni. Ma se da un lato questo crimine continua a trovare terreno fertile sul quale espandersi, è anche vero che dall'altro iniziarono, ben presto, a prendere sempre più piede trattati di denuncia che poi divennero, solo più tardivamente, vere e proprie leggi. Si ricorda la prima legge contro le frodi emanata in Inghilterra nel 1875 e, nello stesso periodo anche in Francia, fu attuato un servizio di repressione frodi, con l'ausilio di laboratori di analisi. In Italia, le prime norme comparvero nel 1888 con la legge Crispi Pagliani, con la quale si istituì il Sistema Sanitario Nazionale e la tutela della salute dei cittadini divenne un dovere dello Stato. Le frodi alimentari, infatti, sono dei fenomeni, che non solo possono mirare la salute e la fiducia dei consumatori, ma questi reati portano a gravi ripercussioni di tipo sociale ed economico.

Le principali cause di frodi alimentari sono: *adulterazioni*, *sofisticazioni*, *alterazioni*, *contraffazioni* (Ministero della Salute, Comando dei Carabinieri).

Le *adulterazioni* sono modifiche non dichiarate (in etichetta) che consistono nell'aggiunta o nella sottrazione volontaria di alcuni componenti. Il danno arrecato al consumatore nella maggior parte dei casi è di tipo economico-commerciale. A volte, questo tipo di comportamento illecito ha sviluppi negativi anche sulla salute del consumatore, qualora egli sia allergico, o intollerante, ad una sostanza illecitamente aggiunta. Si manifesta specialmente in prodotti come carne, pesce e fortemente processati; un esempio è un insaccato dichiarato di puro suino e realizzato con altre specie animali.

Le *sofisticazioni* sono modifiche volontarie della naturale composizione dell'alimento tramite l'aggiunta di sostanze estranee o non consentite, o in eccesso, allo scopo di allungarne il periodo di conservazione o migliorarne l'aspetto. Esempi sono l'aggiunta di solfiti nelle carni per ravvivarne il colore o la vendita di carni congelate per carni fresche.

Le *alterazioni* sono fenomeni spesso accidentali che portano alla modifica della composizione e delle caratteristiche organolettiche di un alimento dovuto a fenomeni degenerativi spontanei o inadeguata/errata modalità di conservazione. Un esempio risulta essere la carne cruda tenuta a lungo ad alte temperature, con conseguenti modificazioni nel colore e nella consistenza.

Le *contraffazioni* sono azioni fraudolente finalizzate a far apparire un alimento diverso da come è nella sua costituzione o a creare un prodotto ex novo apparentemente simile a quello reale. Oltre al danno economico evidente per le aziende che fabbricano il prodotto originale,

anche il consumatore risulta danneggiato, poiché acquista un prodotto dal valore inferiore rispetto a quello pagato.

Altro esempio di frode alimentare è anche quando si utilizzano prodotti di scarto destinati agli animali, come ad esempio le frattaglie, come alimenti idonei all'alimentazione umana (Johnson, 2014).

Organismi e sistemi di controllo

Il ruolo fondamentale delle autorità competenti è quello di monitorare la conformità alle normative vigenti da parte delle aziende e delle imprese che devono attuare delle scelte gestionali capaci da garantire la prevenzione, l'eliminazione o la riduzione del rischio dovuto all'assunzione di alimenti da parte dei consumatori.

In Italia esistono numerosi organismi, i quali, mediante un lavoro sinergico, operano al controllo della filiera e alla prevenzione delle frodi alimentari.

Il Ministero della Salute opera a livello centrale, con la Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione. Sempre a livello centrale si ha il lavoro del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali per il controllo della qualità dei prodotti agroalimentari, e quello del Ministero dell'Economia e delle Finanze, insieme all'Agenzia delle Dogane e la Guardia di Finanza in un'attività più mirata alla prevenzione e repressione delle frodi in ambito fiscale. A livello territoriale, invece, operano le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano, attraverso i Servizi di Igiene degli Alimenti e della Nutrizione (S.I.A.N.) ed i Servizi Veterinari (S.V.) dei dipartimenti di prevenzione delle Aziende Sanitarie Locali (A.S.L.). Infine il controllo analitico di laboratorio viene effettuato dalle Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (A.R.P.A.) e gli Istituti Zooprofilattici (I.Z.P.), oltre che da laboratori privati accreditati.

La tracciabilità e la rintracciabilità

A seguito dell'emergenza dell'encefalopatia spongiforme bovina, BSE o "morbo della mucca pazza", verificatosi nel 1996 e successivamente nel 2000, nasce, nell'Unione Europea, il concetto di tracciabilità, come possibilità di individuare, a partire dalle materie prime che lo compongono, le varie fasi di preparazione e commercializzazione di un prodotto alimentare, con lo scopo ultimo di garantire la sicurezza degli alimenti.

Dal 1° gennaio 2002 (Reg. CE 1760/2000) è stata introdotta una normativa a livello europeo, che ha reso obbligatoria la tracciabilità nella specifica filiera delle carni bovine.

Con il Regolamento 1169/2011, a partire dal 13 dicembre 2014 la dichiarazione sull'origine è diventata obbligatoria anche per carni suine, avicole, caprine ed ovine, oltre che per altri prodotti alimentari. Infatti, la tracciabilità obbligatoria è stata estesa a tutti i prodotti agroalimentari, attraverso il Reg. CE n. 178/2002, che oltre a fissare le procedure nel campo della sicurezza alimentare, stabilisce i principi e i requisiti generali dell'intera legislazione alimentare. Tale Regolamento, come dichiarato nell'Articolo 8, si prefigge di tutelare i consumatori e di costituire una base per consentire agli stessi di compiere scelte consapevoli riguardo gli alimenti che consumano. Esso mira a prevenire le pratiche fraudolente o ingannevoli, l'adulterazione degli alimenti e ogni altro tipo di pratica in grado di indurre in inganno il consumatore.

La rintracciabilità è un principio essenziale che garantisce la valorizzazione dell'intero comparto preso in esame, la tutela degli operatori coinvolti nella filiera, in termini di reddito ed immagine, e dei consumatori, che sempre di più richiedono trasparenza sulle condizioni di produzione e commercializzazione dei prodotti. La rintracciabilità, quindi, rappresenta la capacità di ricostruire la storia di un prodotto o di un mangime, mediante la documentazione e l'identificazione di tutte le fasi di lavorazione, in modo tale da poter identificare l'iter produttivo (Ministero delle politiche agricole, 13° Rapporto monitoraggio etichettatura facoltativa carni bovine., 2015)

Tracciabilità e rintracciabilità sono concetti complementari e permettono la perfetta conoscenza del percorso delle derrate alimentari, dalla sua origine alla sua commercializzazione e viceversa. Esistono due sistemi di tracciabilità dei prodotti alimentari: un sistema di tracciabilità obbligatoria imposto dall'Unione Europea (178/2002, 2002) e un sistema a carattere volontario, più ampio ed articolato, il cui standard di riferimento è rappresentato dall' ISO 22005 (Sistema di Rintracciabilità nella Filiera alimentare e mangimistica).

Lo sviluppo di sistemi avanzati di tracciabilità, pur richiedendo impegni e investimenti anche considerevoli, può offrire numerosi vantaggi e tra questi contribuisce a: facilitare l'identificazione di cause o di eventuali problemi e mettere in atto opportune azioni correttive, limitare i costi e i danni grazie alle azioni correttive adottate, agevolare l'identificazione ed il controllo di effetti indesiderati e a lungo termine sull'ambiente e sulla salute delle persone e degli animali, procedere a ritiri dal mercato precisi e mirati, fornire una migliore definizione delle parti responsabili, sia all'interno del comparto produttivo, sia nell'ambito dell'intera filiera, migliorare il controllo delle informazioni sull'etichetta.

L'etichettatura

L'etichettatura è lo strumento per eccellenza alla base di uno dei diritti fondamentali del cittadino: il diritto all'informazione. Questo diritto assicura, al consumatore, l'effettiva libertà di scelta dei prodotti che consuma e tutti i mezzi necessari per intraprendere delle scelte consapevoli. Questo risulta importante perché l'assunzione di un alimento può comportare, non solo conseguenze per la salute, come nel caso di allergie, ma può coinvolgere anche aspetti personali legati ad una particolare etica o religione, come nel caso degli OGM, o alla scelta di un ben definito regime alimentare (Ministero delle politiche agricole, 2015).

La normativa a cui ci si riferisce quando si parla di etichettatura è il Reg. CE 1169/2011, il quale ha come obiettivo quello di tutelare la salute del consumatore mediante un'informazione chiara e univoca riguardo la *qualità* di un prodotto.

Non sempre però dare una definizione di qualità risulta semplice. Nel corso degli anni, infatti, questo concetto ha subito molteplici evoluzioni, in concomitanza con il cambiamento delle esigenze dettate dai consumatori. Per prima cosa bisogna dire che esistono diverse tipologie di qualità: igienico-sanitaria, chimico-nutrizionale, legale, organolettica e di origine; quindi, quando si parla di qualità di un alimento, si fa riferimento a numerosi aspetti che concorrono alla "qualità totale" di quel prodotto.

Ad esempio, la norma UNI EN ISO 8402:1995 definisce la qualità come: "l'insieme delle caratteristiche di un'entità che ne determinano la capacità di soddisfare esigenze espresse ed implicite". Queste esigenze possono essere di carattere primario, relative ad aspettative nutrizionali, di salute, di sicurezza, oppure possono essere riconducibili specificatamente al singolo consumatore.

Se da una parte, le aziende ricercano una qualità definita "oggettiva", cioè misurabile e verificabile sul rispetto delle norme vigenti, dall'altra, il consumatore è interessato ad una qualità "percepita", la quale viene determinata da fattori soggettivi ed oggettivi come ad esempio: aspettative dietetiche, culinarie, gastronomiche, di conservabilità.

Nel campo delle produzioni animali, invece, uno dei principali problemi da affrontare riguarda l'identificazione di specie. Insieme a quest'ultima, anche l'origine geografica e i metodi di produzione rappresentano importanti aspetti in grado di produrre informazioni preziose nella valutazione dell'autenticità (Moretti, 2003).

Le spezie e le erbe aromatiche

L'Organizzazione Internazionale per gli standard di Ginevra (ISO) definisce le spezie e le erbe aromatiche come “Prodotti vegetali o loro miscele, esenti da materie estranee, utilizzati per insaporire, condire e impartire aroma negli alimenti”. Il termine "spezia" è quindi usato per coprire l'utilizzo di molteplici vocaboli quali: spezie, erbe e alcune verdure aromatiche. La classificazione tassonomica delle spezie è mostrata nella Tabella 1 (Peter K. , 2001).

Tabella 1: classificazione tassonomica delle spezie (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Angiospermae	Dicotyledoneae	Sympetalae			
				<i>Solanaceae</i>	chilli, paprika, red pepper
				<i>Pedaliaceae</i>	sesame
		Campalunatae	<i>Compositae</i>	camomile, chicory, tarragon	
		Piperales	<i>Piperaceae</i>	cubebe, long pepper, pepper	
		Ranales	<i>Myristicaceae</i>	mace, nutmeg	
			<i>Lauraceae</i>	bay leaf, cassia, cinnamon	
			<i>Magnoliaceae</i>	star-anise	
		Rhoeadales	<i>Cruciferae</i>	mustard, wasabi	
		Myrtiflorae	<i>Myrtaceae</i>	allspice, clove	
	Umbelliflorae	<i>Umbelliferae</i>	anise, caraway, celery, chervil, coriander, cumin, dill, fennel, parsley		
	Monocotyle- doneae	Liliiflorae	<i>Liliaceae</i>	garlic, onion	
			<i>Iridaceae</i>	saffron	
		Scitamineae	<i>Zingiberaceae</i>	cardamom, ginger, turmeric	
		Orchidales	<i>Orchidaceae</i>	vanilla	

Una convenzionale classificazione delle spezie, basata sul grado del gusto, divide questi condimenti in quattro sottogruppi: a) spezie piccanti; b) spezie delicate; c) spezie aromatiche e d) erbe e verdure aromatiche.

Anche se il termine spezia può essere usato per incorporare erbe aromatiche, la distinzione tra erbe e spezie può essere descritta come segue: *erbe aromatiche*: foglie essiccate di piante aromatiche utilizzate per conferire sapore, odore e a volte colore ai cibi. Le foglie vengono separate dagli steli delle piante ma anche dai gambi delle foglie; *spezie*: parti essiccate di

piante aromatiche ad eccezione delle foglie. Questa definizione è ampia e copre praticamente tutte le parti della pianta.



Figura 1: varie spezie ed erbe aromatiche

Le varie parti della pianta utilizzate per produrre la gamma di erbe e spezie sono mostrate in Tabella 2 (Peter K. , 2001).

Tabella 2: costituenti vegetali di spezie ed erbe aromatiche (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Plant organs	Spice crops
Aril	Mace of nutmeg
Barks	Cassia, cinnamon
Berries	Allspice, black pepper, chilli
Buds	Clove
Bulbs	Onion, garlic, leek
Pistil (female part of flower)	Saffron
Kernel	Nutmeg
Leaf	Basil, bay leaf, mint, marjoram, sage, curry leaf
Rhizome	Ginger, turmeric
Latex from rhizome	Asafoetida
Roots	Angelica, horse-radish
Seeds	Ajowan, aniseed, caraway, celery, coriander, dill, fennel, fenugreek, mustard, poppy seed

Mercati commerciali

L'attuale commercio mondiale annuale di spezie è di 6-700.000 tonnellate con un valore di 3-3,5 miliardi (in USD). Il valore del commercio delle spezie dipende in particolare dai prezzi del pepe; quest'ultimo rimane, infatti, la principale spezia nei commerci internazionali.

Si prevede che il commercio globale delle spezie tenderà ad aumentare di anno in anno di pari passo con la crescente domanda dei consumatori nei paesi importatori, per lo più esotici. Nel Regno Unito, ad esempio, le importazioni di spezie sono aumentate del 27 % negli ultimi cinque anni, principalmente attraverso la crescita della domanda di spezie come cannella, chiodi di garofano, aglio.

Circa l'85 % delle spezie sono commercializzate a livello internazionale in forma di prodotto finito. Il commercio di prodotti semi-lavorati e a valore aggiunto sta crescendo rapidamente: gli importatori cercano un approvvigionamento globale più economico di prodotti speziati in concomitanza ad uno sviluppo tecnologico e ad una rete di sistemi di qualità appropriati. Un punto a favore per i paesi produttori diretti di spezie ed erbe aromatiche risiede nel fatto che ci sia poca concorrenza da parte di produzione sintetiche, ad eccezione della vaniglia; i consumatori comunque prediligono il consumo di ingredienti "naturali" nei prodotti alimentari.

Gli Stati Uniti risulta essere il più grande importatore di prodotti speziati, seguiti da Germania e Giappone. Per quanto riguarda l'Unione Europea, si stima un valore di 2,2 miliardi (in USD) in termini di importazioni composto da:

- 44 % delle vendite al dettaglio ai consumatori
- 41 % delle vendite nel settore della produzione alimentare
- 15 % al settore della ristorazione

Una fotografia della natura del mercato europeo delle spezie è fornita dalla Francia: in totale, il consumo di spezie nel 1993 era di 16.545 tonnellate (con un consumo pro capite di 290 grammi), di cui oltre il 50 % era pepe nero; il settore "retail" rimane il mercato principale, con oltre 100 milioni di confezioni di spezie consumate. Gli scambi in ambito della ristorazione valgono 20-25 milioni di dollari.

Anche le regioni del Medio Oriente e del Nord Africa risultano essere buoni importatori ed esportatori e nuovi mercati, come ad esempio nel Sud Africa, sono destinati a vivere una repentina crescita, mano a mano che le richieste, nel cibo, dei consumatori si spostano verso gusti più esotici (Peter K. , 2001).

Processi tecnologici

Le spezie possono essere aggiunte agli alimenti in diverse forme: come spezie intere, spezie macinate, oli essenziali, oleoresine o infusi di aceto preparati e filtrati. Una più recente alternativa sono gli estratti di spezie: formati essenzialmente dai componenti aromatici di una

spezia, dispersi su di una base. Ad esempio, per l'utilizzo in salamoia, le basi maggiormente utilizzate risultano essere il sale o il destrosio.

Nonostante queste evoluzioni tecnologiche e di processo, per aggiungere sapori ed odori agli alimenti, vengono comunque utilizzati maggiormente composti isolati da oli essenziali. L'estrazione di oli e oleoresine viene effettuata utilizzando una serie di metodi, tra cui:

- distillazione a vapore
- estrazione di idrocarburi
- estrazione con solvente clorurato
- trattamento enzimatico e fermentazione
- estrazione come superossido di biossido di carbonio, che oggi risulta essere su scala commerciale.

I vantaggi riscontrati in un'estrazione di oli essenziali sono: assenza di residui di miscele estraenti, minore quantità di terpeni, maggiori rese e migliore qualità.

Più recentemente, l'uso delle tecniche dell'ingegneria genetica e del DNA ricombinante in batteri e funghi, utilizzati nella fermentazione, ha portato alla nascita di esteri naturali, chetoni e altre sostanze con proprietà aromatizzanti, "fatti su misura". La sintesi di metaboliti secondari in vitro, alternativa all'estrazione dall'intera pianta, potrebbe, in futuro, abbassare i prezzi di mercato delle spezie, più proibitivi se coltivate tradizionalmente. Ci sono stati anche dei miglioramenti nelle tecnologie di conservazione delle spezie, per garantire l'effettiva assenza di una contaminazione microbica e di altra natura.

Con il divieto di trattamenti chimici, come l'ossido di etilene, il metodo dell'irradiazione è cresciuto in popolarità, con una stima di 25.000 tonnellate di spezie crude attualmente irradiate ogni anno, per contrastare le contaminazioni sia da parte di insetti che di microbi. I paesi in cui l'irradiazione delle erbe e spezie si posiziona su scala commerciale risultano essere: Stati Uniti, Canada, Paesi Bassi, Belgio, Francia, Danimarca, Finlandia, Israele, Iran, Repubblica di Corea, Vietnam, Sudafrica e un certo numero di paesi dell'Europa Orientale.

Importanti composti aromatici presenti in erbe aromatiche e altre piante ad uso di spezie sono l'eugenolo (pimento, cannella, cassia, chiodi di garofano), la piperina (pepe nero), il gingerolo (zenzero), la miristicina (noce moscata), il turmerone (curcuma) e la vanillina (vaniglia). I principali composti aromatici trovati nelle erbe e spezie maggiormente utilizzate nel settore alimentare sono riassunti nelle Tabelle 3 e 4 (Peter K. , 2001)

Tabella 3: I principali composti volatili nelle spezie (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Spice	Important flavour compounds
Allspice	Eugenol, β -caryophyllene
Anise	(E)-anethole, methyl chavicol
Black pepper	Piperine, S-3-Carene, β -caryophyllene
Caraway	d-carvone, carone derivatives
Cardamom	α -terpinyl acetate, 1-8-cineole, linalool
Cinnamon, cassia	Cinnamaldehyde, eugenol
Chilli	Capsaicin, dihydro capsaicin
Clove	Eugenol, eugenyl acetate
Coriander	d-linalool, C10-C14-2-alkenals
Cumin	Cuminaldehyde, p-1,3-mentha-dienal
Dill	d-carvone
Fennel	(E)-anethole, fenchone
Ginger	Gingerol, Shogaol, neral, geranial
Mace	α -pinene, sabinene, 1-terpenin-4-ol.
Mustard	Allyl isothiocyanate
Nutmeg	Sabinine, α -pinene, myristicin
Parsley	Apiol
Saffron	Safranol
Turmeric	Turmerone, Zingiberene, 1,8-cineole
Vanilla	Vanillin, p-OH-benzyl-methyl ether

Tabella 4: I principali composti volatili in erbe aromatiche (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Herbal spices	Flavour compounds
Basil, Sweet	Methylchavicol, linalool, methyl eugenol
Bay laurel	1,8-cineole
Marjoram	e- and t-sabinene hydrates, terpinen-4-ol
Oregano	Carvacrol, thymol
Origanum	Thymol, carvacrol
Rosemary	Verbenone, 1-8-cineole, camphor, linanool
Sage, Clary	Salvial-4 (14)-en-1-one, linalool
Sage, Dalmation	Thujone, 1,8-cineole, camphor
Sage, Spanish	e- and t-sabinylacetate, 1,8-cineole, camphor
Savory	Carvacrol
Tarragon	Methyl chavicol, anethole
Thyme	Thymol, carvacrol
Peppermint	1-menthol, menthone, menthufuran
Spear mint	l-carvone, carvone derivatives

Nell'utilizzo di spezie per aromatizzare gli alimenti, l'obiettivo dovrebbe sempre essere quello di arrivare ad un equilibrio globale di odore e sapore, completando ed accentuando il sapore degli ingredienti di base; nessuna singola spezia deve risultare predominante sulle altre o peggio sulla pietanza nella sua totalità. Quest'arte culinaria ha bisogno di esperienza,

competenza e formazione interna con un'assistenza puntuale e rigorosa da parte dei produttori leader di spezie.

Il ruolo funzionale

Le spezie e le erbe aromatiche non sono solo preziose per aggiungere sapore agli alimenti; il loro potere antiossidante, infatti, aiuta anche a preservare gli alimenti dal naturale deterioramento ossidativo, aumentandone così non solo la conservabilità ma anche la qualità. La Tabella 5 (Peter K. , 2001) illustra la gamma di antiossidanti isolati da erbe e spezie.

Tabella 5: principali antiossidanti estratti da spezie ed erbe aromatiche (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Spices and herbs	Systematic names	Substances and type of substances
Rosemary	<i>Rosemarinus officinalis</i>	Carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, rosmanol
Sage	<i>Salvia officinalis</i>	Carnosol, carnosic acid, rosmanol, rosmarinic acid
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Derivatives of phenolic acids, flavonoids, tocopherols
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol, carvacrol, p-cunene-2,3-diol, biphehyls, flavonoids
Ginger	<i>Zingiber officinale</i>	Gingerol-related compounds, diarylheptanoids
Turmeric	<i>Curcuma domestica</i>	Curcumins
Summer savory	<i>Satureja hortensis</i>	Rosemarinic acid, carnosol, carvacrol, thymol
Black pepper	<i>Piper nigrum</i>	Phenolic amides, flavonides
Red pepper	<i>Capsicum annum</i>	Capsaicin
Chilli pepper	<i>Capsicum frutescence</i>	Capsaicin, capsaicinol
Clove	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Eugenol, gallates
Marjoram	<i>Marjorana hortensis</i>	Flavonoids
Common balm	<i>Melissa officinalis</i>	Flavonoids
Licorice	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Flavonoids, licorice phenolics

C'è stata una crescente ricerca sull'uso delle erbe e delle spezie come conservanti naturali; ad esempio, è stato scoperto che il pepe nero macinato riduce l'ossidazione dei grassi contenuti nel maiale cotto. Gli antiossidanti svolgono anche un ruolo di difesa dell'organismo contro malattie cardiovascolari, alcuni tipi di tumori (epiteliali) e altre condizioni patologiche come l'artrite e l'asma.

Composti fenolici, come i flavonoidi (contenuti nel pepe nero, origano, timo e maggiorana), possono aiutare nella protezione contro alcune malattie di natura cardiovascolare e cancro intestinale.

Il gingerolo, nello zenzero, è anche uno stimolante intestinale e promotore della bio-attività delle droghe vegetali. La capsaicina, nel peperoncino, è un efficace anti-irritante usato in prodotti farmaceutici e cosmetici (Parthasarathy, Chempakam, & Zachariah, 2008).

Fieno greco, cipolla e aglio aiutano a ridurre, naturalmente, i livelli di colesterolo nel sangue; un certo numero di spezie, inoltre, possiede proprietà antimicrobiche.

I parametri di qualità nelle spezie ed erbe aromatiche

Nell'industria delle erbe e delle spezie, i termini autenticità e qualità sono spesso considerati sinonimi.

L'autenticità può essere definita sia come libertà dall'adulterazione, cioè assenza di corpi o materia estranea, che libertà da impurità nel prodotto stesso.

Ad esempio, la salvia è definita comunemente come “*Salvia officinalis*”, ma, nel mondo, ci sono circa 300 specie di salvia differenti. Alcune delle principali, che sono attualmente e ampiamente commercializzate in tutto il mondo, come “*Salvia trilobula*” o “*Salvia tomatosa*”, sono accettate universalmente pur non essendo “*Salvia officinalis*”. Situazione analoga succede con il timo: il riferimento comune è “*Thymus vulgaris*” ma la maggior parte del timo commercializzato è una miscela di “*Thymus capitatus*”, “*Thymus serpyllum*” e “*Thymus vulgaris*” e questa miscela è universalmente accettata come timo.

All'interno di una determinata specie, poi, esistono anche diverse cultivar, morfologicamente diverse fra loro, le quali però possono essere tutte commercializzate. Ad esempio, la curcuma è definita come “*Curcuma longa*”, ma ci sono differenti cultivar come la “*Curcuma di Alleppy*”, di un colore rosso scuro-arancio con un aspetto esterno ruvido alla radice, e la “*Curcuma di Cuddapah*” di un colore giallo limone più chiaro con una radice più liscia. Ogni tipo ha la propria nicchia di mercato.

Il termine più appropriato, quindi, quando si parla di spezie ed erbe aromatiche, risulta essere *qualità* che può essere definita come l'idoneità per lo scopo di destinazione finale. Le principali specifiche di qualità sono basate principalmente su erbe e spezie essiccate. Già nell'antichità, infatti, le erbe e le spezie venivano commercializzate come prodotti secchi per ragioni di conservazione. Testimonianza di tali attività commerciali, risalgono a prima della nascita di Cristo, con documenti del 2600 a.C. L'essiccazione era ottenuta per esposizione al sole e questo metodo, nonostante la comparsa di più sofisticate tecnologie, risulta ancora ampiamente usato in diverse zone del mondo. Con l'avvento di moderni metodi di trasporto e di conservazione, anche le erbe congelate e le erbe fresche hanno fatto la loro apparizione nel

mercato attuale. I prodotti essiccati, tuttavia, mantengono inalterata la loro leadership (Peter K. , 2001).

Le principali specifiche internazionali di qualità

Le erbe e, specialmente, le spezie, sono sempre state materie prime ad alto costo e quindi soggette a frodi e adulterazioni. Oggi i due principali standard internazionali sono quelli stabiliti dagli Stati Uniti e dall'Unione Europea (UE). Sono degli standard che si basano essenzialmente sui medesimi parametri di qualità. Tali parametri esistono anche nei paesi esportatori di erbe aromatiche e spezie, per esempio “Indian Spices Board” e “Pepper Marketing Board”.

Esistono varie tipologie di test di controllo che supportano la gamma degli standard internazionali:

- Pulizia: misura della quantità di materia estranea, come contaminazione da insetti, escrementi o corpi estranei.
- Residuo secco: misura del livello di impurità in un prodotto, ottenuto carbonizzando il campione ed eliminando la presenza di materia organica; viene misurato il residuo di cenere, di natura inorganica. Questa misurazione è effettuata incenerendo l'erba o la spezia a 550 °C a peso costante.
- Ceneri acido insolubili (AIA) (o contenuto di sabbia): determinazione della pulizia delle erbe o delle spezie. La misura è di solito fatta in congiunzione con il contenuto di ceneri facendole bollire in HCN e incenerendo il residuo (sempre a 550 °C) ad un peso costante. In passato i procedimenti giudiziari in Europa si basavano sui livelli di cenere insolubile acida (AIA), indice di un prodotto inaccettabilmente sporco.
- Determinazione dell'acidità dell'olio (V/O): misura che aiuta a identificare se l'erba o la spezia è stata adulterata, forse con l'aggiunta di materiali estranei, di bassa qualità. L'erba o la spezia viene bollita sotto riflusso con acqua in cui l'olio si separa sopra la fase acquosa: il volume della fase idrofobica risulta essere proporzionale alla massa del prodotto analizzato.
- Contenuto di umidità: misura della quantità di umidità; questa informazione risulta importante perché ad un peso elevato corrisponde un prezzo più elevato. Il contenuto di umidità è generalmente determinato all'interno dell'industria delle erbe e delle spezie usando la strumentazione Dean & Stark.¹

¹ La strumentazione Dean-Stark, trappola di distillazione o Dean-Stark Head, viene utilizzato in chimica sintetica per raccogliere acqua (o occasionalmente altro liquido) da un reattore. Viene utilizzato in

- Disponibilità di acqua: negli ultimi anni il contenuto di umidità è stato correlato all'attività dell'acqua, espressa in Aw. Un livello di Aw pari a 0,6 è generalmente accettato come misura al di sotto della quale non può verificarsi la comparsa e la crescita di muffe e microbi. Tuttavia, questo parametro è aumentato in diverse erbe e spezie, senza provocare l'insorgere di problemi, a causa dell'effetto conservante degli oli contenuti in esse.

- Misure microbiologiche: esiste una gamma di tecniche disponibili per il conteggio di un agente patogeno in un campione.

- Livelli di pesticidi: poiché l'assunzione giornaliera media da parte dei consumatori di questi prodotti è bassa, i livelli di pesticidi non sono visti come un grave problema. Nell'Unione Europea esiste una legislazione riguardante le erbe aromatiche ma non le spezie. I livelli di pesticidi sono valutati mediante gas cromatografia (GC) o cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), a seconda del pesticida in questione.

- Livelli di micotossine: di particolare preoccupazione sono la aflatossina e l'ocratossina A. Anche per i livelli di micotossine, l'analisi analitica utilizzata per la misurazione risulta essere l'HPLC.

- Densità apparente/indice di massa: misura importante, in particolare nella vendita al dettaglio. Le erbe o le spezie devono essere setacciate o macinate affinché acquisiscano una determinata densità, così che le unità di vendita al dettaglio appaiano soddisfacenti e conformi al peso dichiarato.

- Dimensione delle particelle: molte spezie ed erbe sono macinate per facilitare la dispersione nel prodotto alimentare finale; questo processo aiuta anche la dispersione del sapore. La dimensione delle particelle è generalmente specificato e viene effettuato utilizzando setacci standardizzati.

Esistono numerosi standard approvati a livello internazionale per le procedure di test, stabiliti dalla International Standard Organization (ISO). Questi includono ad esempio: Umidità (ISO 939), Ceneri totali (ISO 928), Acido Insolubile Cenere (ISO 930), Olio volatile (ISO 657) (Peter K. , 2001).

The American Spice Association (ASTA)

L'American Spice Trade Association (ASTA) è stata fondata all'inizio del XX secolo. Dato il suo lungo coinvolgimento nel controllo della qualità delle erbe e delle spezie che entrano negli Stati Uniti, gli standard ASTA sono riconosciuti e sostenuti dagli Stati Uniti.

combinazione con un condensatore a riflusso e un reattore batch per la rimozione continua dell'acqua prodotta durante una reazione chimica eseguita a temperatura di riflusso.

Le specifiche di assenza di corpi estranei sono elencate in maniera dettagliata sia per le erbe aromatiche che per le spezie; ci si riferisce alla quantità consentita di materia estranea o “sporczia”, muffe (visibile), insetti, escrementi e materiale danneggiato dagli insetti. Per *materia estranea* si intende qualsiasi cosa estranea al prodotto stesso, compresi pietre, terra, corda, steli, bastoni, semi estranei non tossici, altro materiale vegetale come foglie estranee, escrementi, letame e animali che apportano contaminazioni. Queste specifiche sono mostrate nella Tabella 6 (Peter K. , 2001).

Tabella 6: Le specifiche di qualità ASTA (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Name of spice, seed or herb	▲ Whole insects, dead by count	Excreta, mammalian by mg./lb.	Excreta, other by mg./lb.	Mould % by wgt.	Insect defiled/infested % by wgt.	Extraneous foreign matter % by wgt.
Allspice	2	5	5.0	2.00	1.00	0.50
Anise	4	3	5.0	1.00	1.00	1.00
Sweet basil	2	1	2.0	1.00	1.00	0.50□
Caraway	4	3	10.0	1.00	1.00	0.50
Cardamom	4	3	1.0	1.00	1.00	0.50
Cassia	2	1	1.0	5.00	2.50	0.50
Cinnamon	2	1	2.0	1.00	1.00	0.50
Celery seed	4	3	3.0	1.00	1.00	0.50
Chillies	4	1	8.0	3.00	2.50	0.50
Cloves*	4	5	8.0	1.00	1.00	1.00*
Coriander	4	3	10.0	1.00	1.00	0.50
Cumin seed	4	3	5.0	1.00	1.00	0.50
Dill seed	4	3	2.0	1.00	1.00	0.50
Fennel seed	SF(2)	SF(2)	SF(2)	1.00	1.00	0.50
Ginger	4	3	3.0	SF(3)	SF(3)	1.00
Laurel leaves†	2	1	10.0	2.00	2.50	0.50
Mace	4	3	1.0	2.00	1.00	0.50
Marjoram	3	1	10.0	1.00	1.00	1.00□
Nutmeg (broken)	4	5	1.0	SF(4)	SF(4)	0.50
Nutmeg (whole)	4	0	0.0	SF(5)	SF(5)	0.00
Oregano‡	3	1	10.0	1.00	1.00	1.00□
Black pepper	2	1	5.0	SF(6)	SF(6)	1.00
White pepper¶	2	1	1.0	SF(7)	SF(7)	0.50
Poppy seed	2	3	3.0	1.00	1.00	0.50
Rosemary leaves	2	1	4.0	1.00	1.00	0.50□
Sage‡	2	1	4.0	1.00	1.00	0.50
Savory	2	1	10.0	1.00	1.00	0.50□
Sesame seed	4	5	10.0	1.00	1.00	0.50
Sesame seed, hulled	4	5	1.0	1.00	1.00	0.50
Tarragon	2	1	1.0	1.00	1.00	0.50□
Thyme	4	1	5.0	1.00	1.00	0.50□
Turmeric	3	5	5.0	3.00	2.50	0.50

Il livello di contaminanti consentito da queste specifiche deve essere inferiore ai livelli mostrati nella Tabella 6, eccetto per la colonna "Insetti interi, morti" che deve non superare il limite indicato. Le erbe e le spezie che non soddisfano questo standard devono essere ripulite/ri-condizionate per consentirne la distribuzione e la vendita negli Stati Uniti.

L'ASTA stabilisce anche una serie di altri standard. Questi sono sostanzialmente comparabili a quelli emanati dalla European Spice Association (ESA).

Gli standard microbiologici in particolare svolgono ora un ruolo sempre più importante per la determinazione della qualità delle spezie ed erbe. Attualmente ci sono tre principali metodi di controllo:

- Negli Stati Uniti, il controllo microbiologico è esercitato principalmente da fumigazione con ossido di etilene, un gas battericida. A volte multi-fumigazioni sono utilizzate per ottenere una soddisfacente riduzione microbiologica.
- L'irradiazione è consentita per il controllo microbiologico di erbe e spezie in molti paesi del mondo. Tuttavia, l'uso del processo deve essere dichiarato sulla confezione.
- Negli ultimi anni la preoccupazione per i residui lasciati dall'ossido di etilene ha portato al divieto di utilizzo in alcune regioni del mondo, come ad esempio all'interno dell'Unione Europea. Ciò ha portato all'utilizzo del trattamento termico per decontaminazione, generalmente utilizzando vapore ad alta pressione in apparecchiature altamente specializzate.

The European Spice Association (ESA)

Gli standard in Europa sono stabiliti dall'ESA e si basano sia su norme nazionali, come quelle emesse dall'AFNOR (l'autorità francese per le norme) o dal BSI (British Standards Institute), sia su standard internazionali emessi dall'ISO.

Gli standard minimi di qualità generali dell'ESA, per tutte le erbe e le spezie sono riepilogati nella Tabella 7 (Peter K. , 2001).

Tabella 7: Gli standard minimi di qualità ESA (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Subject	
Extraneous matter	Herbs 2%, Spices 1%
Sampling	(For routine sampling) Square root of units/lots to a maximum of 10 samples. (For arbitration purposes) Square root of all containers e.g. 1 lot of pepper may = 400 bags, therefore square root = 20 samples.
Foreign matter	Maximum 2%
Ash	See Table 2.3
Acid insoluble ash (AIA)	See Table 2.3
Moisture content (H ₂ O)	See Table 2.3
Packaging	Should be agreed between buyer and seller. If made of jute and sisal, they should conform to the standards set by CAOBISCO Ref C502-51-sj of 20-02-95.
Heavy metals	Shall comply with national/EU legislation.
Pesticides	Shall be utilised in accordance with manufacturers' recommendations and good agricultural practice and comply with existing national and/or EU legislation.
Treatments	Use of any EC approved fumigants in accordance with manufacturers' instructions, to be indicated on accompanying documents. (Irradiation should not be used unless agreed between buyer and seller.)
Microbiology	Salmonella absent in (at least) 25g. Yeast and moulds 10 ⁵ /g target, 10 ⁶ /g absolute maximum <i>E. Coli.</i> 10 ² /g target, 10 ³ /g absolute maximum Other requirements to be agreed between buyer and seller.
Off odours	Shall be free from off odour or taste.
Infestation	Should be free in practical terms from live and/or dead insects, insect fragments and rodent contamination visible to the naked eye (corrected if necessary for abnormal vision).
Mycotoxins	<i>Aflatoxins</i> Should be grown, harvested, handled and stored in such a manner as to prevent the occurrence of aflatoxins or minimise the risk of occurrence. For capsicum species, piper species, nutmegs, turmeric and ginger, the maximum permitted EC levels from 1 July 2001 are total aflatoxin 10ppb maximum, and B1 5ppb maximum. <i>Ochratoxin A</i> Should be grown, harvested, handled and stored in such a manner as to prevent the occurrence of ochratoxin A or minimise the risk of occurrence.
Volatile oil (V/O)	See Table 2.3.
Adulteration	Shall be free from.
Bulk density	To be agreed between buyer and seller.
Water activity	To be agreed between buyer and seller
Species	To be agreed between buyer and seller.
Documents	Should provide: details of any treatments the product has undergone; name of product; weight; country of origin; lot identification/batch number; year of harvest.

I sistemi di garanzia della qualità

I sistemi di garanzia della qualità (QA) per le materie prime dovrebbero essere pianificati e documentati utilizzando i principi dell'analisi dei rischi e dei punti critici di controllo (HACCP). Il sistema di garanzia deve iniziare con una tracciatura completa delle materie prime concordata con il fornitore, dove questo è possibile. Questa specifica deve essere supportata da una verifica del fornitore (audit) per controllare l'esperienza di quest'ultimo e la dotazione di un buon apparato tecnologico e di qualità. In molti casi, tuttavia, data la mancanza di infrastrutture e risorse all'interno di molti paesi fornitori, i produttori sono incapaci di rispettare tutti gli aspetti di una specifica. In queste circostanze quindi, l'acquisto del materiale deve basarsi su sistemi efficaci di controllo della qualità.

Il materiale importato deve essere ispezionato alla consegna. La prima ispezione deve essere un'ispezione globale del prodotto appena il carico è reso accessibile. Questo primo controllo è fatto per cercare contaminazioni su larga scala come crescita di muffe, infestazioni da roditori, confezioni inaccettabili o inadatte che potrebbero portare ad una contaminazione della spezia.

Il sistema di controllo della qualità deve, inoltre, includere il campionamento e l'esame del materiale grezzo. Questo dovrebbe inizialmente essere fisico e esaminare la quantità di polvere (con l'ausilio di setacci), la quantità di gambi, stelo, materia estranea, ecc. e soprattutto il colore, il sapore e l'aspetto generale del prodotto. Si opera quindi un back-up generale con test specifici per l'umidità, le ceneri, le ceneri insolubili acide, ecc.

Si passa, infine, a test microbiologici per valutare la presenza di *Salmonella* ed *Escherichia coli*. Durante questo periodo, il prodotto deve essere messo in quarantena; il materiale inaccettabile deve essere rifiutato e solo in alcuni casi può essere ricondizionato (ad es. ripulito, asciugato, ecc.) per catalogarlo, in seguito, come conforme.

All'interno del sistema di controllo della qualità sono presenti anche procedure per la rimozione di tutti i tipi di metallo: questo consiste nell'uso di metal detector o magneti sia durante la fase di lavorazione sia durante la fase immediatamente precedente all'imballaggio (Peter K. , 2001).

Lo zafferano, una spezia a rischio adulterazione

Lo zafferano è la spezia più costosa del mondo, si ottiene dagli stigmi² del fiore “*Crocus sativus*”, conosciuto anche come zafferano vero, una pianta della famiglia delle Iridacee. La pianta di zafferano vero cresce fino a 20–30 cm e produce fino a quattro frutti, ognuno con tre stigmi color cremisi intenso.

Lo zafferano, è originario della Grecia o dell'Asia Minore e fu coltivato per la prima volta proprio in Grecia. Si è diffuso lentamente per la maggior parte dell'Eurasia e più tardi è stato portato in aree del Nord Africa, dell'America del Nord e dell'Oceania.

La sua storia documentata comincia con un trattato botanico assiro del VII secolo a.C. compilato sotto il regno di Sardanapalo. Attualmente la produzione iraniana di zafferano rappresenta il 90 % di quella mondiale (Peter K. , 2001).



Figura 2: pistilli di zafferano

La pianta “*Crocus sativus*”

La forma domestica del croco da zafferano, il “*Crocus sativus*”, è una pianta perenne delle Angiosperme che fiorisce in autunno, la cui forma selvatica è sconosciuta. Progenitore potrebbe essere il “*Crocus cartwrightianus*”, anch'essa angiosperma dalla fioritura autunnale, originaria della zona orientale del bacino mediterraneo. La forma domestica si è probabilmente originata quando il “*C. cartwrightianus*” è stato sottoposto ad un'intensiva selezione artificiale da parte di agricoltori alla ricerca di stigmi più lunghi. Altri possibili progenitori della pianta sono il “*C. thomasi*” e il “*C. pallasii*”.

La pianta è una forma sterile triploide, contenente tre copie di ogni cromosoma omologo a costituire il corredo genetico. Essendo la pianta sterile, i fiori non riescono a riprodursi attraverso i semi, dovendo fare affidamento all'intervento umano: gruppi di *cormi*, organi simili a bulbi, del diametro di 5 cm che si trovano sottoterra e immagazzinano amido, devono

² In botanica, la parte superiore del pistillo su cui si posa il granulo pollinico.

essere scavati, divisi e ripiantati. Un cormo sopravvive per una stagione, producendo con la sua divisione vegetativa fino a dieci piccoli cormi che possono svilupparsi in nuove piante nella stagione successiva. I cormi sono avvolti in una densa rete di fibre parallele, rivestimento chiamato "tunica del cormo". Il cormo, inoltre, sostiene delle fibre verticali sottili e simili ad una rete che crescono fino a 5 cm al di sopra del collo della pianta.

La pianta cresce fino a 20–30 cm in altezza e da essa germogliano 5-11 catafilli, foglie bianche e non fotosintetiche. Queste strutture coprono e proteggono come membrane le 5-11 foglie vere del croco quando sbocciano e si sviluppano. Queste ultime sono verdi, sottili, dritte e lanceolate, con un diametro di 1–3 mm e possono svilupparsi contemporaneamente o successivamente alla fioritura. L'asse dei fiori ha delle piccole brattee, foglie specializzate che germogliano dallo stelo del fiore, il pedicello. Dopo l'estivazione in primavera, la pianta emette le sue foglie vere, ognuna lunga fino a 40 cm. In autunno compaiono le gemme viola. Solo nel mese di ottobre, dopo che la maggior parte delle altre piante ha liberato i propri semi, si sviluppano dei fiori dal colorito brillante che varia tra una leggera sfumatura pastello di lilla e una malva più scuro e screziato. I fiori hanno un profumo dolce, simile al miele. Appena terminata la fioritura, le piante raggiungono un'altezza media minore di 30 cm. Da ogni fiore spunta uno stilo a tre punte, ognuna delle quali termina con uno stigma cremisi intenso alto 25–30 mm (Peter K. , 2001).



Figure 3: la pianta "*Crocus sativus*" e sue componenti

La coltivazione

Il "*Crocus sativus*" cresce molto bene nella macchia mediterranea e in climi caldi e secchi, dove la brezza estiva soffia su terre semi-aride. Può, tuttavia, sopravvivere anche a inverni freddi, tollerando temperature fino a -10 °C e brevi periodi di neve. La pianta sopravvive male in condizioni d'ombra, crescendo al meglio quando è esposta alla piena luce solare. Il "C.

sativus” preferisce suoli argilloso-calcarei friabili, a bassa densità, ben irrigati e ben drenati e con alto contenuto organico.

Le zone di coltivazione principale risultano essere Iran (90 % della produzione mondiale), Spagna e Grecia; abbondanti piogge primaverili ed estati più secche costituiscono un clima ottimale. Un'umidità persistente e condizioni di forte caldo danneggiano le coltivazioni; conigli, topi ed uccelli causano danni scavando i cormi.

La semina viene effettuata principalmente a giugno nell'emisfero settentrionale, dove i bulbi vengono piantati ad una profondità di 7–15 cm; le radici, lo stelo e le foglie possono svilupparsi tra ottobre e febbraio. La profondità e lo spazio tra i cormi sono fattori critici nel determinare i raccolti: cormi "madre" piantati più in profondità producono zafferano di alta qualità, ma formano meno boccioli e cormi "figli". Gli agricoltori italiani ottimizzano la resa dei pistilli piantando a 15 cm di profondità e in file a una distanza di 2–3 cm; una profondità di 8–10 cm ottimizza invece la produzione di fiori e cormi.

All'incirca 150 fiori fruttano 1 g di pistilli di zafferano secchi; per produrre 12 g di zafferano secco (o 72 g umido e raccolto da poco) è necessario 1 kg di fiori. Un fiore appena colto ha una resa media di 30 mg di zafferano fresco o 7 mg di zafferano secco (Peter K. , 2001).

In Italia lo zafferano viene prodotto in diverse regioni, con il riconoscimento di denominazione di origine protetta per lo zafferano aquilano (Abruzzo, provincia dell'Aquila), lo zafferano di Sardegna (provincia del Sud Sardegna) e lo zafferano di San Gimignano (Toscana, provincia di Siena). Altre zone di coltivazione nella penisola sono a Montegiorgio, nelle Marche, e a Cascia e Città della Pieve, in Umbria.



Figura 4: la raccolta dello zafferano

I metaboliti secondari dello zafferano

Lo zafferano contiene più di 150 composti volatili ed aromatici ed ha anche svariati composti attivi non volatili, molti dei quali sono carotenoidi, come zeaxantina, licopene ed α - e β -carotene.

Sono 4 composti chimici che gli conferiscono le sue specifiche qualità organolettiche: la crocetina, la crocina, la picrocrocina ed il safranale. Queste quattro molecole derivano tutte da un unico precursore: il carotenoide zeaxantina, mostrato in Figura 5.

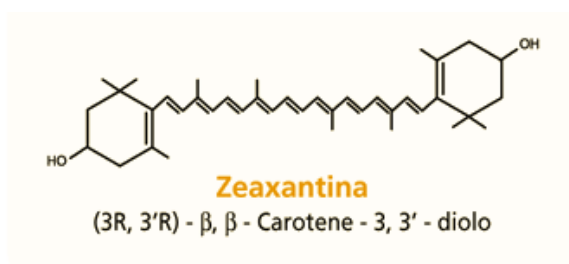


Figura 5: struttura Lewis carotenoide zeaxantina

La crocetina è un carotenoide abbastanza inusuale, caratterizzato da una catena di 20 atomi di carbonio e dalla presenza di due gruppi carbossilici, posizionati uno ad ogni capo della catena. Questi gruppi funzionali possono andare incontro a reazioni di esterificazione che nello zafferano coinvolgono preferenzialmente una particolare struttura zuccherina: il diglicoside β -D-genziobiosio.

Tale reazione, il cui schema è riportato nella Figura 6, genera la crocina, la quale è la forma glicosilata idrosolubile della crocetina, che determina il colore rosso intenso tipico dello zafferano (Carmona, Zalacain, Salinas, & Alonso, 2007).

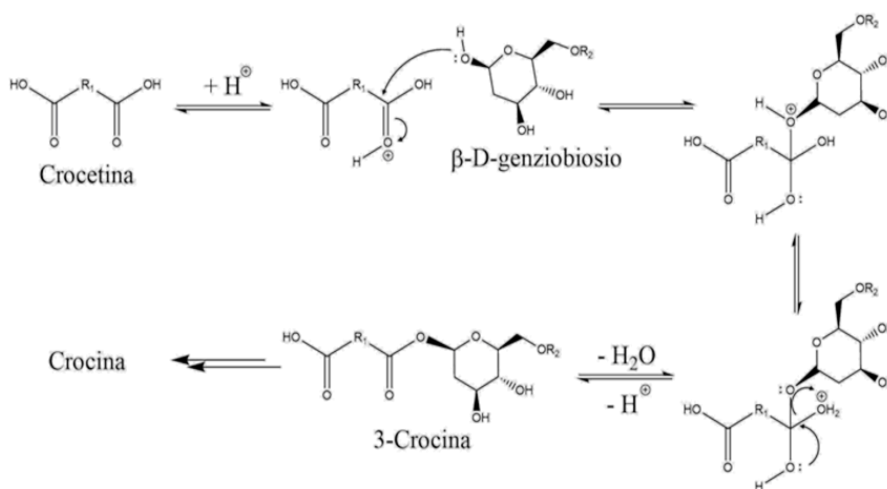


Figura 6: schema di reazione di esterificazione della crocetina in crocina

Oltre alla zeaxantina, crocetina ed alla crocina, nello zafferano sono presenti molti altri carotenoidi; tra questi i più rappresentativi sono la γ -crocetina, l' α -carotene, il β -carotene ed il licopene (Figura 7).

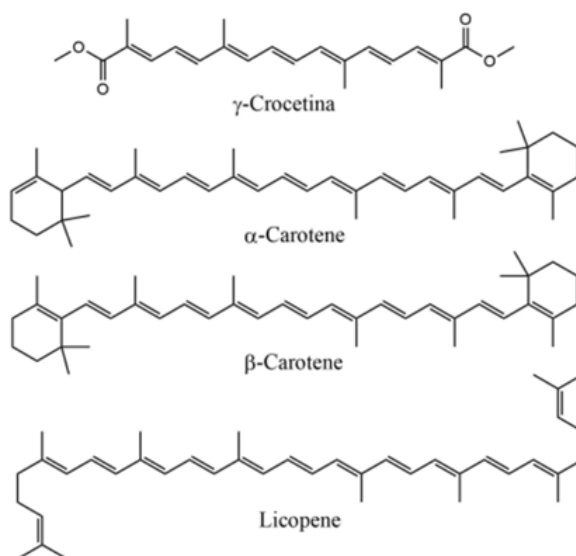


Figura 7: carotenoidi minoritari preponderanti

Responsabile dell'odore caratteristico dello zafferano è il safranale, principale componente volatile, il sapore amaro, invece, è dovuto alla presenza di picrocrocina, la quale è la forma glicosilata del safranale (Maggi, Carmona, Sánchez, & Alonso, 2010).

Nello zafferano sono presenti anche molti altri metaboliti secondari tra cui alcaloidi, saponine, fitosteroli e flavonoidi. I principali flavonoidi rilevati risultano essere: la rutina, la esperidina, la luteolina e la quercetina, le cui strutture di Lewis sono riportate nella Figura 8.

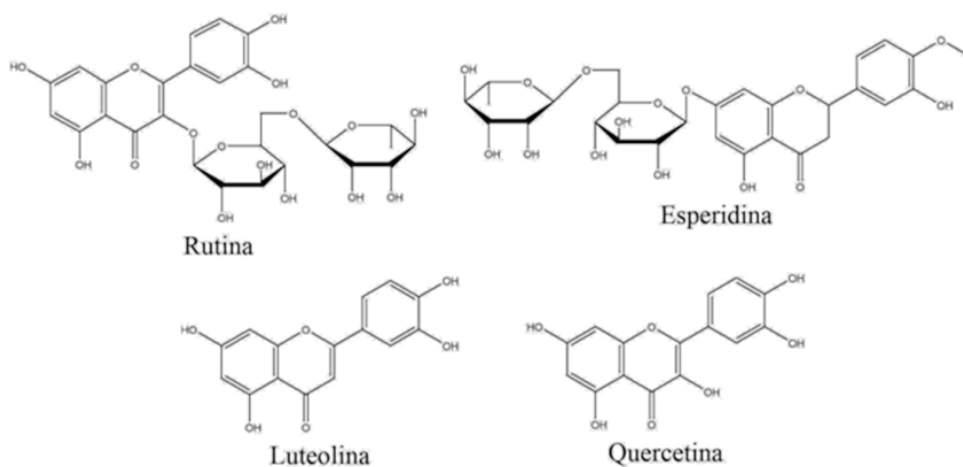


Figura 8: principali flavonoidi presenti nello zafferano

I composti volatili dello zafferano

Il principale composto volatile dello zafferano è il safranale. Questa aldeide di natura monoterpenuca si origina dalla picrocrocina per idrolisi chimica e/o enzimatica durante il processo di essiccamento e stoccaggio della spezia, come riportato nella Figura 9.

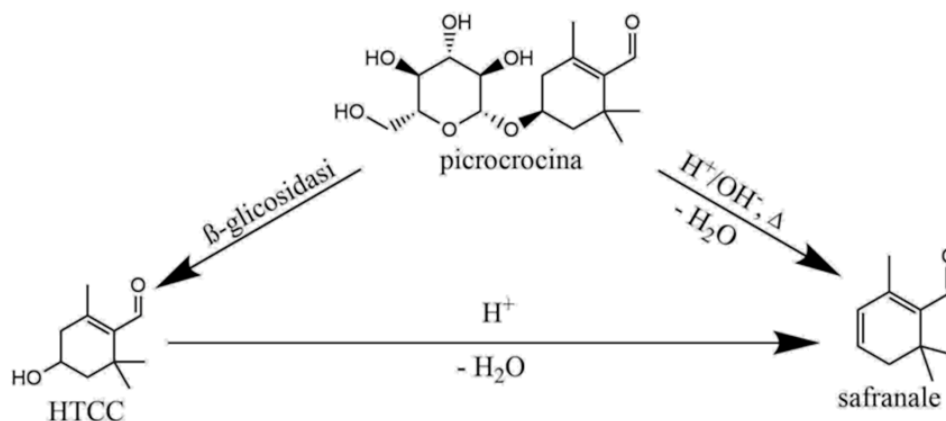


Figura 9: schema reazione safranale

Tuttavia il caratteristico profumo dello zafferano non è dovuto esclusivamente a tale specie. Infatti, nella letteratura scientifica sono stati identificati più di 150 composti volatili minoritari che prendono parte a definire l'aroma complessivo della spezia. Queste molecole si possono raggruppare in due categorie: quelle molecole che presentano una struttura simile al safranale come isoforone, 4-ketoisoforone, 2,2,6-trimetil-1,4-cicloesandione, 2-idrossi-3,5,5-trimetilcicloes-2-en-1,4-dione, 4-idrossi-3,5,5-trimetil-2-cicloesen-1-one, 4-idrossi-2,6,6-trimetil-3-ossocicloesa-1,4-diene-1-carbossaldeide e 4-idrossi-2,6,6-trimetil-1-cicloesen-1-carbossaldeide; i composti generati da carotenoidi lipofili e identificabili dalla presenza di tredici atomi di carbonio, chiamati norisoprenoidi C13. Alcuni esempi di tali composti sono il E-4-(2,6,6-trimetil-cicloesil)-but-3-en-2-one, il 3-[(E)-but-1-enil]-2,4,4-trimetil-cicloes-2-enol, il 3-(but-1-enil)-2,4,4-trimetilcicloesan-1-ol e il (E)-4-(2,2,6-trimetil-7-ossabicyclo-[4.1.0]-eptan-1-il)-but-3-en-2-one.

La composizione chimica quali-quantitativa dei composti volatili nella spezia di zafferano è estremamente variabile in quanto dipende da diversi fattori come, ad esempio, le condizioni ambientali e climatiche di crescita del fiore, il terreno, la stagione di raccolta, l'origine geografica ed il metodo di essiccazione.

Gli usi

In tempi moderni lo zafferano viene usato quasi esclusivamente come condimento culinario e come colorante alimentare. La gamma di alimenti aromatizzati con lo zafferano è ampia: da quelli tradizionali come il pollo, il vitello, il riso, la maionese a quelli più fantasiosi come i formaggi e alcune tipologie di liquori. Nell'industria alimentare è uno degli ingredienti disidratati base in miscele alimentari, zuppe, gelati e altri prodotti alimentari altamente trasformati.

Numerosi sono gli esempi di utilizzo dello zafferano in ambito culinario. La cucina spagnola e italiana utilizzano lo zafferano; un esempio è il piatto tradizionale della cucina spagnola, la paella, una pietanza a base di riso carne e pesce mentre in Italia, il risotto alla milanese è sicuramente uno dei massimi esempi di utilizzo dello zafferano come condimento.

Lo speciale pane di Natale e panini con lo zafferano sono molto diffusi in Svezia così come le torte allo zafferano sono un'altra specialità in alcune parti dell'Inghilterra. Molti piatti della cucina indiana utilizzano lo zafferano per conferire loro un colore ricco e un sapore caratteristico e riconoscibile. Nei paesi arabi, inoltre, i visitatori sono accolti con una bevanda a base di caffè, zafferano e cardamomo mentre in Giappone viene impiegato per migliorare il gusto del pesce e conferirgli un colore giallo dorato. Nel mondo occidentale viene anche utilizzato come tonico per la salute.

Lo zafferano, però, non viene utilizzato solamente in ambito alimentare, ma anche in quello tessile. Nel mondo antico, i pigmenti usati come colorante erano rari e molto costosi, considerati come simboli di status spesso riservati ai reali; il manto di zafferano dei re d'Irlanda e materiale color zafferano fornito dai fenici ai re d'Assiria sono buoni esempi. Tuttavia, lo zafferano come colorante, oggi, è stato sostituito da composti sintetici a causa del prezzo elevato della spezia.

Lo zafferano è anche usato come profumo e nei cosmetici: grazie al safranale, la fragranza acquisisce un gusto piacevole e delicato tanto che i greci lo consideravano un profumo sensuale. Era disseminato in piazze greche, tribunali, teatri e in epoca romana nei bagni; a Roma le strade erano cosparse di zafferano quando Nerone entrò in città. Nel Medio Oriente lo zafferano viene utilizzato per preparare un profumo a base di olio chiamato "Zafran Attar", una miscela di zafferano e sandalo. La spezia viene impiegata anche in alcuni tipi di incenso.

Oggi giorno l'uso dello zafferano nell'industria cosmetica sta aumentando grazie ai suoi principi attivi e alla tendenza ad utilizzare sempre più prodotti naturali nelle formulazioni (Peter K. , 2001).

Il ruolo in medicina

Il papiro di Ebers (intorno al 1550 a.C.) menziona lo zafferano come ingrediente in una cura per i problemi nefrologici. Ippocrate, Teofrasto e Galeno lo consideravano uno stimolante dell'appetito, un valido aiuto per alleviare i disturbi digestivi e un buon calmante per i bambini.

Lo zafferano è, anche, un rimedio popolare per vari tipi di cancro. Gli estratti dello zafferano sono stati segnalati come inibitori per la crescita delle cellule tumorali umane. In particolare, le crocine, carotenoidi solubili in acqua, sono i componenti più promettenti della spezia da usare come agenti terapeutici nella lotta contro il cancro.

La presenza della crocetina nello zafferano aiuta indirettamente a ridurre i livelli di colesterolo nel sangue. Questo risultato è stato collegato alla bassa incidenza di malattie cardiovascolari in alcune parti della Spagna, dove il consumo di zafferano è molto abbondante.

In piccole dosi è considerato anodino, anti-isterico, antisettico, antispasmodico, afrodisiaco, balsamico, cardiotonico, carminativo³, diaforetico⁴, emmenagogo⁵, espettorante⁶, nervino, sedativo, stimolante e stomachico⁷.

In India, lo zafferano è usato come erba in medicinali ayurvedici che curano una varietà di malattie che vanno dall'artrite all'impotenza e alla sterilità, per i disturbi della vescica, dei reni e del fegato e anche per il colera.

Lo zafferano è anche impiegato per curare l'asma e la tosse, utile per il raffreddore, per trattare l'alcolismo e per curare l'acne e vari disturbi della pelle.

È noto avere proprietà afrodisiache ed è ampiamente impiegato in Asia e in Medio Oriente in quanto tale. Anche la medicina cinese e tibetana trova molti usi per lo zafferano. Se sciolto con miele in acqua, durante la notte, agisce come un diuretico. Pestato con burro chiarificato viene utilizzato per il trattamento di pazienti diabetici.

Lo zafferano mescolato con oppio, cannella e chiodi di garofano, comunemente noto come "laudanum" era una volta usato come analgesico e antidiarroico; mescolato, invece, con cannella, buccia di arancia, petali di rosa, miele e tuorlo d'uovo è stato impiegato, nell'antico Iran, come tonico per il corpo.

³ Medicamento che promuove l'espulsione dei gas dallo stomaco e dall'intestino.

⁴ Sostanza che ha il potere di favorire la sudorazione.

⁵ Principi attivi, farmaci, o rimedi fitoterapici, in grado di stimolare l'afflusso di sangue nell'area pelvica e nell'utero, e, in alcuni casi, di favorire la mestruazione.

⁶ Principi attivi e farmaci, fitoterapici o di sintesi, capaci di promuovere la rimozione di muco

⁷ Cibo o medicamento dotato di azione tonica e corroborante per lo stomaco.

Dosi elevate di zafferano (> 5 g) sono narcotiche (Peter K. , 2001).

Le pratiche di adulterazione

Le pratiche di adulterazione più comuni dello zafferano sono le seguenti (Alonso, Carmona, Zalacaina, & Sarasa Del Gado, 1999) (Alonso, Salinas, & Garijo, 1998):

1. falsificare il luogo d'origine. Lo zafferano di diverse zone o regioni della Spagna o di altri paesi viene venduto come "zafferano Mancha", (la Mancía è una particolare regione della Spagna), una tipologia di zafferano con la migliore qualità del mondo.
2. mescolare la spezia con estratto di zafferano, zafferano esausto⁸ o con altre parti della pianta dello zafferano.
3. aggiungere altre parti del fiore di zafferano, stami o corolle tinti tagliati a strisce.
4. aggiungere sostanze varie per aumentarne il peso: sciroppi, miele, glicerina, oli, solfato di bario, carbonato di calcio, gesso, idrossido di potassio, salnitro, sale di Glauber, sale di Seignette, borace, lattosio, amido o glucosio
5. unire altre piante, come i petali essiccati di cartamo (Zafferano messicano o "*Carthamus tinctorius*") e calendula scozzese ("*Calendula officinalis*"); stimate di altre specie di *Crocus*, solitamente più corte e senza proprietà coloranti, come "*Crocus vernus*" e "*Crocus speciosus*", fiori di papaveri ("*Papaver rhoeas*"), melograno ("*Punica granatum*"), arnica ("*Arnica montana*"), stami di alcune specie di garofano (*Dianthus* sp.), pepe rosso macinato ("*Capsicum annum*"), piccole radici di porro ("*Allium porrum*"), polvere di sandalo ("*Pterocarpus santalinus*") e curcuma ("*Curcuma longa*").
6. aggiungere fibre di carne salata e secca.
7. incorporare prodotti artificiali come gelatina colorata o sostanze coloranti organiche come tropeolina, fucsina, acido picrico e prodotti coloranti.

Poiché lo zafferano è la spezia più costosa al mondo, sono state introdotte molteplici norme di controllo della qualità al fine di evitare queste adulterazioni. Le normative ISO sono le norme di controllo della qualità attualmente applicate nella commercializzazione internazionale dello zafferano (ISO3632-1, 1993).

Gli estratti acquosi di zafferano vengono sottoposti a scansione spettrofotometrica per analizzare tre valori massimi di assorbimento che corrispondono ai componenti che

⁸ Spezia vecchia con un basso livello di composti caratteristici

conferiscono colore, le crocine (440 nm), alla componente amara, picrocrocina (257 nm) e ai componenti volatili come il safranale (330 nm).

Per migliorare questo metodo, si è passati all'utilizzo della cromatografia liquida ad alte prestazioni con rilevatore spettrofotometrico a serie di diodi (HPLC-DAD), usato per separare picrocrocina, isomeri della crocina e safranale. Questo metodo, accoppiato con spettrometria di massa, è adatto per la determinazione di picrocrocina, safranale e flavonoidi.

Sono stati, inoltre, sviluppati metodi per le analisi delle componenti aromatiche dello zafferano e la tecnica con i migliori risultati risulta essere la "Thermal desorption-gas chromatography mass spectrometry" (TD-GC / MS) (Alonso, Salinas, & Garijo, 1998) (Tarantilis & Polissiou, 1997) (Alonso, Salinas, Esteban Infantes, & Sanchez Fernandez, 1996).

Lo zafferano è classificato, secondo gli standard ISO (Tabella 8), in quattro categorie a seconda della quantità di sostanze estranee e requisiti chimici definiti.

Alcuni ricercatori hanno dimostrato che il parametro "potere colorante" sia la caratteristica principale da definire per riuscire a classificare i vari campioni di zafferano (Petrakis & Polissiou, 2017).

Tabella 8: categorie di zafferano secondo standard ISO (da K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 2001)

Specifications	Stigmata	Powdered
Total ashes (%) (w/w), dry matter, max.	8	8
Moisture and volatiles (%) (w/w), max.	12	10
Insoluble ashes in acids (%) (w/w), dry matter, max.		
Categories I and II	1.0	1.0
Categories III and IV	1.5	1.5
Water solubility (%) (w/w), dry matter, max.	65	65
Bitterness, picrocrocin absorbance at 257 nm, dry matter, min.		
Category I	70	70
Category II	55	55
Category III	40	40
Category IV	30	30
Safranal absorbance at 330 nm, dry matter, all categories		
Min.	20	20
Max.	50	50
Colouring strength, crocins absorbance at 440 nm, dry matter		
Min.		
Category I	190	190
Category II	150	150
Category III	110	110
Category IV	80	80
Crude fibre (%) (w/w), dry matter, max.	6	6
Total nitrogen (%) (w/w), dry matter, max.	3.0	3.0

Source: Adapted from International Standards Organization, Geneva, 1993.

Metodi analitici per la ricerca di adulterazioni nelle spezie

Per confermare l'autenticità di un prodotto sono necessarie tecniche analitiche veloci, affidabili e competenti. Dal 1980 al 2010, i due metodi più usati per la rivelazione di una adulterazione in matrici alimentari sono stati la cromatografia liquida e la spettroscopia ad infrarossi.

L'analisi ottica e la microscopia sono comuni metodi utilizzati per rilevare l'adulterazione in erbe e spezie come segnalato dal British Retail Consortium, dalla Food and Drink Federation e dalla Seasoning and Spice Association in "Guidance on Authenticity of Herbs and Spices".

Tutte queste operazioni richiedono esperti altamente qualificati e tempi lunghi per il loro svolgimento; di conseguenza, la ricerca di nuovi metodi più veloci ed efficaci per il rilevamento di adulterazioni nelle spezie e erbe aromatiche è di notevole importanza (Galvin-King, Simon, & al., 2018).

I metodi che oggi vengono utilizzati per il rilevamento delle adulterazioni sono elencati nella Tabella 9.

Tabella 9: metodi per il rilevamento di adulteranti in spezie ed erbe aromatiche (da P. Galvin-King et al., Food Control 88, 2018)

Ingredient	Adulterant	Reference	Detection Methods	Chemometrics
Saffron	<i>Carthamus tinctorius</i> , <i>Chrysanthemum x morifolium</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Nelumba nucifera</i>	(Huang, Li, Liu and Long, 2015)	DNA barcoding	
Black pepper	Chilli	(Parvathy, Swetha, Sheeja, Leela, Chempakam and Sasikumar, 2014)	DNA barcoding	
Saffron	Safflower	(Babaei, Talebi and Bahar, 2014)	SCAR and ITS Multiplex PCR	
Saffron	Saffron	(Jiang, Cao, Yuan, Chen, Jin and Huang, 2014)	Barcoding Melting Curve	
Chilli	Dried red beet pulp and powdered <i>Ziziphus nummularia</i> fruits	(Dhanya, Syamkumar, Siju and Sasikumar, 2011a)	PCR-SCAR markers	
Oregano	<i>Satureja montana</i> L. and <i>Origanum majorana</i> L.	(Marieschi, Torelli, Bianchi and Bruni, 2011a)	SCAR-PCR	
Oregano	Olive leaves	(Marieschi, Torelli, Bianchi and Bruni, 2011b)	SCAR-PCR	
Oregano	<i>Cistus incanus</i> L., <i>Rubus caesius</i> L. and <i>Rhus coriaria</i> L.	(Marieschi, Torelli, Poli, Bianchi and Bruni, 2010)	SCAR-PCR	
Saffron	<i>Arnica montana</i> L., <i>Bixa orellana</i> L., <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Carthamus tinctorius</i> L., <i>Crocus vernus</i> L., <i>Curcuma longa</i> L., and <i>Hemerocallis</i> sp.	(Marieschi, Torelli and Bruni, 2012)	SCAR-PCR	
Turmeric	<i>Curcuma zedoaria</i> / <i>Curcuma malabarica</i>	(Dhanya, Syamkumar, Siju and Sasikumar, 2011b)	SCAR-PCR	
Cumin	Almond, peanut, tree nuts, peach and cherry	(Garber et al., 2016)	DNA analysis, Antibody based technology, Microscopy, Mass spectrometry	
Saffron	Saffron of unknown origin labelled as being cultivated in the PDO region in Spain can be used for substitution.	(Rubert, Lacina, Zachariassova and Hajslova, 2016)	LC HRMS	PCA, OPLS-DA
Fennel seed	<i>Anethum graveolens</i> fruit (AGF) and <i>Cuminum cyminum</i> fruit (CCF)	(Ma et al., 2015)	Light microscopy, fluorescence microscopy, GC-MS	
Chinese star anise	Japanese anise	(Schrage et al., 2013)	Plant spray DART-HRMS	
Chinese star anise	Japanese anise	(Shen, van Beek, Claassen, Zuilhof, Chen and Nielsen, 2012)	DART-HRMS	
Oregano	Olive leaves, myrtle leaves, hazelnut leaves, sumac	(Wielogorska et al., 2018)	LC-MS/MS, FTIR	PLSR
Oregano	Olive leaves	(Bononi, M., Tateo, F., 2011)	LC-ESI-MS/MS	
Sage	Olive leaves	(Bononi, M., Tateo, F., 2011)	LC-ESI-MS/MS	
Oregano	Olive leaves	(Bononi, Fiordaliso and Tateo, 2010)	GC/MS	
Paprika	Falsely declared Szegedi paprika substituted for Szegedi <i>Fűszerpaprika</i> PDO	(Brunner et al., 2010)	ICP-MS	PCA, CDA
Oregano	Olive leaves, myrtle leaves, cistus, hazelnut leaves, sumac	(Black, Haughey, Chevallier, Galvin-King and Elliott, 2016)	FTIR, LC-HRMS	PCA, OPLS-DA
Garlic	Comstarch	(Lohumi, Lee and Cho, 2015; Lee, Lohumi, Cho, Kim and Lee, 2014)	Raman, FTIR	PLSR
Ginger	Comstarch	(Lee, Lohumi, Cho, Kim and Lee, 2014)	Raman	PLSR
Onion Powder	Comstarch	(Lee et al., 2015; Lohumi et al., 2014)	Raman, FT-NIR, FTIR	PLSR
Saffron	<i>Crocus sativus</i> stamens, turmeric, safflower, gardenia	(Petrakis, Cagliani, Polissiou and Consonni, 2015)	¹ H NMR	PCA, OPLS-DA, O2PLS-DA
Saffron	<i>Crocus sativus</i> stamens, calendula, safflower, turmeric, buddleja, and gardenia	(Petrakis & Polissiou, 2017)	DRIFTS-FTIR	PLS-DA, PLSR
Chinese star anise	ILACS	(Wang et al., 2014)	NIR/MIR	LDA, PCA
Chinese star anise	Japanese star anise	(Vermaak et al., 2013)	SWIR-HIS	PCA, PLS-DA
Black pepper	Buckwheat or millet	(McGovern, September, Geladi and Manley, 2012)	NIR hyperspectral imaging, FTIR	PLSR
Paprika	Tomato skins, brick dust	(Galaxy Scientific)	FT-NIR & Advanced-ID algorithm	
Turmeric	Yellow chalk powder	(Nallappan et al., 2013)	Terahertz spectroscopy	
Saffron	Safflower dyed corn stigma	(Heidarbeigi, Mohtasebi, Foroughirad, Ghasemi-Varamkhasti, Rafiee and Rezaei, 2015)	Electronic Nose	PCA, ANN

Analisi del DNA

Le analisi di identificazione di specie mediante l'analisi del DNA sono legate alle problematiche sulla sicurezza del consumatore e sull'autenticità del prodotto, ma riguardano anche questioni etiche e religiose.

I tradizionali metodi applicati per l'identificazione di specie si sono sempre basati sulla caratterizzazione delle proteine specie-specifiche. Le metodologie applicate per l'identificazione proteica sono state per lo più tecniche elettroforetiche, quali la focalizzazione

isoelettrica (Isoelectrofocusing IEF) e l'elettroforesi capillare (CE). Anche le tecniche immunologiche (test immuno-enzimatici tipo ELISA) per il riconoscimento delle proteine specie-specifiche hanno avuto, prima della diffusione delle tecniche di biologia molecolare, diverse applicazioni.

Bisogna, tuttavia, considerare che il drastico trattamento termico a cui vengono sottoposti alcuni prodotti durante la loro preparazione, provoca la denaturazione delle proteine che causa alterazione delle proprietà biologiche e chimiche. Per questi prodotti risulta molto complessa l'applicazione delle tecniche elettroforetiche o immunochimiche senza incorrere in problemi di cross-reattività o di calo significativo della sensibilità.

A differenza delle proteine, il DNA è una molecola più stabile e subisce modificazioni meno importanti durante la lavorazione dei prodotti alimentari. Per questa ragione, oggi, sempre più spesso ci si rivolge a tecniche di biologia molecolare. Queste consentono il riconoscimento e la rintracciabilità di specie vegetali, l'identificazione e la quantificazione di organismi geneticamente modificati, l'identificazione di specie animali, linee cellulari e specie batteriche.

Le tecniche di biologia molecolare applicabili al campo alimentare si basano su due metodi:

- l'amplificazione di frammenti di DNA specie-specifici tramite PCR
- il sequenziamento di regioni conservate

Esistono due tipi di DNA presenti nelle cellule di quasi tutti gli esseri viventi: il DNA nucleare e il DNA mitocondriale (mtDNA). Per DNA nucleare si intende il DNA genomico contenuto nel nucleo delle cellule. Ogni cellula contiene un solo nucleo, e in essa si trovano i cromosomi formati da DNA. Viceversa, in ogni cellula umana, ci sono migliaia di mitocondri che contengono DNA mitocondriale. La loro funzione principale è quella di fornire alla cellula l'energia necessaria per poter attuare le proprie funzioni. Dato che ci sono migliaia di mitocondri in ogni cellula umana, il DNA mitocondriale, presente in molteplici copie, può essere estratto da campioni molto piccoli contenente solo poche cellule. Inoltre, i mitocondri sono strutture molto resistenti, perciò il DNA mitocondriale è protetto da fattori ambientali e dalla presenza di alcune sostanze chimiche che spesso distruggono il DNA nucleare.

Il DNA mitocondriale è utilizzato da anni negli studi di filogenesi, in quanto ha una velocità di evoluzione molto più elevata del DNA nucleare e permette di avere una variabilità maggiore nelle sequenze, facilitando l'identificazione di specie. Il DNA mitocondriale è stato, infatti, studiato per individuare le relazioni filogenetiche e l'evoluzione molecolare tra gli individui, popolazioni e specie. Le proprietà del DNA mitocondriale gli conferiscono ottime

caratteristiche per un suo impiego come bersaglio nell'identificazione di specie animali e vegetali.

Negli ultimi anni, la tecnica di analisi "Sequence Characterized Amplified Region" (SCAR-PCR) e il DNA barcoding (oggetto di questo studio) stanno diventando metodi molto apprezzati per il rilevamento di adulterazione in campo alimentare. (Galvin-King, Simon, & al., 2018).

Il DNA barcoding

Il sistema a codice a barre è una configurazione di barre parallele di vario spessore e distanza che possono essere interpretati automaticamente mediante appropriati sensori; in generale, questo sistema ha lo scopo di identificare in modo univoco un prodotto, in particolar modo un prodotto commerciale. Da quando Linneo, oltre 250 anni fa, propose il suo metodo di classificazione gerarchica delle specie, una percentuale molto bassa di animali e piante risulta, a tutt'oggi, identificata. Nel 2003, il canadese Paul Hebert dell'University of Guelph (Ontario, Canada), propose un nuovo metodo per accelerare il processo di identificazione delle specie: il *DNA barcoding*.

Questa tecnica consiste nell'utilizzare brevi sequenze di DNA in modo analogo ai codici a barre degli esercizi commerciali. Ogni specie dovrà essere infatti "etichettata" con una sequenza nucleotidica di DNA univocamente associata a quella specie, da utilizzare come riferimento per comparare la sequenza di DNA di una potenziale nuova specie. Una delle più importanti componenti di questa iniziativa è la costruzione di un banca dati contenente tutte le sequenze delle specie già identificate. Esiste già un importante database di tutte le sequenze note di DNA e di aminoacidi chiamato GeneBank ma, più recentemente, è stato creato il "Barcode of Life Database" (BOLD), che riporta solo le sequenze definite "codici a barre" (barcode), ospitato presso uno dei più ricchi e completi siti internet che presentano questo progetti, il Barcode of Life.

Esistono geni che sono più appropriati di altri per essere utilizzati come codici a barre. Il gene ideale deve soddisfare alcune importanti condizioni:

- avere regioni sufficientemente conservate dove disegnare il set di primers per amplificare un vasto numero di specie;
- avere regioni ipervariabili interne alle regioni conservate in modo da poter identificare e distinguere anche specie evolutivamente vicine;
- non essere più lungo di 650 basi nucleotidiche, in quanto questa è la lunghezza ottimale affinché un gene sia sequenziato rapidamente, senza errori e con bassi costi.

I geni mitocondriali sono quelli che rispondono maggiormente alle caratteristiche desiderate. Per quanto riguarda gli animali, tra i diversi geni mitocondriali, è stato scelto il gene codificante la subunità 1 della citocromo C ossidasi (COI) (Hebert, Sujeevan, & al., 2003).

Nelle piante, che possiedono una variabilità dei geni mitocondriali più ridotta, i geni più indicati per questo scopo sembrano essere il gene plastidiale che codifica per la maturasi K (*matK*) coinvolta nella sintesi di proteine vegetali, e la regione non codificante del DNA ribosomale internal transcribed spacer (ITS), appartenente, invece, ad una regione del DNA nucleare; a questi marcatori si possono aggiungere altre regioni spaziatrici, come mostrato in Tabella 10 (John Kress & Erickson, 2012).

Tabella 10: primers comunemente utilizzati per DNA barcoding nelle piante. (da W. John Kress and David L. Erickson, DNA Barcodes Methods and Protocols, 2012)

Region	Primer name	Sequence (5'-3')	Direction
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa-F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	F
	<i>rbcLa-R</i>	GTAATAATCAAGTCCACCRCG	R
	<i>rbcLajf634R</i>	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT	R
<i>matK</i>	<i>matK-KIM1R</i>	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	F
	<i>matK-KIM3F</i>	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	R
	<i>matK-390f</i>	CGATCTATTTCATTCAATATTTTC	F
	<i>matK-1326r</i>	TCTAGCACACGAAAGTCGAAAGT	R
	<i>NY552F</i>	CTGGATYCAAGATGCTCCTT	F
	<i>NY1150R</i>	GGTCTTTGAGAAGAACGGAGA	R
	<i>matKpkF4</i>	CCCTATTCTATTCAAYCCNGA	F
	<i>matKpkR1</i>	CGTATCGTGCTTTTTRTGYTT	R
ITS2	<i>ITS-S2F</i>	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	F
	<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R
ITS	<i>AB101</i>	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	F
	<i>AB102</i>	TAGAAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	R
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbAF</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	R
	<i>trnH2</i>	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	F
	<i>psbA</i>	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	R
	<i>trnH(GUG)</i>	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	F
	<i>psbA501f</i>	TTTCTCAGACGGTATGCC	R

Dal punto di vista metodologica, l'analisi del DNA barcoding si serve dei metodi biomolecolari già comunemente usati nei laboratori di biologia molecolare, quali l'amplificazione tramite PCR ed il sequenziamento.

Si presume che il metodo del codice a barre sia in grado di distinguere tra specie, comprese quelle strettamente imparentate, con un'accuratezza molto alta, ma alcuni biologi evuzionistici ritengono che in molti, forse troppi, casi non sia possibile individuare confini definiti tra le specie; secondo quanto sostenuto da Craig Moritz e Carla Cicero nell'articolo DNA Barcoding: Promise and Pitfalls (PLOS Biology, 2004), in una specie separatasi da

un'altra da soli 10.000 anni il codice a barre, basato su un solo gene, potrebbe non essere in grado di evidenziare mutazioni e dunque di distinguere le specie. Inoltre, un approccio incentrato sull'analisi di un singolo gene può non essere in grado di discriminare gli ibridi, cioè i prodotti di incrocio tra membri di specie diverse, dalle loro specie parentali pure (Group & al., 2009).

Sebbene il codice a barre non sia lo strumento ideale per lo studio dettagliato delle relazioni evolutive, un'identificazione delle specie basata sul DNA, in contesti più pratici, è sicuramente utile e informativa (ad es. per coltivatori che vogliono individuare specie di piante non native che hanno invaso i loro campi, per medici che devono individuare il miglior antidoto per un morso di serpente, oppure in ambito forense).

Metodi basati sull'amplificazione PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction), ovvero reazione a catena della polimerasi, è una delle tecnologie più importanti e utilizzate in biologia molecolare. Attraverso questo processo, specifiche sequenze di DNA possono essere amplificate fino a milioni di copie. La PCR è, infatti, una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi (Bellagamba & al., 2001).

Un prerequisito indispensabile è la conoscenza della sequenza di DNA alle estremità della regione bersaglio. Infatti, nella reazione sono coinvolti due corti oligonucleotidi a singolo filamento (primers) complementari all'estremità 3' e 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare; i primers costituiscono l'innescò per la polimerizzazione da parte della DNA polimerasi.

Nella PCR tradizionale, detta End-point, il rilevamento e la quantificazione delle sequenze amplificate avviene alla fine dell'ultimo ciclo di reazione (in genere dopo 25-30 cicli). Nella PCR Real-Time, invece, il prodotto amplificato è misurato ad ogni ciclo di reazione attraverso l'utilizzo di fluorocromi legati ad oligonucleotidi dette sonde.

I cicli di amplificazioni del DNA stampo avvengono grazie all'uso di un termociclatore costituito da un blocco termico dove posizionare i campioni e da un sistema di controllo in grado di aumentare o abbassare velocemente la temperatura di lavoro. Nel caso della Real-Time PCR, al normale termociclatore è aggiunta una sorgente di luce (laser) per l'eccitazione delle sonde e un lettore ottico per la lettura della fluorescenza.

La reazione di PCR prevede tre passaggi, ripetuti per un certo numero di cicli:

1) *denaturazione*: vengono utilizzate alte temperature di incubazione per denaturare completamente il DNA stampo ed aprire la doppia elica per permettere il legame della DNA

polimerasi. La temperatura tipicamente usata in questo processo è 95 °C. Il tempo di denaturazione richiesto può variare soprattutto a seconda della percentuale di nucleotidi CG (formano tra loro infatti tre legami ad idrogeno più difficili da rompere rispetto ai due legami della coppia AT).

2) *annealing*: in questa fase avviene il legame tra i primers e i due filamenti di DNA. Ogni primer possiede una temperatura di melting (T_m) specifica data dalla sua composizione di nucleotidi. Le T_m dei primers concorrono a definire la temperatura ottimale di annealing (T_a).

Nel caso della Real-Time PCR, in questa fase avviene anche il legame della sonda fluorescente che si lega pochi nucleotidi a valle del primer 3'-5' (forward), bloccando di fatto la DNA polimerasi. La sonda presenta alle due estremità una molecola fluorescente detta "Reporter" (estremità 5') e una detta "Quencher" (estremità 3'). Se la sonda è intatta, la presenza del quencher riduce la fluorescenza emessa dal reporter.

3) *estensione*: fase in cui avviene l'aggiunta dei nucleotidi da parte della DNA polimerasi (fase di polimerizzazione); la temperatura utilizzata è in genere 70-72 °C, ovvero la temperatura ideale per la DNA polimerasi (Sadava, Heller, Orians, Purves, & Hills, 2018).

Durante la replicazione del frammento di DNA, in Real-time PCR, la sonda viene degradata grazie all'attività esonucleasica 5'-3' della DNA polimerasi. Questa degradazione comporta l'allontanamento del reporter dal quencher con un conseguente aumento di fluorescenza. L'intensità di fluorescenza emessa viene rilevata dal lettore ottico incorporato nel classico termociclature. Questo processo avviene ad ogni ciclo di amplificazione, di conseguenza la fluorescenza emessa dal reporter è proporzionale alla quantità di "amplicone" (DNA amplificato) prodotto (Figura 10).

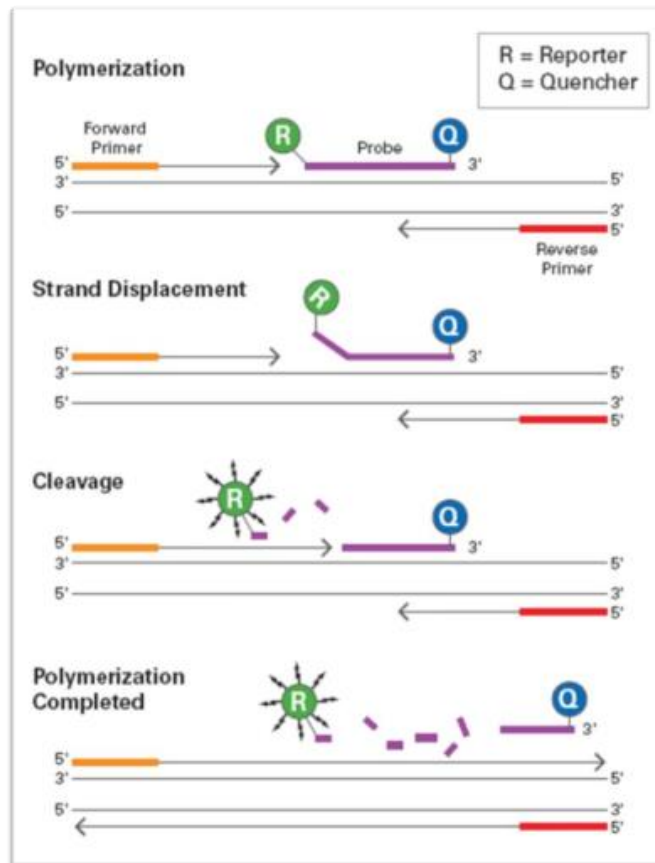


Figura 10: fasi di una Real-time PCR.

Le componenti fondamentali di ogni reazione di PCR sono:

- DNA polimerasi Taq: enzima termostabile, proveniente dall'organismo termofilo *Thermus aquaticus*. L'enzima è costituito da una singola catena polipeptidica, con massa molecolare di 94 kDa. Presenta un'attività polimerasica (DNA-polimerasi DNA-dipendente) in direzione 5'-3', per la quale è richiesta una temperatura ottimale di 75-80 °C e la presenza di ioni Mg^{2+} (ad es. $MgCl_2$).

- dNTP (deossiribonucleotidi): miscela dei quattro nucleotidi da incorporare nella catena nascente di DNA; vengono utilizzati generalmente alla concentrazione di 200 μM ciascuno. Un aumento di questa concentrazione non porta ad un aumento dell'efficienza della reazione in quanto i gruppi fosfato carichi negativamente possono legarsi al magnesio della miscela rendendolo meno disponibile. Questo può provocare un aumento della frequenza di errori della DNA polimerasi fino ad inibirla (se presenti in concentrazione millimolare).

- primers: corti frammenti di DNA (15-20 bp) specifici per le regioni fiancheggianti il DNA bersaglio. I primers possono contenere alcuni nucleotidi non complementari allo stampo (per creare, ad esempio, siti di taglio per enzimi di restrizione) oppure si possono usare primers degenerati (cioè miscele di oligonucleotidi che variano tra loro per la presenza di

differenti basi in punti specifici) nel caso in cui la sequenza da amplificare sia incognita. Questi ultimi consentono di poter amplificare geni di cui sia nota solo la sequenza proteica o geni omologhi tra diverse specie. I primers devono essere progettati in modo da essere privi di strutture secondarie, devono avere una temperatura di melting compatibile tra loro (entro 5 °C) e contenere approssimativamente il 50 % di basi CG. Per facilitare l'annealing, l'estremità 3' di ogni primer dovrebbe essere ricca in CG. La miscela di primers viene usata generalmente ad una concentrazione pari a 200 nM. Una concentrazione troppo elevata può portare all'amplificazione di sequenze aspecifiche, mentre, al contrario, una concentrazione inadeguata rende l'amplificazione inefficace.

- magnesio: condiziona l'attività della DNA polimerasi, l'ibridizzazione dei primers ed aumenta la temperatura a cui il DNA stampo si denatura.

- sonda/colorante intercalante (nel caso della Real-time PCR): per avere emissione di fluorescenza durante il processo di amplificazione si possono utilizzare coloranti intercalanti (es. SYBR green) che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA, oppure sonde specifiche (es. TaqMan) che legano il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti.

Il SYBR Green I è un composto organico aromatico ($C_{32}H_{37}N_4S$), appartenente al gruppo delle cianine asimmetriche dotate di attività fluorofora, utilizzato in biologia molecolare come colorante di acidi nucleici. È un agente intercalante e si lega preferenzialmente a DNA a doppio filamento. Il complesso DNA-colorante assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 488$ nm ed emette luce verde a $\lambda_{max} = 522$ nm. Altri picchi di assorbimento, sebbene più deboli, si trovano nella regione dell'ultravioletto ($\lambda = 284$ nm e 382 nm). L'utilizzo di questa molecola legata al DNA non impedisce l'attività di numerosi enzimi, tra cui quelli di restrizione, le DNA ligasi e le DNA polimerasi. Il SYBR Green è in grado di legare qualunque prodotto di amplificazione, perciò manca di specificità. Di conseguenza, sebbene sia un metodo molto usato, non offre la stessa specificità della sonda TaqMan.

La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio da amplificare e, in particolare, per ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR. Presenta all'estremità 5' un fluorocromo detto "reporter" e all'estremità 3' una molecola detta "quencher". Il valore iniziale di fluorescenza (baseline) corrisponde al debole segnale del reporter legato al quencher. Durante l'amplificazione del DNA stampo, l'emissione di fluorescenza viene letta dallo strumento (Holst-Jensen, Ronning, Lovseth, & Berdal, 2003).

Metodi basati sul sequenziamento

Sequenziare vuol dire determinare l'ordine dei nucleotidi di una molecola di DNA. A volte il sequenziamento viene confuso con la «decifrazione» del DNA, ma in realtà esso è solo il primo passo in questa direzione. Dopo avere sequenziato una molecola di DNA, infatti, questa va studiata per capire cosa significhino le sequenze identificate.

Metodo SANGER

Il metodo di sequenziamento di Sanger, sviluppato da Fred Sanger, si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati (dideossitriphosphate, ddNTPs) per interrompere la reazione di sintesi. I nucleotidi dideossitriphosphate sono molecole artificiali corrispondenti ai nucleotidi naturali, ma si differenziano per l'assenza del gruppo idrossilico OH sul carbonio 3' del deossiribosio. A causa di questa struttura, l'aggiunta di un nuovo nucleotide è impedita poiché il legame fosfodiesterico tra il 5'-fosfato di un nucleotide e il 3'-OH di un altro nucleotide non si può formare. Il protocollo classico di sequenziamento richiede uno stampo di DNA a singolo filamento, un primer per iniziare la reazione di polimerizzazione, una DNA polimerasi, la miscela di deossinucleotidi dNTPs e la miscela di dideossinucleotidi per terminare la reazione di polimerizzazione.

I nucleotidi modificati (ddNTPs) o il primer devono essere marcati (radioattivamente o per fluorescenza) in modo da poter visualizzare le bande dei frammenti di DNA neosintetizzato dopo aver effettuato l'elettroforesi. Il campione di DNA da sequenziare viene diviso in quattro reazioni separate, ognuna delle quali contiene la DNA polimerasi e tutti e quattro i deossiribonucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ad ognuna di queste reazioni viene aggiunto solo uno dei quattro didideossinucleotidi (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) in quantità stechiometricamente inferiore (1:100) per permettere un'estensione del filamento sufficiente per l'analisi.

L'incorporazione di un dideossinucleotide lungo il filamento di DNA in estensione ne causa la terminazione prima del raggiungimento della fine della reazione di sequenziamento; questo genera una serie di frammenti di DNA di lunghezza diversa interrotti in corrispondenza dell'incorporazione casuale del dideossinucleotide. I frammenti così generati vengono separati in gel di poliacrilammide che permette di discriminare frammenti che differiscono di un nucleotide. Le bande sono visualizzate utilizzando una lastra autoradiografica, e la sequenza viene letta direttamente sulla lastra, dal basso verso l'alto.

Basandosi su questa procedura, la metodica è stata modificata per facilitarne l'esecuzione, e con l'avvento dell'automatismo la reazione di sequenziamento è diventata molto più veloce. Attualmente, infatti, è possibile effettuare una sola reazione utilizzando i 4 ddNTPs marcati

ciascuno con un fluoroforo diverso in grado di emettere fluorescenza dopo eccitazione con luce laser. Il risultato finale è un elettroferogramma caratterizzato da picchi di 4 colori diversi, ognuno specifico per un nucleotide (Figura 11).

Il limite del metodo Sanger, tuttavia, è che risulta utile solo per l'analisi di campioni puri e non è applicabile per campioni misti, in quanto non è in grado di differenziare le sequenze di più di un genoma (Chinwalla, Asif, & al., 2002).

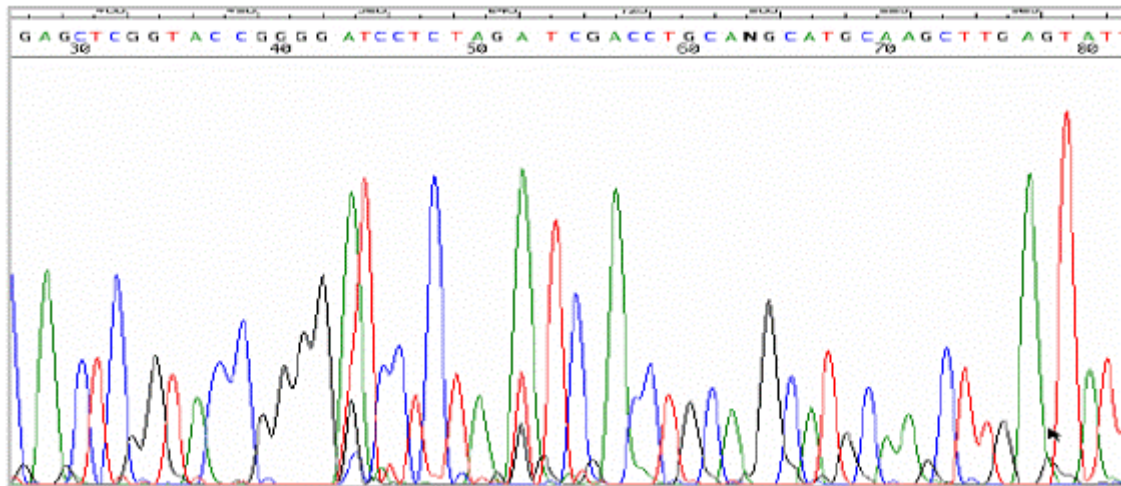


Figura 11: esempio di elettroferogramma (da www.di-srv.unisa.it)

Next generation sequencing (NGS)

L' NGS è anche chiamata "high-throughput sequencing" (sequenziamento ad alta resa) perché, a differenza del sequenziamento tradizionale col metodo Sanger, consente di sequenziare moltissime sequenze in parallelo. Esistono numerosi sistemi per eseguire l'NGS, sviluppati da diverse compagnie: Solexa-Illumina, Solid, Ion Torrent, Oxford Nanopore e SMRT. Tutti questi sistemi condividono tre passaggi fondamentali: i) la preparazione e immobilizzazione del DNA (cioè la preparazione della cosiddetta "sequencing library"), ii) la reazione di amplificazione e iii) la reazione di sequenziamento.

Questi metodi di sequenziamento sono molto più rapidi del metodo di Sanger, tuttavia come conferma dei risultati ottenuti in NGS viene spesso eseguita in parallelo l'analisi tradizionale (Bokulich, Nicholas, & al., 2013).

Nel campo dell'identificazione di frodi alimentare, la ricerca di contaminanti di cui non si conosce minimamente la natura è di notevole importanza. L'approccio, definito "un-target", permette di identificare specie in campioni di cui non si conosce l'origine o per cui non si hanno a disposizione marcatori specifici. L'unione di moderne tecnologie ha lo scopo, quindi,

di coniugare l'abilità del metodo del DNA barcoding di effettuare analisi "un-target" e la capacità delle tecniche PCR di analizzare campioni misti.

L'identificazione di adulterazioni alimentari effettuate con tecniche di sequenziamento di nuova generazione sono ancora, in campo alimentare, nella fase iniziale della loro messa a punto ma risultano essere molto attrattive.

Nel metodo Solexa-Illumina, sviluppato nel 2006, il DNA viene frammentato fisicamente attraverso nebulizzazione in modo che questa frammentazione sia il più casuale possibile. È necessaria una PCR per amplificare tali frammenti: essa avviene su un supporto solido sul quale il DNA viene attaccato grazie a raggi UV. Vengono utilizzati degli oligonucleotidi adattatori per legare le molecole di DNA con entrambe le estremità al supporto solido prima di procedere con la PCR. Un estremo della molecola viene, quindi, liberato e sul supporto solido vengono aggiunti i 4 deossiribonucleotidi (dNTP) marcati ognuno con un fluoroforo di colore diverso: a seconda di quale nucleotide viene inserito in ogni frammento, si sviluppa una fluorescenza di colore diverso che viene letta da un'apposita telecamera, sequenziando così molti frammenti contemporaneamente. Tale metodo permette di ottenere sequenze di circa 200 basi (400 bp con le nuove versioni) contro le 1000-1500 che si ottengono con il metodo di Sanger; quest'ultimo genera però molte meno sequenze in un'unità di tempo.

Nel laboratorio COOP Italia è presente, invece, il sistema Ion PGM™ System (Ion Personal Genome Machine System) basato sulla tecnologia Ion Torrent™ next-generation sequencing. Tale sistema è stato utilizzato in questo lavoro di tesi per eseguire analisi su campioni di spezie ed erbe aromatiche.

Lo IonTorrent™ Technology traduce direttamente informazioni codificate chimicamente (A, C, G, T) in informazioni digitali su un supporto semiconduttore chiamato chip. Questo approccio va ad unire la chimica semplice alla tecnologia dei semiconduttori: il risultato è una tecnica di sequenziamento per sintesi che è più semplice, più veloce, più economica e scalabile di qualsiasi altra tecnologia disponibile. In natura, quando un nucleotide è incorporato in un filamento di DNA, mediante l'enzima polimerasi, uno ione idrogeno viene rilasciato come sottoprodotto. Se sono presenti due basi identiche sul filamento di DNA, la tensione risulta doppia e il chip registra due basi identiche. Questo perché, nel chip, avviene un rilevamento diretto, ossia non si ha bisogno di nessuna scansione, nessuna telecamera, nessuna luce, ogni incorporazione di nucleotidi viene registrata in pochi secondi, grazie ai sensori posti sotto ad ogni partizione che compone il chip stesso.

L'aggiunta successiva dei nucleotidi è detta "chiamata delle basi". Quando viene aggiunto un nucleotide, ad esempio una C, la sua incorporazione a livello di una G rilascia uno ione

idrogeno. La carica di questo ione positivo porta un cambiamento del pH della soluzione, che viene misurato da un sensore all'interno dello strumento. Il sequenziatore Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) quindi, in modo sequenziale, riveste il chip con un nucleotide dopo l'altro. Se il nucleotide successivo che colpisce il chip, quindi i vari filamenti di DNA, non trova una corrispondenza, non si registra alcuna variazione di tensione da parte dello strumento (Thermo Fischer Scientific). Ogni volta che un nuovo nucleotide viene inserito all'interno del chip, avviene un passaggio di lavaggio del supporto con varie soluzioni tamponate per riportare il pH al valore soglia.

Un esempio del meccanismo di “chiamata delle basi” viene mostrato in Figura 12.

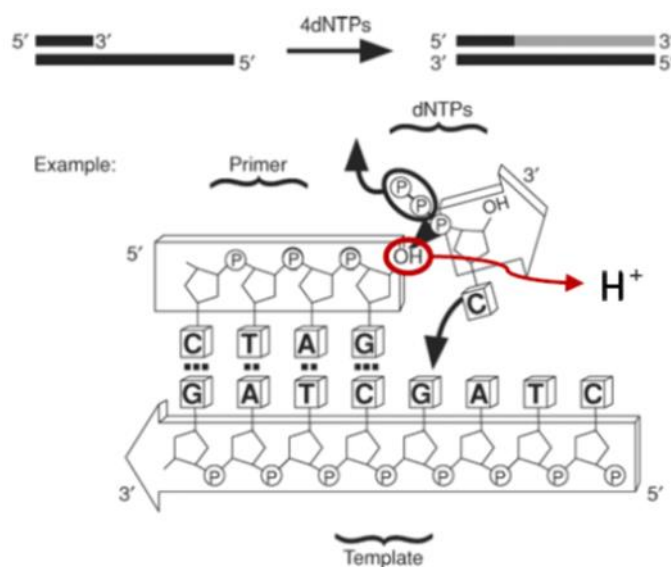


Figura 12: meccanismo di chiamata delle basi

L'analisi avviene all'interno di un chip, strutturato come descritto in Figura 13, che contiene su uno strato solido da 600.000 fino ad alcuni milioni di partizioni; in ognuna di queste può, teoricamente, avvenire la lettura di una sequenza da parte dello strumento. Il grande successo di questa metodica consiste proprio nella possibilità di utilizzare milioni di sensori misuratori di variazioni del pH ambientale. I nucleotidi, inoltre, non devono essere modificati chimicamente con l'aggiunta di fluorofori, come richiesto nelle tecniche classiche di sequenziamento.

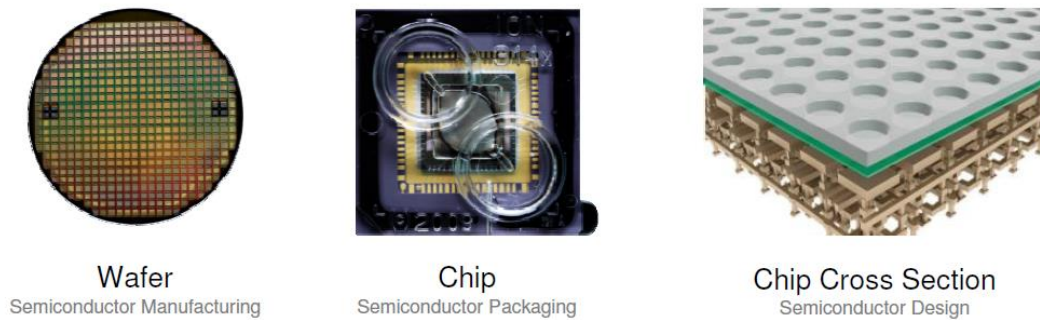


Figura 13: struttura del chip per NGS

Un punto fondamentale di questa tecnica risulta essere la preparazione dei campioni di DNA da inserire all'interno del supporto, denominato "creazione della library" (creazione della libreria). L'approccio tipico prevede quattro fasi: 1) il DNA genomico viene amplificato o frammentato in milioni di piccoli segmenti (della lunghezza di massimo 400 bp); 2) si trattano le estremità di questi frammenti in modo da generare estremità piatte (blunt ends); 3) alle estremità 5' e 3' di ciascun frammento vengono legati specifici adattatori; 4) i frammenti con gli adattatori coniugati sono amplificati simultaneamente per la generazione della "library finale": in questa fase è possibile incorporare dei codici a barre, definiti *barcode*, che vengono utilizzati nel sequenziamento multiplex (metodo utilizzato nelle analisi svolte nei campioni di specie ed erbe aromatiche), processo che consente di sequenziare parallelamente in una singola corsa più campioni, anche di specie differenti (Jefferson, Cerbo, & al., 2017).

A ciascun campione, quindi, viene assegnato un barcode individuale, che consiste in una specifica sequenza di definiti nucleotidi, che permette la successiva e univoca identificazione del campione stesso (Figura 14) (Lablogatory, a blog for medical Laboratory professionals). L'NGS, inoltre, possiede anche capacità semi-quantitative: lavorando su un elevato numero di sequenze per campione, risulta possibile ottenere una stima della quantità relativa di un genoma rispetto ad un altro.

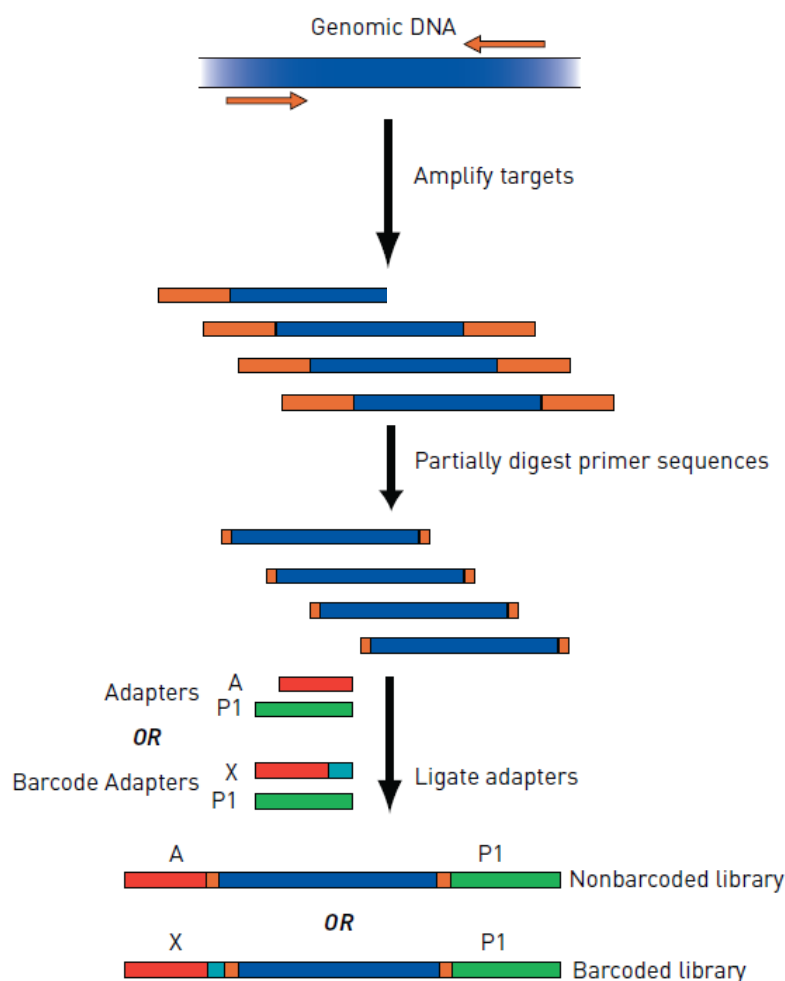


Figura 14: workflow per la creazione della library (da Ion AmpliSeq™ Library Preparation User Guide – MAN0006735, Rev. 10 September 2012).

Fingerprinting dei composti volatili per l'autenticità alimentare nelle spezie

I principi generali di gas cromatografia (GC)

In base allo stato fisico della fase stazionaria, la gas-cromatografia si può suddividere in cromatografia gas solido (*GSC*) e in cromatografia gas liquido (*GLC*).

Nella cromatografia gas-solido la fase stazionaria è costituita da un solido adsorbente, mentre nella cromatografia di ripartizione gas-liquido, la fase stazionaria è costituita da un supporto inerte sul quale è stato depositato un film di un liquido di ripartizione. In ambedue le tecniche la fase mobile è un gas che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria; la fase mobile in questo caso non ha alcuna interazione con i soluti in quanto agisce soltanto da carrier, cioè trasporta i soluti lungo la colonna.

I composti da analizzare (liquidi, solidi, gassosi) devono essere resi volatili. Questo si ottiene riscaldando le sostanze nel momento dell'introduzione nello strumento e mantenendo il sistema a temperatura elevata. I composti iniettabili in un sistema GC devono avere una temperatura di ebollizione (T_{eb}) $< 300^{\circ}\text{C}$ e non devono essere termolabili.

I componenti della miscela, una volta vaporizzati, sono separati in seguito alla ripartizione tra una fase gassosa mobile e una fase stazionaria. Le differenti caratteristiche delle fasi stazionarie e le molteplici interazioni che si instaurano fra queste ultime e gli analiti costituenti le miscele, sono i responsabili della separazione.

I componenti che vengono maggiormente trattenuti (elevata interazione chimico-fisica dei soluti con la fase stazionaria) dalla fase stazionaria si muovono più lentamente nel flusso della fase mobile. Al contrario, i componenti che vengono debolmente trattenuti dalla fase stazionaria, si muovono più rapidamente. Sulla base delle differenze di mobilità è possibile separare i diversi componenti di un campione. L'andamento dei segnali del rivelatore in funzione del tempo genera il cromatogramma caratterizzato da picchi diversi la cui area corrispondente alla concentrazione del soluto eluito.

Heracles II

Nel laboratorio COOP Italia è presente il Sistema Gascromatografico-Heracles II (Alpha M.O.S, Francia) (Figura 15) che fonda il suo principio di funzionamento sull'analisi del profilo aromatico di un campione, generando un'*impronta digitale chimica* identificativa di ogni tipologia di campione.

Heracles II è un gas cromatografo che si basa sui principi della Gas-Cromatografia Veloce (FAST-GC), garantendo un'elevata capacità di separazione in tempi estremamente brevi: l'analisi di composti volatili (VOC) avviene in circa di 100 secondi.

Il sistema è composto da due colonne capillari di acciaio con polarità differenti poste in parallelo, connesse a rivelatori a ionizzazione di fiamma (FID) per generare simultaneamente due cromatogrammi. La presenza di una trappola di adsorbimento incorporata, consente l'iniezione contemporanea di sostanze volatili nelle due colonne; le sostanze vengono precedentemente condensate tramite concentrazione a freddo, al fine di aumentare la sensibilità dell'analisi. Il sistema può, inoltre essere utilizzato per analizzare campioni sia liquidi che solidi.

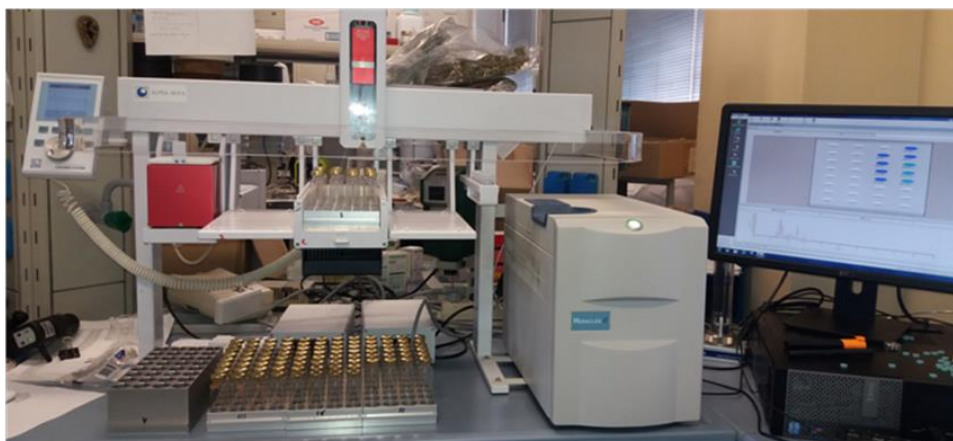


Figura 15: lo strumento Heracles II presente in COOP Italia

I componenti di Heracles II

Fase mobile: viene utilizzato un gas, in questo caso l'idrogeno, fornito da un apposito generatore. La sua funzione è quella di veicolare (come *carrier*) i componenti della miscela gassosa in analisi lungo la colonna cromatografica.

Iniettore: simile ai normali iniettori "Split-Splitless"; in questo caso il campione viene prima inviato alla trappola di concentrazione.

Trappola: prima dell'iniezione nelle colonne cromatografiche, i campioni vengono raccolti in una trappola adsorbente solida termoregolata (Peltier) dove avviene la loro concentrazione, conferendo così una maggiore sensibilità all'analisi. Prima dell'iniezione, il flusso del gas di trasporto all'interno dell'iniettore/trappola viene arrestato. La trappola a questo punto viene riscaldata alla temperatura di desorbimento e, raggiunta l'opportuna temperatura di preriscaldamento, il campione viene iniettato simultaneamente nelle due colonne capillari dove avviene la separazione cromatografica.

Colonna cromatografica: rappresenta la parte essenziale dello strumento; contiene la fase stazionaria ed è permeabile al gas vettore. La scelta delle sue dimensioni, del materiale di riempimento e delle modalità di riempimento sono fattori determinanti ai fini di ottenere massima efficienza.

Heracles II contiene due colonne capillari in acciaio trattato in Siltek: una colonna, MXT5, con fase a bassa polarità contenente difenil dimetil polisilossano, e una colonna MXT 1701 con fase a polarità intermedia di natura Crossbond.

La lunghezza delle colonne è pari a 10 m, diametro interno di 0,18 mm e con un film di fase stazionaria di 0,4 μm . Le colonne sono disposte in parallelo all'interno di un forno la cui temperatura è controllata con estrema precisione ed il loro riscaldamento avviene in un tempo

rapidissimo pari a 10 °C/s. Il campione viene iniettato nelle colonne solo quando è completamente volatilizzato. La temperatura è cruciale nelle separazioni cromatografiche poiché controlla la tensione (pressione) di vapore degli analiti e di conseguenza un loro più rapido passaggio nella fase mobile; l'effetto finale è la riduzione del loro tempo di ritenzione. Il sistema di controllo permette all'operatore di regolare la temperatura, la quale può essere mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi (isoterma) oppure può essere variata (programmata).

Rilevatori a ionizzazione di fiamma (FID): sono presenti due dispositivi FID, a valle delle colonne, in grado di rivelare la presenza di particolari analiti nel gas di trasporto. Si tratta di rivelatori universali (cioè consentono di individuare tutti i componenti di una miscela), ma distruttivi in quanto i campioni vengono bruciati per ottenerne la trasformazione in ioni allo stato gassoso.

Il gas carrier viene convogliato verso un ugello a cui giunge anche aria (O₂), necessaria per alimentare una piccola fiammella. Una resistenza posta accanto all'ugello provoca l'accensione della fiammella. Quest'ultima si trova circondata da un collettore cilindrico caricato positivamente (anodo); il secondo elettrodo del circuito, caricato negativamente (catodo), è costituito dall'ugello stesso. Gli elettrodi vengono mantenuti sotto una differenza di potenziale di circa 300 V. La microfiamma provoca una debolissima corrente ionica tra gli elettrodi che, raccolta, trasformata in tensione e amplificata, viene inviata ad un opportuno registratore e costituisce il rumore di fondo. Quando un componente della miscela raggiunge la fiamma, viene subito ionizzato con conseguente aumento dell'intensità di corrente che genera un segnale più intenso.

Alla fine della corsa, si ottengono due cromatogrammi che rappresenteranno il profilo aromatico del campione in esame. Nel cromatogramma, l'asse x corrisponde al tempo di ritenzione e l'asse y all'intensità della risposta. Ogni picco corrisponde ad una sostanza chimica volatile presente all'interno del campione identificata mediante l'utilizzo degli indici di ritenzione di Kovats. In particolare, l'indice di Kovats è un valore che identifica i tempi relativi di ritenzione dei vari composti in gascromatografia. Il metodo può essere applicato solo a composti organici.

Il calcolo dell'indice di ritenzione di un composto generico X, utile per la sua identificazione, si effettua iniettando nella colonna due alcani a catena lineare, i quali vengono usati come riferimento. Si identifichi il primo con N, con struttura C_nH_{2n+2} e l'altro con M, con struttura pari a C_mH_{2m+2} dove m risulta essere > di n. Questi standard vengono scelti in modo tale che escano dalla colonna rispettivamente prima e dopo del composto X da identificare. Dopo aver

registrato il cromatogramma, si ricavano i tempi di ritenzione dei due alcani di riferimento e del composto X. L'indice di ritenzione di Kovats, identificato con I, si calcola applicando la formula:

$$I = 100 * [n + (m - n) * \frac{\log(t'r(x)) - \log(t'r(n))}{\log(t'r(m)) - \log(t'r(n))}]$$

Alla fine di un'analisi, tutti i componenti interni dello strumento vengono riportati ai loro stati di flusso, pressione e temperature iniziali; lo strumento è così pronto per il successivo ciclo analitico.

Tra le potenzialità del software dello strumento (AlphaSoft ver. 12.46, Alpha-MOS) esiste la possibilità di identificare quale specifico composto volatile corrisponde a ciascuno dei picchi cromatografici e la possibilità di differenziare i vari campioni allo stesso modo di un "naso umano", valutando globalmente il profilo aromatico derivato dalla complessità del campione.

Analisi statistica multivariata

I profili sensoriali ottenuti dall'analisi cromatografica vengono utilizzati per costruire dei database chiamati "librerie". Tali dati sono poi elaborati dal software dello strumento attraverso metodi di statistica multivariata (*PCA* – analisi dei componenti principali); questo permette di discriminare e visualizzare i campioni attraverso una rappresentazione grafica.

Il principio che essenzialmente trasforma l'analizzatore Heracles II in un potente "naso elettronico" è il seguente: ciascuno dei picchi cromatografici registrati è considerato come un "sensore virtuale" che misura un particolare componente volatile del campione. La numerosità dei picchi nei cromatogrammi, dovuto alla presenza di due colonne cromatografiche con proprietà complementari, comporta anche un gran numero di "sensori" conferendo allo strumento un'elevata capacità discriminante.

Una funzione interna all'Heracles II, chiamata "Data redaction", equilibra il peso (area) dei picchi rendendoli così confrontabili; questo è fondamentale poiché spesso le dimensioni dei picchi nel cromatogramma sono molto differenti tra di loro, a causa della diversa concentrazione delle sostanze. I picchi vengono selezionati secondo una maggiore o minore importanza in termini di discriminazione, valutabile come "potere di discriminazione", nel range indicato dal sistema statistico che va da 0-1 (si considerano sensori maggiormente discriminanti, quelli tendenti a 1). Compito dell'operatore sarà quello di effettuare attentamente una selezione dei sensori virtuali, identificati dall'elaborazione statistica, che possono essere utili per discriminare i campioni tramite l'analisi PCA (Todeschini, 1998).

L'analisi dei componenti principali (PCA)

L'Analisi dei Componenti Principali (PCA) è una tecnica statistica comune a molti software di elaborazioni matematiche. Tale indagine statistica consente di semplificare l'analisi dei dati attraverso una riduzione del numero delle variabili; si ha infatti una proiezione delle variabili principali su un sistema di assi cartesiani. È consigliabile la scelta di un massimo di 14-15 sensori che abbiano un “potere discriminante” non inferiore a 0,75-0,8.

In un grafico PCA, la percentuale indicata sotto ogni asse (PC1, PC2, PC3) rappresenta la quantità di informazioni riportate da quell'asse; questa percentuale è chiamata varianza e la somma di tutte le percentuali degli assi è uguale a 100 %. Di solito si sceglie di rappresentare sull'asse x la variabile con la maggiore varianza (PC1), sull'asse y la variabile meno importante (PC2); eventualmente si possono valutare anche altre variabili minori PC3, ecc.

La possibilità dell'analisi multidimensionale (2D/3D) consente di ottenere informazioni da qualsiasi prospettiva si voglia (Trygg, Holmes, & Lundstedt, 2007). La PCA consente quindi di creare “una mappa” con differenti gruppi, dove le eventuali distanze tra i gruppi sulla mappa forniscono informazioni sulla somiglianza o differenza tra i prodotti.

SCOPO

“L’uomo è ciò che mangia. Ma se non sai quello che mangi, non sai che persona sei”
(Senesi, 2010).

Gli alimenti sono una parte vitale della società e oltre a costituire un aspetto fondamentale per la sopravvivenza dei viventi rappresentano anche una immagine distintiva della cultura dei vari popoli. Questo fa comprendere quanto le frodi alimentari siano così sentite come una piaga sociale da essere state annoverate addirittura come un peccato nella Bibbia.

Le spezie e le erbe aromatiche per quanto non siano, in senso nutrizionale, degli alimenti veri e propri, sono state una tra le prime frodi registrate nella storia umana. Infatti, la loro importanza in campo culinario va al di là del semplice utilizzo per aggiungere sapore ad una pietanza migliorandone la qualità, ma è legata anche alla loro capacità di favorire il mantenimento degli alimenti, soprattutto quando ancora non c’erano sistemi di conservazione del cibo come quelli attuali.

Attualmente esistono diversi metodi per contrastare le frodi e le analisi degli alimenti rappresentano uno di questi. L’elenco delle analisi di laboratorio, chimiche e biologiche, che possono contribuire a identificare eventuali frodi è molto lungo, ma il sempre più complesso e globalizzato mercato degli alimenti porta sempre nuove e più articolate sfide nel campo dell’identificazione delle frodi.

Da questo punto di vista, le nuove tecnologie analitiche rappresentano un aiuto prezioso. Questo lavoro di tesi, quindi, si è focalizzato sullo sviluppo e messa a punto di metodi alternativi per l’identificazione delle adulterazioni in alcune spezie ed erbe aromatiche. In particolare, sono stati utilizzati due approcci complementari, uno basato sull’analisi del DNA, in particolare utilizzando il DNA barcoding, e l’altro approccio ha riguardato analisi di tipo chimico, quali il fingerprinting dei composti volatili presenti in erbe aromatiche e spezie.

MATERIALI E METODI

I campioni di spezie ed erbe aromatiche utilizzati

I campioni di spezie ed erbe aromatiche analizzati in questa tesi di laurea sono stati prelevati da diversi supermercati, erboristerie, giardini officinali e poderi della zona emiliana e romagnola.

In particolare, durante questa fase di campionamento, si è cercato di acquistare droghe vegetali da luoghi molto diversi fra loro e, nel caso di campioni commerciali, con marchi e produttori differenti, al fine di ottenere la maggiore variabilità possibile e di conseguenza, verosimilmente, la maggiore informazione su questi ultimi.

Al termine del campionamento le droghe vegetali procurate sono state suddivise e catalogate in classi, sulla base di proprietà che accomunano e caratterizzano alcuni gruppi di campioni. La Tabella 11 rappresenta una mappatura sintetica delle classi di campioni analizzati durante il lavoro di tesi.

Tabella 11: Classi di campioni analizzati

Specie	Numero	Origine
Zafferano in polvere	27	Commerciale
Zafferano in pistilli	6	Commerciale
Cipolla	1	Commerciale
Aglio	1	Commerciale
Origano	5	Commerciale / Orto botanico
Cartamo	4	Sconosciuto
Olivo	4	Sconosciuto
Timo	2	Orto botanico
Mirto	1	Orto botanico
Cisto	1	Orto botanico
Calendula	2	Orto botanico

Metodi di analisi per l'identificazione di specie mediante DNA

Estrazione e purificazione DNA

Durante il lavoro di tesi sono stati utilizzati diversi metodi di estrazione del DNA per i differenti campioni di specie ed erbe aromatiche presi in considerazione. In particolare, sono stati utilizzati tre diversi kit per l'estrazione del DNA da matrici differenti (non esiste ad oggi un kit specifico per le erbe/specie): DNeasy[®] Blood & Tissue kit (QIAGEN), DNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN) e DNeasy[®] Mericon[™] Food Kit (QIAGEN). Per effettuare l'estrazione del DNA sono state seguite le istruzioni presenti in ciascun kit. Tutti i sistemi prevedono l'utilizzo di colonnine dotate di una membrana che lega selettivamente il DNA in presenza di elevate concentrazioni saline (sali caotropici). I diversi passaggi (di lavaggio ed eluizione) vengono eseguiti mediante centrifugazione.

A seconda del kit, sono stati utilizzate diverse quantità di campione: 250 mg (tal quale) per il kit DNeasy[®] Blood & Tissue, 20-100 mg (omogenizzati) per il kit DNeasy[®] Plant Mini e 2 g (omogenizzati) per il kit DNeasy[®] Mericon[™] Food. Ai campioni è stato aggiunto il tampone di lisi ed è stata effettuata un'incubazione alla temperatura prevista da ciascun protocollo (56-65 °C). Il DNA è stato eluito in tamponi a basso contenuto di sali.

Di seguito è riportato, come esempio, il protocollo completo relativo al kit DNeasy[®] Plant Mini:

- Pesare una quantità di campione compresa tra 20 mg e 100 mg e omogeneizzare;
- Aggiungere 400 µl di Buffer AP1 e 4 µl di RNase A. Agitare rigorosamente e incubare per 10 min a 65 °C in agitazione;
- Aggiungere 130 µl Buffer P3. Agitare vigorosamente e incubare per 5 min in ghiaccio;
- Centrifugare il lisato per 5 min a 20.000 x g;
- Trasferire il lisato nella spin-column in dotazione. Centrifugare per 2 min a 20.000 xg;
- Trasferire l'eluato in una nuova provetta. Aggiungere 1.5 volumi di Buffer AW1 e miscelare;
- Trasferire 650 µl della miscela nella DNeasy Mini spin column in dotazione. Centrifugare per 1 min a 6.000 x g. Eliminare l'eluato;
- Riporre la colonnina su una nuova provetta da 2 ml. Aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare per 1 min a 6.000 x g. Eliminare l'eluato;
- Aggiungere 500 µl di Buffer AW2. Centrifugare per 2 min a 20.000 x g;
- Trasferire la spin-column in una nuova provetta da 1,5 ml;

- Aggiungere 100 µl di Buffer AE. Incubare per 5 min a temperatura ambiente (15-25 °C). centrifugare per 1 min a 6.000 x g; conservare l'eluato a 4 °C.

Il DNA genomico estratto con una delle metodiche sopra descritte è stato, quindi, ulteriormente purificato da eventuali inibitori della PCR, quali polisaccaridi, polifenoli, acidi fulvici e coloranti, in modo da renderlo adatto alla successiva amplificazione in PCR. A tale scopo è stato utilizzato il kit commerciale DNeasy[®] PowerClean[®] ProCleanup (QIAGEN), seguendo le istruzioni indicate dalla casa produttrice.

Mediante questa metodica il DNA viene legato su una membrana di silice (in formato spin column) e gli inibitori vengono selettivamente rimossi dalla soluzione. Il DNA viene, quindi, lavato ed eluito dalla membrana mediante tamponi a basso contenuto di sali. Il recupero in percentuale varia a seconda del livello di inibitori presenti nel DNA.

La procedura prevede i seguenti passaggi:

- Aggiungere 100 µl di campione di DNA estratto in una nuova provetta da 2 ml;
- Aggiungere 50 µl di soluzione CU e agitare vigorosamente;
- Aggiungere 50 µl di soluzione IR e agitare vigorosamente;
- Centrifugare per 2 min a 13.000 x g a temperatura ambiente;
- Trasferire il sovranatante in una nuova provetta da 2 ml;
- Aggiungere 400 µl di soluzione SB e agitare vigorosamente;
- Trasferire 600 µl di soluzione in una MB Spin Column e centrifugare per 1 min a 10.000 x g a temperatura ambiente. Eliminare l'eluato;
- Aggiungere 500 µl di soluzione CB nella MB Spin Column precedente e centrifugare per 30 s a 10.000 x g a temperatura ambiente. Eliminare l'eluato;
- Ripetere il passaggio precedente;
- Centrifugare la MB Spin Column per 2 min a velocità massima a temperatura ambiente;
- Posizionare la MB Spin Column in una nuova provetta da 2 ml;
- Aggiungere 50-100 µl di Soluzione EB. Incubare per 1 min a temperatura ambiente;
- Centrifugare per 1 min a 10.000 x g a temperatura ambiente; conservare l'eluato (DNA) a 4 °C.

Quantificazione DNA

Al termine della metodica di estrazione occorre quantificare il DNA isolato. Il metodo utilizzato è il saggio fluorimetrico *Qubit*[®] che offre un'elevata sensibilità analitica ed una maggiore specificità rispetto alla spettrofotometria classica (assorbanza a 260 nm).

Questo metodo di quantificazione prevede l'utilizzo di intercalanti fluorescenti (la natura del fluorocromo è coperta da brevetto) in grado di legarsi in modo aspecifico al DNA, generando una fluorescenza, rilevabile a 635 nm, attraverso il fluorimetro Qubit® 3.0 (Life Technologies). Il kit utilizzato è il Qubit® dsDNA HS Assay (Invitrogen) che prevede i seguenti passaggi:

- 1) Preparare una soluzione (WS) costituita da 1 µL di Qubit® reagent e 199 µL di Qubit® Buffer per ogni campione
- 2) Agitare la soluzione per alcuni secondi
- 3) Aggiungere in un tubo da lettura 198 µL di soluzione WS e 2 µL di campione di DNA estratto. Agitare vorticosamente e incubare per 2 min
- 4) Eseguire la lettura al fluorimetro Qubit® 3.0

Precipitazione del DNA

Questa metodica viene utilizzata per concentrare, desalare e recuperare il DNA in forma solida permettendone la successiva dissoluzione nella soluzione desiderata. Il protocollo prevede l'aggiunta di una soluzione 3 M di NaCl al campione di DNA (1/10 di volume). Dopo agitazione vigorosa, si aggiungono 2,5 volumi di EtOH assoluto. Il campione viene miscelato e incubato per 30 min a -20 °C; il DNA precipitato è recuperato mediante centrifugazione per 5 min a 1.000 x g. Al campione vengono aggiunti 70 µl di EtOH (70 %) e si ripete la centrifugazione. Il pellet viene, quindi, lasciato asciugare per un tempo non inferiore ai 10 min. Il DNA così ottenuto può essere risospeso nel volume desiderato di acqua o tampone.

End-point PCR

Il DNA estratto dalle diverse specie di spezie ed erbe aromatiche è stato amplificato mediante PCR con i primers specifici per determinare regioni note di DNA. I nomi e la sequenza dei primers sono descritti in Tabella 11. In ogni reazione di amplificazione sono stati utilizzati 5 µl di DNA preparato come descritto precedentemente.

Tabella 11: primers utilizzati per amplificare determinate regioni del DNA

Regione	Nome primer	Sequenza (5'-3')	Direzione
rbcL	rbcLa-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Forward
	rbcLa-R	GTAATAATCAAGTCCACCRCG	Reverse
	rbcLajf634R	GAAACGGTCTCTCCAACGCAT	Reverse
matK	matK-KIM1R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	Forward
	matK-KIM3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTACGAG	Reverse
	matK-390f	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	Forward
	matK-1326r	TCTAGCACAGAAAGTCGAAGT	Reverse
	NY552F	CTGGATYCAAGATGCTCCTT	Forward
	NY1150R	GGTCTTTGAGAAGAACGGAGA	Reverse
	matKpkF4	CCCTATTCTATTCAYCCNGA	Forward
	matKpkR1	CGTATCGTGCTTTTRIGYTT	Reverse
ITS2	ITS-S2F	ATGCGATACTTGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	Forward
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse
ITS	AB101	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	Forward
	AB102	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	Reverse
trnH-psbA	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Reverse
	trnH2	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	Forward
	psbA	CGAAGCTGGATCTACAAATGG	Reverse
	trnH(GUG)	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	Forward
	psbA501f	TTTCTCAGACGGTATGCC	Reverse

Nella tabella 12 vengono riportate le quantità dei reattivi utilizzati in ciascuna reazione di PCR (volume finale di 20 µl). Le soluzioni madri dei primers, con una concentrazione pari a 100 µM, sono state opportunamente diluite a 100 nM per amplificare le regioni *rbcL*, *trnH-psbA*, ITS e ITS2 e a 500 nM per amplificare la regione *matK*.

Tabella 12: reattivi di amplificazione per le reazioni di PCR relativi ai vari geni

rbcL, trnH-psbA, ITS, ITS2, matK	Volume (µl)
Acqua	4,60
Primer forward	0,2
Primer reverse	0,2
Master Mix	10
Campione di DNA	5
Volume totale	20

L' amplificazione è stata eseguita in piastre da 96 pozzetti utilizzando il termociclature Veriti™ 96-well (Applied Biosystems) secondo i protocolli termici riportati nella Tabella 13.

Tabella 12: schema di riferimento delle fasi di amplificazione, con relative temperature, tempi e cicli da eseguire

	conc. Primers (nM)	Temp (°C)	Time	Temp (°C)	Time	Temp (°C)	Time	Temp (°C)	Time	Cicli	Temp (°C)	Time
rbcL	100	94	4 min	94	30 sec	55	30 sec	72	1 min	35	72	10 min
matK 390f/1326r	500	94	5 min	94	1 min	48	30 sec	72	1 min	26	72	7 min
ITS2	100	94	5 min	94	30 sec	56	30 sec	72	45 sec	35	72	10 min
ITS	100	94	5 min	94	1 min	55	1 min	72	1 min	30	72	10 min
trnH-psbA	100	94	4 min	94	30 sec	55	30 sec	72	1 min	35	72	10 min

Controllo delle amplificazioni mediante elettroforesi su gel d'agarosio

È stata eseguita una corsa elettroforetica in gel di agarosio 2% per osservare la corretta amplificazione in PCR e visualizzare i prodotti (ampliconi). Sono stati utilizzati gel *SYBR® Safe™ DNA E-Gel®* da 12 pozzetti (la composizione sia dell'intercalante che del buffer contenuti nel gel è coperta da brevetto). I campioni (3 µl) in soluzione acquosa (17 µl free water) vengono irradiati mediante dei diodi emettitori di luce che producono un picco di emissione ristretto centrato a ~ 470 nm.

Conclusa la corsa elettroforetica (ca. 30 minuti), le bande di DNA nei gel sono state visualizzate mediante apparato Gel Doc 2000 (BioRad) e confrontate con le bande generate dal DNA Ladder E-Gel™ (marcatore di peso molecolare noto).

Sequenziamento con metodo Sanger

I campioni da sequenziare secondo Sanger hanno subito la metodica standard che prevede i seguenti passaggi:

1. Purificazione della reazione di amplificazione seguendo il trattamento enzimatico utilizzando il kit commerciale *ExoSAP®* (ThermoFisher Scientific): aggiungere 0.5 µl di Exo e 1.5 µl di Sap a 5 µl di campione. Incubare in termociclatore alle seguenti temperature: 15 min a 37 °C / 15 min a 75 °C;

Prima di procedere alla reazione di sequenziamento è, infatti, necessario rimuovere i residui della reazione di amplificazione precedente (nucleotidi e polimerasi). Per fare ciò si esegue il trattamento enzimatico sopra riportato. L'*ExoSAP®* è composto da due enzimi: l'Exo, una esonucleasi che degrada le catene a singolo filamento come i primers e i dNTP non incorporati, e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), una fosfatasi che defosforila i dNTPs residui.

2. PCR a terminazione di catena utilizzando il kit commerciale *ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing* effettuando per ogni campione due reazioni separate (una prevede l'utilizzo del primer forward, l'altra il primer reverse) come indicato in Tabella

14. Una volta preparata la miscela di reazione, la PCR è stata eseguita in termociclatore rispettando lo schema descritto in Tabella 15;

- Purificazione dei prodotti di PCR utilizzando il kit commerciale *BigDye® XTerminator™ Purification Kit*: aggiungere ai 20 µl di campione, 90 µl di SAM™ e 20 µl di BigDye® XTerminator™ (la loro composizione chimica è protetta da brevetto), porre in agitazione per 30 min. Centrifugare per 2 min a 1000 x g.

La purificazione permette di allontanare tutti i frammenti che non sono utili nella seguente fase di elettroforesi capillare. Al campione sono stati aggiunti SAM™ che migliora le prestazioni della soluzione XTerminator™ e stabilizza le reazioni di post-denaturazione, e BigDye® XTerminator™ che distrugge i terminatori non incorporati e i sali liberi dopo la reazione di sequenziamento

- Elettroforesi capillare utilizzando 30 µl del campione purificato.

Tabella 113: reattivi di amplificazione della reazione PCR a terminazione di catena

Componenti e concentrazioni	Volumi (µl)
<i>ABI PRISM® Big Dye™ Terminator V 3.0</i>	4
Primer forward/reverse 5 µM	0.64
Buffer di sequenziamento 5X	2
Acqua MilliQ	6.36
DNA amplificato	7

Tabella 15: schema di riferimento delle fasi di amplificazione, con relative temperature, tempi e cicli da eseguire

Fasi	Temperatura (°C)	Tempo
Attivazione della Taq polimerasi	96	1 min
Denaturazione	96	10 sec
Annealing	52	5 sec
Allungamento	72	4 min

} fasi ripetute per 25 cicli

Analisi NGS

Tutti i campioni che hanno subito un'analisi in NGS Ion Torrent, sono stati trattati seguendo la metodica standard riportata nella "User Guide Ion Torrent" (Life Technologies™). Le prime fasi della procedura sono:

- Estrazione, purificazione e quantificazione del DNA estratto

- Preparazione della *library* di frammenti

Nella fase di creazione della library sono stati eseguiti due differenti metodi di amplificazione mediante PCR: 1) PCR End-point “*Fusion method*” e 2) PCR Real-time. Gli amplificati ottenuti mediante il primo metodo sono stati controllati in gel di agarosio 2 % (come descritto precedentemente), mentre gli amplificati ottenuti mediante Real-time PCR sono stati monitorati durante l’analisi (valutando i Cicli soglia o threshold, Ct).

Per quanto riguarda la PCR End-point “*Fusion method*”, la regione di DNA presa in considerazione è quella corrispondente alla regione ITS2, utilizzando i *primers fusion* riportati in Tabella 16. I primers fusion sono degli oligonucleotidi a singolo filamento che servono come innesco per la replicazione del DNA ma, in aggiunta ai normali primers, possiedono all’estremità della catena nucleotidica un *barcode*, cioè una serie di nucleotidi identificativi di ogni singolo campione, paragonabile al funzionamento di un codice a barre commerciale.

Tabella 16: Primers (ITS2 FUSION) utilizzati con sequenze

Nome primers	Sequenza (5’-> 3’)
ITS2N-for	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGCTC TTCGATATGCGATACTTGGTGTGAAT (64)
ITS2N61-for	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACTCGG ATCGATATGCGATACTTGGTGTGAAT (64)
ITS2N62-for	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCTGCT TCACGATATGCGATACTTGGTGTGAAT (65)
ITS2N63-for	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTTAGA GTTTCGATATGCGATACTTGGTGTGAAT (64)
ITS2N64-for	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGAGTTC CGACGATATGCGATACTTGGTGTGAAT (65)
ITS2N-rev	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCCCTCCGCTTATTGA TATGC (43)

I componenti della miscela per la reazione di amplificazione e i protocolli termici utilizzati sono descritti nelle Tabelle 17 e 18. L’ amplificazione è stata eseguita nel termociclatore Veriti™ 96-well (Applied Biosystems).

Tabella 17: reattivi di amplificazione per le reazioni di PCR

Component	Volume (µl)
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	45
20-50 ng genomic DNA	4
10 µM primer stock mix	1
Total	50

Tabella 18: schema di riferimento delle fasi di amplificazione, con relative temperature, tempi e cicli da eseguire

Temp. °C	Time	Temp. °C	Time	Temp. °C	Time	Temp. °C	Time	Cicli	Temp. °C	Time
94	3 min	94	45 sec	55	1 min	72	1.5 min	35	72	10 min

La creazione della library è stata eseguita, alternativamente, mediante Real-time PCR, seguendo il kit commerciale “*Plant DNA Analyser – SGS*”. Questo kit è studiato specificamente per generare degli amplificati (ampliconi) di campioni del mondo vegetale. Contiene al suo interno due differenti Master Mix (composizione chimica protetta da brevetto) e due differenti sets di *Barcode primers* (i quali hanno una struttura analoga ai primers fusion, ma la loro composizione chimica in questo caso è protetta da brevetto). Lo schema di reazione per svolgere l’analisi è riportato in Tabella 19.

Tabella 19: reattivi di amplificazione per le reazioni di PCR

Component	Volume (µl)
Master mix	10
Dye	0.75
H ₂ O	8
Barcode primer	1.25
DNA	5
Total	25

In base all’intensità della banda di DNA visibile mediante elettroforesi in gel e a seconda dei valori di Ct osservati in Real-time PCR (inversamente proporzionale al contenuto iniziale di DNA), è stata unita un’aliquota di ogni campione per formare la libreria. Si è scelto di utilizzare entrambi i metodi di amplificazione poiché riguardano regioni diverse del DNA (la End-point PCR amplifica una porzione della regione ITS2, mentre per la Real-time PCR, poiché il kit è protetto da brevetto, non si conosce la regione di interesse).

Si è proceduto, quindi, alla pulizia della libreria secondo il protocollo *Agencourt AMPure®* (Beckman Coulter) che utilizza delle biglie per legare i frammenti di DNA amplificati in PCR. In tal modo i primers in eccesso, i nucleotidi e l'enzima possono essere rimossi dalla miscela. Una volta privata dai contaminanti, la libreria è stata quantificata (analisi al fluorimetro Qubit®) per calcolare la diluizione necessaria per ottenere un valore pari a 7 pmol in 25 µL. Sono seguite, quindi, le altre fasi di preparazioni delle sfere di amplificazione e di caricamento del chip per eseguire l'analisi NGS con il sistema Ion Personal Genome Machine (PGM). Tali passaggi si effettuano in giorni successivi:

- preparazione delle sfere ISPs (Ion Sphere Particles): legame dei frammenti di DNA alle sfere di amplificazione;
- preparazione della PCR per emulsione (OT2) per amplificare le ISPs; l'analisi è svolta secondo il manuale riportato nel kit commerciale "*Ion PGM Hi-q OT2 Kit*", selezionando nello strumento una grandezza di frammenti pari a 400 bp;
- arricchimento delle sfere ISPs mediante lo strumento ES che procede alla concentrazione e purificazione delle ISPs con eliminazione delle sfere non legate attraverso un procedimento magnetico;
- caricamento del chip e preparazione dello strumento PGM;
- analisi di sequenziamento mediante PGM: tutte le fasi sono descritte nel kit commerciale "*Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit*" (Publication Number: MAN0010902);
- elaborazione bioinformatica dei dati ottenuti

Metodi di analisi per l'identificazione di specie mediante composti volatili

Estrazione a caldo con ultrasuoni

La procedura prevede di pesare circa 0.05 g di campione tal quale se in polvere, macinato se in foglie o pistilli; vengono aggiunti 50 ml di miscela estraente (50:50 CH₃OH : H₂O) e la soluzione, contenuta in una provetta da 50 ml, viene sonicata per 15 min a 30 °C utilizzando il bagno sonicatore Transsonic 460/H (Elma). Dopo centrifugazione per 5 min a 2.000 x g, si prelevano 25 ml di sovrantante per le analisi.

Analisi spettrofotometrica

Si attuano per ogni campione due letture allo spettrofotometro: una del campione tal quale, l'altra del campione diluito 1:10. Si effettuano le letture in un intervallo di lunghezza d'onda compreso tra 200 e 600 nm, utilizzando come bianco la miscela estraente. Lo strumento con cui si è svolta l'analisi è lo spettrofotometro per micropiastre da 96 pozzetti Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

Analisi HPLC

Anche per l'analisi HPLC sono state effettuate due corse per ogni campione, una con il campione tal quale e una con il campione diluito come descritto precedentemente. Di seguito sono riportati i parametri di analisi:

Strumento: *PU-980 Intelligent HPLC* (Jasco)

Colonna: Phenomenex Prodigy™ ODS (3) 5 µm, 250 mm x 4,6 mm,

Fase mobile: H₂O + 3% CH₃COOH (identificato con A) e CH₃CN + 3% CH₃COOH (identificato con B); la miscela A e la miscela B si trovano in un rapporto 80:20

Gradiente: vedere Tabella 20

Tempo di corsa: 58 min

Flusso: 1 ml/min

Volume di iniezione: 20 µl

λ: 285 nm

Rilevatore: UV/VIS

Tabella 20: Parametri di gradiente per analisi HPLC

Time (min)	Flow	% A	% B
0	1 ml/min	93	7
0.1	1 ml/min	93	7
30	1 ml/min	72	28
38	1 ml/min	75	25
45	1 ml/min	2	98
47	1 ml/min	2	98
48	1 ml/min	93	7
58	1 ml/min	93	7

Analisi Heracles II (ALPHA M.O.S)

Per ottenere il profilo dell'aroma e una caratterizzazione correlata all'analisi sensoriale, ma anche una separazione e identificazione dei composti chimici secondo i principi della gascromatografia, i vari campioni sono stati sottoposti ad un'analisi di "Ultra Fast Gas Chromatography" mediante lo strumento Heracles II. Le fasi dell'analisi sono di seguito riportate:

- porre una quantità di campione (30 ± 3 mg) in una provetta di vetro da 20 ml e sigillarla con un tappo magnetico;
- posizionare le provette nell'auto-campionatore e iniziare l'analisi;
- elaborare i cromatogrammi per ottenere i dataset di partenza mediante il software di *Alfasoft*®. Successivamente sottoporre i dataset alla tecnica chemiometrica PCA mediante i softwares *The Unscrambler*® X e *JMP Statistical Discovery*™.

I parametri dell'analisi Heracles sono riportati nella Tabella 21.

Tabella 21: Parametri analisi GC mediante Heracles II

FORNETTO AGITATORE	
Tempo di incubazione (s)	1200
Temperatura di incubazione (°C)	50
Velocità di agitazione (rpm)	500
AUTOCAMPIONATORE	
Tempo di aspirazione (s)	90
Temperatura (°C)	60
Velocità di aspirazione ($\mu\text{L s}^{-1}$)	500
INIETTORE	
Volume di iniezione (μL)	5000
Velocità di iniezione ($\mu\text{L s}^{-1}$)	100
Temperatura (°C)	200
Pressione di iniezione (kPa)	10
Flusso fino alla trappola (mL min^{-1})	30
Tempo di iniezione (s)	60
TRAPPOLA ADSORBENTE	
<i>A) ADSORBIMENTO</i>	
Temperatura iniziale (°C)	40
Pressione del gas carrier (kPa)	60
Tempo di adsorbimento (s)	65
<i>B) DESORBIMENTO</i>	
Tempo di riscaldamento (s)	35
Temperatura finale (°C)	240
Tempo di desorbimento (s)	93
Pressione (kPa)	80
Velocità di trasferimento in colonna (mL min^{-1})	10
VALVOLA A 6 VIE	
Temperatura (°C)	250

COLONNE CROMATOGRAFICHE	
Temperatura iniziale (°C)	40
Isoterma iniziale (s)	2
Rampa di riscaldamento (°C s ⁻¹)	3.0
Temperatura finale (°C)	270
Isoterma finale (s)	21
Tempo di acquisizione (s)	100
Periodo di acquisizione (s)	0.01
RIVELATORI A IONIZZAZIONE DI FIAMMA	
Temperatura (°C)	270
Guadagno di segnale	12

Nella Tabella 22 sono riportati l'identificazione dei vari campioni e le analisi svolte su ciascuno di essi.

Tabella 22: Identificazione campioni ed analisi svolte su ognuno

ID campione	Prodotto	Metodo estrazione DNA	Metodo Sanger	NGS	Estrazione a caldo	HPLC	Heracles II
Z01	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z02	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z03	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z04	Zafferano prima categoria ISO	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z05	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z06	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z07	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z08	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z09	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z10	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z11	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z12	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z13	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z14	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z15	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z16	Zafferano prima categoria ISO	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z17	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z18	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z19	Zafferano in polvere italiano	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z20	Zafferano in polvere biologico	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z21	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z22	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z23	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z24	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z25	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z26	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z27	Zafferano in polvere	Blood & Tissue Kit	No	Plant SGS	Si	Si	Si
Z28	Zafferano in pistilli	Blood & Tissue Kit	Si	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z29	Zafferano in pistilli	Blood & Tissue Kit	Si	Plant SGS	Si	Si	Si
Z30	Zafferano in pistilli	Blood & Tissue Kit	Si	Plant SGS	Si	Si	Si
Z31	Zafferano in pistilli	Blood & Tissue Kit	Si	Plant SGS/ITS2	Si	Si	Si
Z32	Zafferano in pistilli	Blood & Tissue Kit	Si	Plant SGS	Si	Si	Si
Z33	Zafferano in pistilli	Blood & Tissue Kit	Si	Plant SGS	Si	Si	Si

AG01	Agllo in pezzi	Plant mini Kit	No	Plant SGS	No	No	No	Si
CP01	Cipolla in focchi	Plant mini Kit	No	Plant SGS	No	No	No	Si
OR01	Origano in foglie	Plant mini Kit	No	Plant SGS	No	No	No	Si
OR 1/1	Origano in foglie	Mericort™ Food Kit	No	Plant SGS/TTS2	No	No	No	No
OR 1/2	Origano in foglie BIO	Mericort™ Food Kit	No	Plant SGS/TTS2	No	No	No	No
CR01	Cartamo	Plant mini Kit	No	Plant SGS	No	No	No	No
CR02	Cartamo	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No
CR03	Cartamo	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No
CR04	Cartamo	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No
1	Olivo in foglie	Plant mini Kit	Si	No	No	No	No	No
2	Olivo in foglie	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No
3	Olivo in foglie	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No
4	Olivo in foglie	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No
6	Timo in foglie	Plant mini Kit	Si	Plant SGS	No	No	No	No
7	Timo in foglie	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No
8	Origano in foglie	Plant mini Kit	Si	Plant SGS	No	No	No	No
9	Origano in foglie	Plant mini Kit	Si	Plant SGS	No	No	No	No
10	Mirto in foglie	Plant mini Kit	Si	Plant SGS	No	No	No	No
11	Cisto in foglie	Plant mini Kit	Si	Plant SGS	No	No	No	No
12	Calendula	Plant mini Kit	Si	Plant SGS	No	No	No	No
13	Calendula	Plant mini Kit	No	No	No	No	No	No

RISULTATI E DISCUSSIONI

L'obiettivo della tesi è stato quello di trovare e ottimizzare metodi per l'identificazione delle specie vegetali per assicurare l'autenticità dei prodotti alimentari, in particolare nelle spezie ed erbe aromatiche. A tale scopo sono state eseguite analisi DNA barcoding e fingerprinting dei composti volatili.

DNA barcoding

Scelta la tecnica del DNA barcoding come metodo di approccio base su cui fondare le analisi dei campioni, è stato eseguito uno studio bibliografico per cercare le regioni di DNA che fossero maggiormente capaci di discriminare il più alto numero di specie vegetali.

Sono state trovate 5 regioni del DNA corrispondenti ai criteri di ricerca, che risultavano essere promettenti come candidati barcode. Si riportano di seguito i loro nomi:

- *rbcL*, subunità grande della ribulosio 1,5-difosfato carbossilasi (RuBisCO)
- *matK*, maturasi K
- Gene nucleare ITS (Internal transcribed spacer)
- Gene nucleare ITS2 (Internal transcribed spacer 2)
- Spaziatore intergenico *trnH-psbA* (*trnH-psbA intergenic spacer region*)

Il primo passo è stato quello di amplificare il DNA dei vari campioni di piante presi in esame (lista descritta nei materiali e metodi) con i sets di primers a disposizione per verificarne sia l'efficienza di amplificazione sia la dimensione dei frammenti generati. I metodi di estrazione del DNA hanno previsto l'utilizzo di kit commerciali, riportati nel paragrafo "Materiali e Metodi". Nella Tabella 23 vengono riportati i risultati ottenuti dai vari gel.

Tabella 23: risultati dei vari gel rappresentati in Figure 16, 17, 18. Per ogni campione e regione di amplificazione si riporta l'intensità della banda: + (intensità media), ++ (intensità forte), - (non amplificato), NA (non analizzato).

Campioni	rbcLa-F/R (a)	rbcLa-F/634R (b)	trnH2/psbAF (c)	trnH/psbA (d)	ITS	ITS2	matK
Z28	+	+	+	-	-	++	-
Z29	++	++	++	-	-	++	-
Z30	++	++	++	-	-	++	-
Z31	-	+	-	-	-	++	-
Z32	++	++	++	-	-	++	-
Z33	+	+	+	-	-	++	-
Z1	+	+	++	-	NA	NA	-
Z7	+	++	++	-	NA	NA	-
Z22	NA	NA	NA	NA	++	++	-
Z25	NA	NA	NA	NA	++	++	-
OR1 (origano)	-	-	-	-	-	-	-
CP1 (cipolla)	+	++	++	+	++	++	-
1 (ulivo)	-	-	-	NA	NA	+	-
6 (timo)	++	++	+	NA	NA	++	-
8 (origano)	++	++	-	NA	NA	++	-
T (grano tenero)	+	++	++	NA	NA	++	-
M (mais)	++	++	++	NA	NA	++	-
S1 (soia)	++	++	+	NA	NA	++	-
59 (mais)	++	++	++	NA	NA	++	-
10 (mirto)	+	+	-	NA	NA	++	-
11 (cisto)	++	++	++	NA	NA	++	-
12 (calendula)	+	+	++	NA	NA	++	-

Si descrive con il simbolo + una banda elettroforetica di media amplificazione, con il simbolo ++ una banda elettroforetica di elevata amplificazione, con il simbolo - l'assenza di amplificazione e con l'acronimo NA una analisi non avvenuta. I campioni di zafferano analizzati, invece, sono identificati con la sigla Z28, Z29, ecc.

Dall'analisi della Tabella 23 si evidenzia l'assenza totale di amplificati per le regioni *matK* e *trnH-psbA* (eccetto un campione di cipolla, CP1); le foto dei gel, per queste due regioni, non sono state riportate. Per quanto riguarda le altre regioni di DNA, invece, delle bande di amplificazione più o meno intense sono state ottenute in tutti i campioni, ad eccezione del campione Z31 che non ha mostrato amplificazione della regione *trnH*, di una porzione di *rbcL* e di ITS.

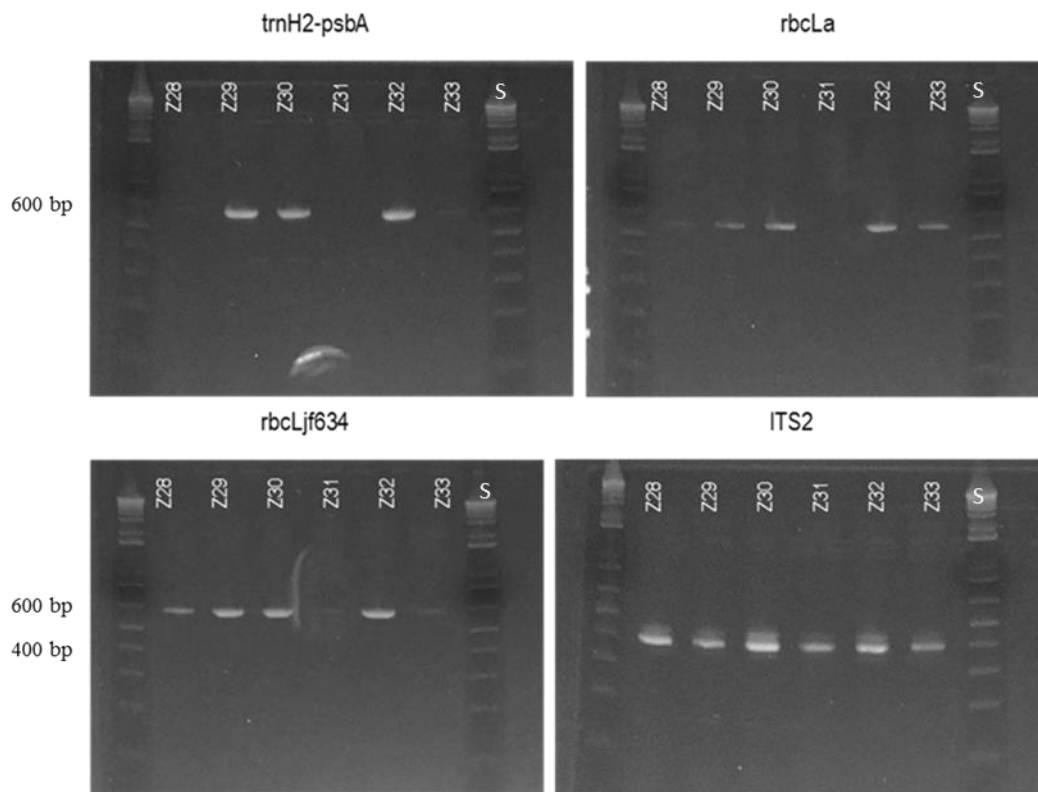


Figura 26: Gel al 2% di agarosio contenente le bande di amplificazione di 6 campioni di zafferano in pistilli (Z28-Z33) corrispondenti alle varie regioni di DNA, confrontate con le bande di amplificazione dello standard (S) E-Gel™ 1 kb Plus DNA Ladder

La Figura 16 mostra i risultati ottenuti analizzando i 6 campioni di zafferano in pistilli, identificati con la sigla Z28 – Z33. Dalle immagini dei gel, oltre ad una determinazione qualitativa dell'intensità delle bande, è possibile valutare quantitativamente la grandezza degli amplificati ottenuti. Comparando le bande dei campioni con uno standard di riferimento, si può vedere come i frammenti relativi alle regioni *trnH-psbA* e *rbcL* si aggirano intorno ai 500/600 nucleotidi, a differenza dei frammenti ottenuti per la regione ITS2 che corrispondono a circa 400 bp.

La Figura 17 mostra, invece, i risultati dei gel relativi ai 4 campioni di zafferano in polvere scelti, a un campione di origano (OR1) e ad un campione di cipolla (CP1).

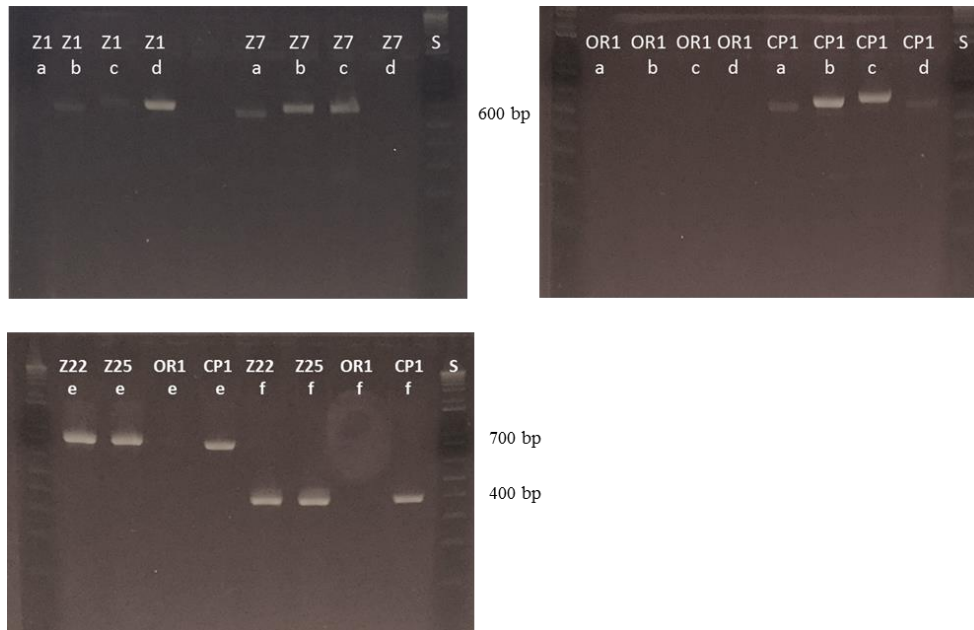


Figura 17: gel al 2% di agarosio contenente le bande di amplificazione dei seguenti campioni: zafferano in polvere (Z1, Z7, Z22, Z25), cipolla (CP1) e origano (OR1) in relazione alle bande di amplificazione dello standard (S) E-Gel™ 1 kb Plus DNA Ladder; le regioni di DNA amplificate sono: *rbcLa-F/R* (a), *rbcLa-F/634R* (b), *trnH2/psbA* (c), *trnH/psbA* (d), ITS (e), ITS2 (f).

Per la regione *trnH* non si è osservata amplificazione ad eccezione del campione CP1, mentre per le altre regioni di interesse, le bande di amplificazione sono visibili a diversa intensità eccetto per il campione OR1 che ha dato esito negativo in ogni analisi. Anche in questo caso la grandezza dei frammenti per il gene ITS2 risulta essere di 400 pb, mentre i restanti frammenti superano i 700 pb.

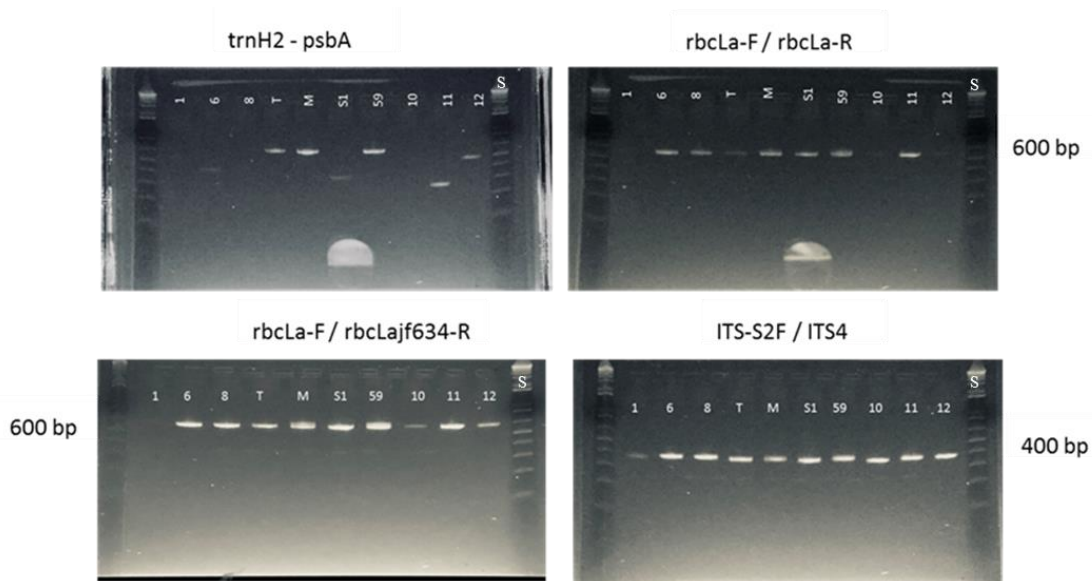


Figura 18: Gel al 2% di agarosio contenente le bande di amplificazione dei seguenti campioni: ulivo (1), timo (6), origano (8), grano tenero (T), mais (M), soia 30 (S1), mais 59122 (59), mirto (10), cisto (11), calendula (12); S: standard E-Gel™ 1 kb Plus DNA Ladder.

La Figura 18 mostra gli amplificati ottenuti, relativi alle diverse regioni di DNA analizzate, per alcuni campioni di spezie, erbe aromatiche e piante. Le bande di amplificazione per quasi tutti i campioni risultano visibili, con intensità e grandezza variabile. Per quanto riguarda la regione ITS2, i frammenti risultano essere sempre di circa 400 bp, mentre per le altre regioni, ad eccezione di qualche campione, i frammenti sono più grandi e si aggirano intorno ai 600 nucleotidi.

Quando tutti i campioni finora descritti sono stati amplificati con i primers specifici per la regione *matK* (maturasi K), le analisi hanno dato tutte esito negativo (le foto dei gel non sono state riportate). La difficoltà di amplificazione del gene *matK* è già stata riscontrata, precedentemente, da altri autori (Staats, Arulandhu, Gravendeel, & al., 2016). Tale gene, quindi, non risulta appropriato per essere utilizzato come codice a barre.

Sequenziamento con metodo Sanger

Una volta ultimate queste analisi preliminari, si è passati ad analizzare i 6 campioni di zafferano in pistilli, da Z28 a Z33, mediante la tecnica di sequenziamento Sanger. Il fine di questa analisi è identificare un gene, tra quelli sopra citati, che desse un risultato di identificazione univoco della specie.

Le diverse corse elettroforetiche producono come risultato gli elettroferogrammi (un esempio in Figura 19) che devono essere interpretati per potere risalire alla sequenza genica. Il software integrato Sequencing Analysis 5.3.1 (Thermo Fisher Scientific) elabora i dati grezzi (esempio in Figura 20) e restituisce, autonomamente, la sequenza dei nucleotidi del frammento analizzato con un indice di qualità della chiamata delle base riportato direttamente sull'elettroferogramma (Figura 19). Questo permette di controllare e scegliere le parti della sequenza con un indice di chiamata delle base buono, ossia quelle la cui identificazione da parte dello strumento risulta essere molto probabile e quindi certo (colore blu), come mostrato nella Figura 21. Si riporta di seguito, un esempio delle fasi svolte, dopo il termine dell'analisi strumentale, per arrivare al risultato finale.

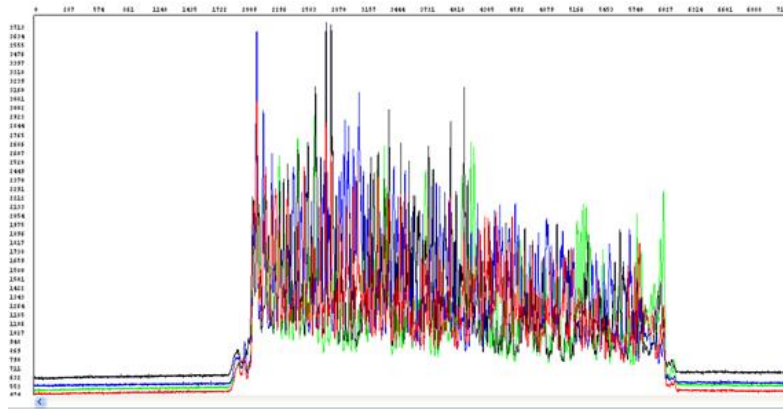


Figura 20: rappresentazione dei dati grezzi mediante software integrato Sequencing Analysis 5.3.1 (Thermo Fisher Scientific) ottenuti dopo una corsa elettroforetica con metodo Sanger

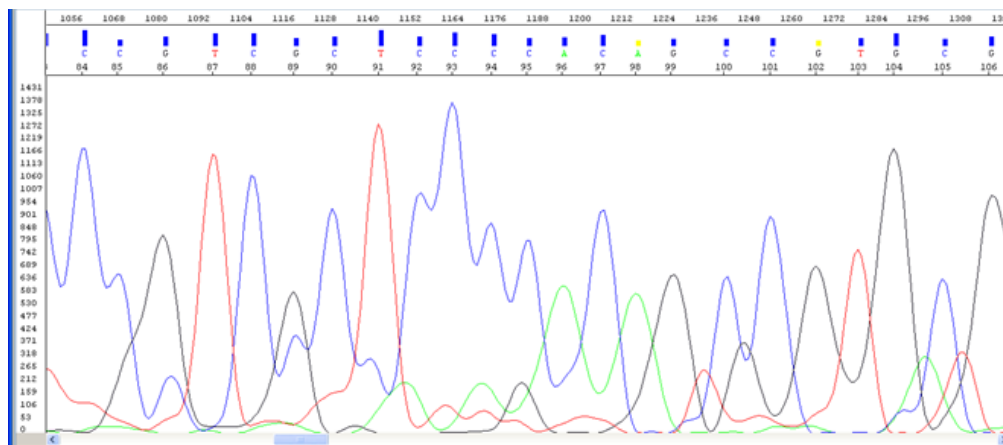


Figura 19: esempio di una parte dell'elettroferogramma, con chiamata delle basi e indice di qualità della chiamata, ottenuto dopo sequenziamento con metodo Sanger

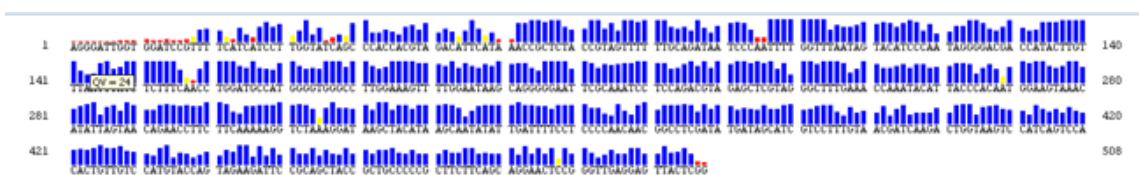


Figura 21: rappresentazione della chiamata delle basi con l'indice di qualità della chiamata. Una chiamata della base identificata con il colore blu sta ad indicare una lettura da parte dello strumento certa, con un valore di probabilità di correttezza elevato

Le sequenze vengono poi esportate in formato FASTA, come si vede nel riquadro sottostante (Figura 22)

```
>z29-rbcL634
ACAGATTGACTTATTATACTCCGGAGTACGAACCAAGATACTGATATCTTGCCAGCATTCCGAGTACTCCTCA
CCCGGAGTTCCTGCTGAAGAAGCGGGGGCAGCGGTAGCTGCGGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACAGT
GTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTATCATATCGAGGCCGTTGTTGGGGA
GG
```

Figura 22: esempio di esportazione di una sequenza di DNA, ottenuta con la tecnica di sequenziamento Sanger in formato FASTA

Poiché le analisi di sequenziamento sono state eseguite sia con il primers *forward* che con quello *reverse* si procede con l'allineamento delle due sequenze complementari così da ottenere una sequenza più lunga del frammento della regione di DNA analizzata (sequenza *contig*). Questa fase è stata effettuata mediante il programma gratuito GSC Pro SetUP, come mostrato nella Figura 23, dove la riga Z29-R identifica la sequenza ottenuta dal primers *forward*, mentre la riga Z29-634 corrisponde alla sequenza ottenuta con il primer *reverse* (complementare e invertita).

```

          10          20          30          40          50
Contig 2 TACAGATTGA CTTATTATAC TCCGGASTAC GAAACCAAAG ATACTGATAT
z29-R    TACAGATTGA CTTATTATAC TCCGGACTAC GAA-CCAA-G ATACTGATAT
z29-634 -ACAGATTGA CTTATTATAC TCCGGAGTAC GAA-CCAA-C ATACTGATAT
z29-R    -----
z29-634 -----TAC GAAACCAAAG ATACTGATAT

          60          70          80          90          100
Contig 2 CTTGGCAGCA TTCCGAGTAA CTCCTCAACC CGGAGTTCCT GCTGAAGAAG
z29-R    CTTGGCAGCA TTCCGAGTA- CTCCTCA-CC CGGAGTTCCT GCTGAAGAAG
z29-634 CTTGGCAGCA TTCCGAGTAA CTCCTCA-CC CGGAGTTCCT GCTGAAGAAG
z29-R    CTTGGCAGCA TTCCGAGTAA CTCCTCAACC CGGAGTTCCT GCTGAAGAAG
z29-634 -----AGTAA CTCCTCAACC CGGAGTTCCT GCTGAAGAAG

          110         120         130         140         150
Contig 2 CGGGGGCAGC GGTAGCTGCC GAATCTTCTA CTGGTACATG GACAACAGTG
z29-R    CGGGGGCAGC GGTAGCTGCC GAATCTTCTA CTGGTACATG GACAACAGTG
z29-634 CGGGGGCAGC GGTAGCTGCC GAATCTTCTA CTGGTACATG GACAACAGTG
z29-R    CGGGGGCAGC GGTAGCTGCC GAATCTTCTA CTGGTACATG GACAACAGTG
z29-634 CGGGGGCAGC GGTAGCTGCC GAATCTTCTA CTGGTACATG GACAACAGTG

          160         170         180         190         200
Contig 2 TGGACTGATG GACTTACCAG TCTTGATCGT TACAAAGGAC GATGCTAYCA
z29-R    TGGACTGATG GACTTACCAG TCTTGATCGT TACAAAGGAC GATGCTACCA
z29-634 TGGACTGATG GACTTACCAG TCTTGATCGT TACAAAGGAC GATGCTATCA
z29-R    TGGACTGATG GACTTACCAG TCTTGATCGT TACAAAGGAC GATGCTATCA
z29-634 TGGACTGATG GACTTACCAG TCTTGATCGT TACAAAGGAC GATGCTATCA

          210         220         230         240         250
Contig 2 TATCGAGGCC GTTGTTGGGG AGGAAAATCA ATATATTGCT TATGTAGCTT
z29-R    TATCGAGGCC GTTGTTGGGG AGGAAAATCA ATATATTGCT TATGTAGCTT
z29-634 TATCGAGGCC GTTGTTGGGG AGGAAAATCA ATATATTGCT TATGTAGCTT
z29-R    TATCGAGGCC GTTGTTGGGG AGGAAAATCA ATATATTGCT TATGTAGCTT
z29-634 TATCGAGGCC GTTGTTGGGG AGGAAAATCA ATATATTGCT TATGTAGCTT

```

Figura 23: esempio di allineamento delle sequenze ottenute mediante il primer forward (Z29-R) e quello reverse (Z29-634) per ottenere una sequenza finale (contig), mediante il software GSC Pro SetUP

Una volta concluso l'allineamento, si procede con l'utilizzo dell'algoritmo Basic Local Alligment Search Tool (BLAST[®] – [National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine](#)), così da confrontare la sequenza di interesse (*contig*) con un database di sequenze già note (Genbank) e di identificare fra quest'ultime quelle che presentano maggiori somiglianze con la sequenza incognita.

L'algoritmo BLAST consta essenzialmente di 3 fasi: importazione della sequenza in formato FASTA; ricerca della sequenza all'interno della banca dati; visualizzazione delle sequenze

trovate con assegnamento di un punteggio (score). Le sequenze che si andranno a considerare saranno solo quelle con una percentuale di identità massima per ogni campione

La pagina dei risultati BLAST include una rappresentazione grafica del risultato (Figura 24) in cui sono evidenziate le percentuali di identità, la descrizione delle sequenze che producono allineamenti significativi (Tabella 24) e gli allineamenti fra la sequenza incognita in esame e le sequenze presenti nel database (Figura 25).

Graphic Summary.



Figura 24: rappresentazione grafica del risultato, in cui si vede la sequenza ignota (linea spessa azzurra, query in alto) allineata con le sequenze contenute nel database con diversi valori di scores (diversi colori)

Le sequenze nucleotidiche del database che producono allineamenti significativi con la sequenza da analizzare (*query*) vengono ordinate in base alla percentuale di identità. Nella Tabella 24 riassuntiva sono presenti anche altri valori di classificazione dei risultati come il "E-value", un valore che indica la probabilità che l'allineamento proposto sia casuale (la bontà del risultato è inversamente proporzionale con il valore riportato) e il "*query coverage*" che indica la percentuale di sequenza allineata con la corrispondente sequenza del database.

Tabella 144: tabella descrittiva gli allineamenti significativi tra sequenza incognita e sequenza presente nel database secondo la percentuale di identità (ident), la percentuale di allineamento (query cover) e il suo relativo E-value

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Query cover	E value	Ident
Crocus sativus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus pallasii ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus oreocreticus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus cartwrightianus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus sativus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus sativus isolate ISr3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; plastid	100%	0.0	99%
Crocus cartwrightianus isolate ISr2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; plastid	100%	0.0	99%
Crocus cartwrightianus isolate ISr1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; plastid	100%	0.0	99%
Crocus cartwrightianus voucher Chase 11726 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus hadriaticus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	98%
Crocus gargaricus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus sativus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	100%	0.0	99%
Crocus oreocreticus isolate 9R ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	98%	0.0	99%
Crocus sativus isolate 1R ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	98%	0.0	99%

L'ultima parte dei risultati forniti dall'analisi BLAST, come si vede in Figura 25, riporta gli allineamenti fra la sequenza input e le sequenze trovate nel database. In questa sezione è possibile visualizzare la sequenza nucleotidica con indicata la percentuale di identità rispetto alla sequenza di confronto e il numero di interruzioni (gap) che indicano un mancato allineamento tra le sequenze confrontate.

Alignments

Crocus sativus ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloroplast
 Sequence ID: MG946914.1 Length: 1425 Number of Matches: 1
 Range 1: 44 to 490

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
800 bits(433)	0.0()	443/447(99%)	4/447(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	ACAGATTGACTTATTATACTCCGGAGTACGAA-CC-AAGATACTGATATCTTGGCAGCAT				58
Sbjct 44	ACAGATTGACTTATTATACTCCGGAGTACGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCAT				103
Query 59	TCCGAGTA-CTCCTC-ACCCGGAGTTCCCTGCTGAAGAAGCGGGGCAGCGGTAGCTGCGG				116
Sbjct 104	TCCGAGTAACTCCTCAACCCGGAGTTCCCTGCTGAAGAAGCGGGGCAGCGGTAGCTGCGG				163
Query 117	AATCTTCTACTGGTACATGGACAACAGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTT				176
Sbjct 164	AATCTTCTACTGGTACATGGACAACAGTGTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTT				223
Query 177	ACAAAGGACGATGCTATCATATCGAGGCCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATAATGCTT				236
Sbjct 224	ACAAAGGACGATGCTATCATATCGAGGCCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATAATGCTT				283
Query 237	ATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAATATGTTACTTCCA				296
Sbjct 284	ATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAATATGTTACTTCCA				343
Query 297	TTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAGGATTTGCGAA				356
Sbjct 344	TTGTGGGTAATGTATTTGGTTTCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAGGATTTGCGAA				403
Query 357	TTCCCCCTGCTTATTCAAAACTTTCAAAGGCCACCCCATGGCATCCAGGTTGAAAAGAG				416
Sbjct 404	TTCCCCCTGCTTATTCAAAACTTTCAAAGGCCACCCCATGGCATCCAGGTTGAAAAGAG				463
Query 417	ATAAATTAAACAAGTATGGTCGTCCCC				443
Sbjct 464	ATAAATTAAACAAGTATGGTCGTCCCC				490

Figura 25: allineamento fra la sequenza incognita (query) e quella contenuta nel database (Sbjct)

Di seguito, nella Tabella 25, vengono riportati i risultati ottenuti per i vari campioni di zafferano analizzati per le diverse regioni di DNA amplificate. In particolare, nell'ultima colonna, sono elencati il genere e la specie individuata mediante analisi BLAST, tenendo conto della percentuale di allineamento e di identità con la sequenza incognita. Per ogni campione sono descritte anche le regioni geniche amplificate.

Dall'analisi di sequenziamento dei sei campioni di zafferano in pistilli mediante metodo Sanger, è possibile concludere che, a parte due eccezioni riguardanti la porzione *rbcL*-R (non analizzabile), tutte le altre regioni di DNA considerate riescono ad identificare i campioni fino al livello tassonomico di genere, cioè "*Crocus*". Solamente la regione intergenica ITS2 ha permesso di identificare in modo univoco anche la specie, che è risultata essere "*sativus*". Si può affermare, quindi, che la regione ITS2 funziona perfettamente per il barcoding e identifica il "*Crocus sativus*" come unica specie presente nei campioni analizzati.

Tabella 25: risultati del sequenziamento Sanger dei campioni di zafferano in pistilli (Z28-Z33). Sono riportati i risultati di genere e specie ottenuti tenendo conto i valori di: regione di DNA amplificata, % di allineamento fra la sequenza incognita e quella contenuta nel database (Query cover), valore indicante un risultato di natura casuale (E-value), % di identità finale (Ident)

ID campione	Regione	Query cover	E. value	Ident	Risultati
<u>Z28</u>	rbcL - 634	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus
	trnH2	78%	$9 \cdot 10^{-82}$	86%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus hadriaticus 4) Crocus cartwrightianus
	ITS2	91%	$2 \cdot 10^{-79}$	96%	1) Crocus sativus
	rbcL - R	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus gargaricus
<u>Z29</u>	rbcL - 634	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus 4) Crocus pallasii
	trnH2	100%	$8 \cdot 10^{-177}$	96%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus hadriaticus 4) Crocus cartwrightianus 5) Crocus pallasii
	ITS2	100%	$2 \cdot 10^{-151}$	99%	1) Crocus sativus
	rbcL - R	NA	NA	NA	NA
<u>Z30</u>	rbcL - 634	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus 4) Crocus pallasii
	trnH2	100%	0,0	86%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus hadriaticus 4) Crocus cartwrightianus 5) Crocus pallasii
	ITS2	100%	$6 \cdot 10^{-125}$	99%	1) Crocus sativus
	rbcL - R	99%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus 4) Crocus pallasii

Z31	rbcL - 634	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus
	trnH2	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus
	ITS2	100%	$8 \cdot 10^{-157}$	95%	1) Crocus sativus
	rbcL - R	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus 4) Crocus pallasii 5) Crocus gargaricus
Z32	rbcL - 634	99%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus 4) Crocus pallasii
	trnH2	95%	$4 \cdot 10^{-67}$	93%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus hadriaticus 4) Crocus cartwrightianus 5) Crocus pallasii
	ITS2	99%	0,0	98%	1) Crocus sativus
	rbcL - R	100%	0,0	94%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus 4) Crocus pallasii
Z33	rbcL - 634	100%	0,0	99%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus cartwrightianus 4) Crocus hadriaticus
	trnH2	100%	0,0	93%	1) Crocus sativus 2) Crocus oreocreticus 3) Crocus hadriaticus 4) Crocus cartwrightianus
	ITS2	100%	$7 \cdot 10^{-167}$	98%	1) Crocus sativus
	rbcL - R	NA	NA	NA	NA

NGS

Come descritto nell'introduzione, i metodi NGS di sequenziamento del DNA di nuova generazione stanno sostituendo sempre più il metodo tradizionale di Sanger; le nuove tecniche, infatti, permettono di ridurre i tempi di analisi e, soprattutto, di analizzare anche matrici complesse. Un ulteriore vantaggio è la possibilità di amplificare corti frammenti di DNA e di effettuare numerose letture in parallelo (milioni di frammenti).

In questo studio, la piattaforma di NGS utilizzata è il sistema Ion Torrent (Ion System™ PGM). Per la validazione di un metodo home-made adatto al DNA barcoding è stato utilizzato in parallelo un kit commerciale di riferimento (ID Plant, SGS Molecular).

La messa a punto del metodo di DNA barcoding in NGS ha comportato i seguenti passaggi:

- Identificazione di un gene, tra quelli normalmente utilizzati per il plant barcoding, che generasse un frammento di dimensioni adatte per l'analisi con lo strumento Ion System™ PGM (Ion Torrent™).
- Confronto di due software, uno commerciale (SGS Molecular), e uno appositamente creato (Plug-In) per l'elaborazione dei dati generati dall'NGS.

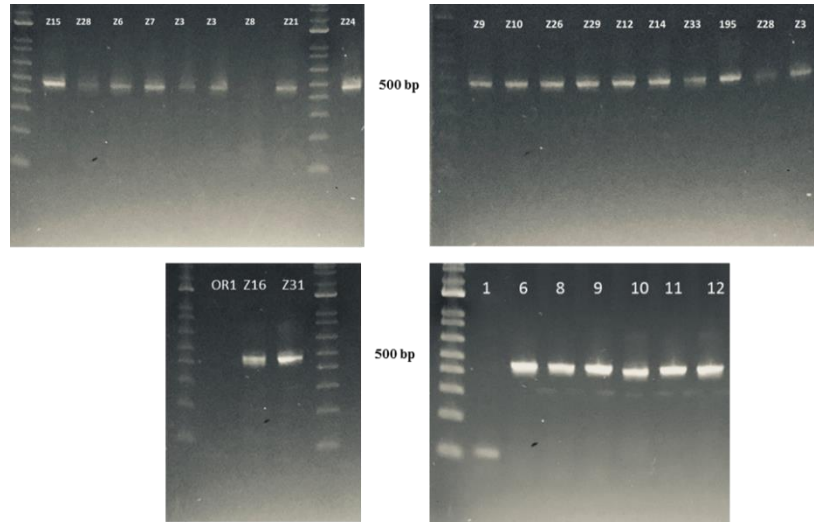
Questi software permettono, infatti, di eseguire le operazioni necessarie per:

- Separare le sequenze generate (*reads*) secondo il loro barcode ed eliminare le sequenze di bassa qualità;
- Eliminare dalle sequenze la parte corrispondente agli adattori presenti all'estremità 3' e 5';
- Raggruppare le *reads* uguali e generare i *contig* (che derivano da sovrapposizione e assemblaggio delle corte sequenze);
- Analisi BLAST.

Per quanto riguarda il primo punto, l'analisi degli amplificati in gel, precedentemente discussa, ha evidenziato che la regione ITS2, che fornisce dei frammenti di circa 400 bp, risulta essere adatta ad essere utilizzata per l'analisi NGS mediante la tecnologia Ion Torrent.

La seconda fase ha comportato, quindi, l'amplificazione dei campioni scelti di zafferano e di alcune erbe aromatiche con i primers specifici per la regione ITS2; i primers sono stati sintetizzati in modo da aggiungere, alle estremità, gli appositi adattatori e barcode indispensabili per l'analisi NGS (detti primers ITS2 fusion). Gli stessi campioni sono stati amplificati anche con il kit commerciale ID Plant. Come si può vedere dalla Figura 26, in tutti i campioni selezionati l'amplificazione con i primers modificati ITS2 fusion

ha generato delle bande nette, ad eccezione del campione di origano OR1 e di un campione di ulivo. Le dimensioni dei frammenti risultano essere di circa 500 bp, corrispondente a quanto atteso.



1: ulivo; 6: timo; 8: origano; 9: origano; 10: mirto; 11: cisto; 12: calendula

Figura 26: gel al 2% di agarosio contenente le bande di amplificazione dei campioni di zafferano in polvere, di un campione di origano (OR1), e di varie piante (1-12) ottenute con i primers ITS2 fusion.

Una volta ottenuti gli amplificati, sia di ITS2, sia del kit commerciale, i cui primers e quindi le regioni di DNA di interesse risultano coperte da brevetto (dati non mostrati), è stata eseguita la corsa NGS.

Prima di effettuare il sequenziamento, il chip deve essere caricato con le sequenze generate (libreria di DNA immobilizzata alle biglie). Si riportano, come esempio, le rappresentazioni grafiche dei controlli di qualità della corsa NGS, riportate dallo strumento una volta ultimata l'analisi (Figura 27).

Run Summary

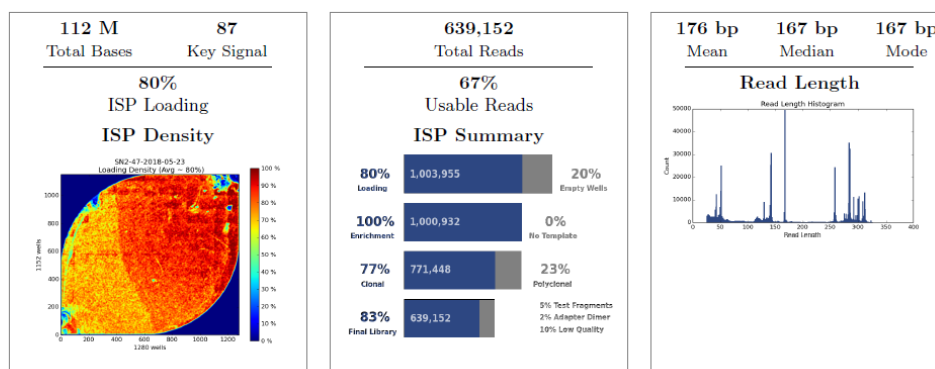


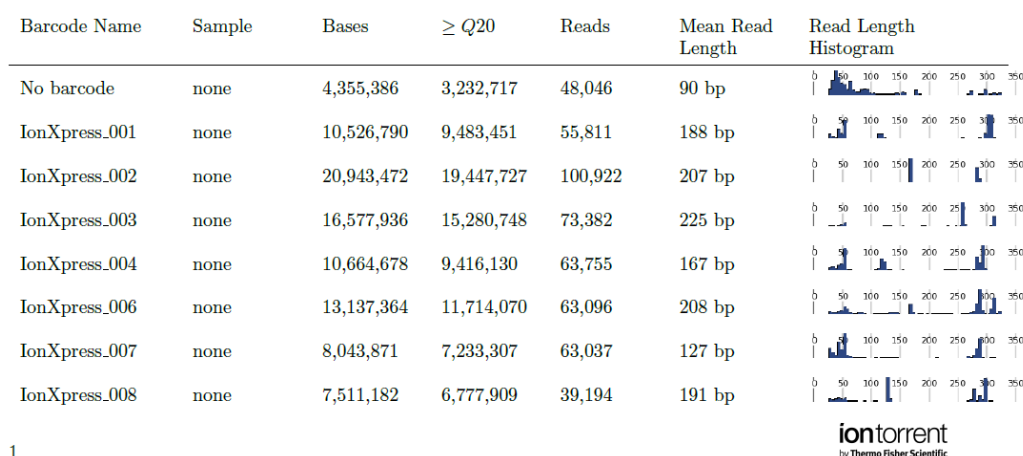
Figura 27: Run Report di esempio: a sinistra si evidenzia il caricamento del chip, nella figura al centro le percentuali delle varie tipologie di ISP e in quella di destra la dimensione dei frammenti ottenuti.

Nella prima immagine a sinistra viene descritto il caricamento del chip: un colore rosso identifica un buon caricamento (alta concentrazione all'interno del chip delle ISP, cioè delle singole biglie associate ai frammenti amplificati), fino a scendere a tonalità più fredde verso il blu, che indicano un basso caricamento delle microsferi (di lato è riportata la scala cromatica). Nel caso riportato, si registra una percentuale di caricamento dell'80 %.

Nell'immagine centrale vengono date delle informazioni sulle reads totali e sulla percentuale di ISP policlonali, cioè la quantità di biglie legate a due frammenti amplificati di campioni differenti (ogni microsfere dovrebbe legare, invece, solo un frammento). Il caso preso come esempio mostra un 67 % di reads consone per dare un risultato significativo e un 23 % di biglie policlonali. La presenza di ISP policlonali viene considerata dallo strumento come inutile poiché non può produrre un risultato univoco nel sequenziamento.

L'ultima immagine a destra, invece, mostra i dati statistici relativi alle dimensioni delle reads ottenute: nel caso specifico i frammenti hanno una dimensione media di 176 bp.

La Figura 28, sempre contenuta nel report di qualità, restituisce delle informazioni riguardo le sequenze barcode dei vari campioni, come ad esempio: il nome; il numero di basi sequenziate (bases); il punteggio di qualità della chiamata delle basi ($\geq Q20$), il cui valore massimo è 20; il numero di reads (reads); la dimensione del frammento ottenuto (mean read length) con anche una sua rappresentazione grafica (read length histogram).



1

Figura 28: Informazioni riguardanti i vari barcode e campioni: il nome, il numero di basi della sequenza (bases), il punteggio di qualità della chiamata delle basi ($\geq Q20$), il numero di reads (reads), la dimensione del frammento ottenuto (mean read length) con una rappresentazione grafica.

Per tutte le analisi sono stati, quindi, generati i file Fastq contenenti la totalità delle sequenze ottenute (reads). I file sono stati analizzati sia con il software bioinformatico della SGS Molecular (software A), sia con il Plug-In appositamente creato (software B, Life Technologies).

Il Plug-In richiede alcune informazioni input quali: la percentuale di omologia (%) da utilizzare per eseguire il BLAST e la lunghezza in nucleotidi (bp) dei frammenti da ottenere.

L'output del Plug-In, restituisce un file Excel con le sequenze allineate utilizzando il database Gene Bank. Il suddetto file Excel è caratterizzato da diverse indicazioni come:

- i codici tassonomici delle specie ottenute
- il numero di reads identificate per ogni specie
- il nome completo di ciascuna specie

Di seguito si riportano i risultati ottenuti dalle varie corse riassunte come mostrato nelle tabelle seguenti:

Tabella 26: riassunto dei risultati ottenuti, tramite NGS, dalle varie corse dei campioni di zafferano analizzati

ID	Tipologia	Kit ID Plant		ITS2 fusion			
		SGS (software A)	PLUG IN 100% (software B)	SGS (softwareA)	PLUG IN 100% (software B)		
Z01	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z04	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
		Sinapis alba	Vicia monantha				
		Triticum aestivum					
Z05	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z08	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
			Capsicum chinense x Capsicum frutescens				
Z10	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
		Sinapis alba	Capsicum chinense x Capsicum frutescens				
		Triticum aestivum					
Z12	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
		Triticum aestivum	Capsicum chinense x Capsicum frutescens				
Z14	polvere					Crocus sativus	Crocus spp.
Z16	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
			Carthamus tinctorius				
Z21	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z22	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z23	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z24	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z25	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z27	polvere	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z28	Pistilli	Crocus sativus	Crocus spp.				
		Foeniculum vulgare	Foeniculum vulgare				
		Anethum graveolens					
		Sinapis alba					
		Allium sativum					
Z29	Pistilli	Crocus sativus	Crocus spp.				
Z30	Pistilli	Crocus sativus	Crocus spp.				
		Sinapis alba					
		Triticum aestivum					
Z31	Pistilli	Crocus sativus	Crocus spp.	Crocus sativus	Crocus spp.		
		Triticum aestivum					
Z32	Pistilli	Crocus sativus	Crocus spp.				
		Triticum aestivum	Sisyrinchium spp.				
		Origanum sp					
Z33	Pistilli	Crocus sativus	Crocus spp.				
		Origanum sp					

Gli stessi dati generati dal kit ID Plant e analizzati con entrambi i software mostrano risultati diversi. Nel caso del software A si ottiene l'identificazione di "*Crocus sativus*" e nel caso del software B, invece, solo l'identificazione del genere "*Crocus*". Vengono, infatti, identificate tre specie di "*Crocus*" con la stessa percentuale di omologia. Quindi, in apparenza, il software A da una risposta più precisa. Però ci sono dei punti da considerare:

- Software A:
 - Il database di riferimento per l'analisi BLAST è un database chiuso, con un numero limitato di specie;
 - Identifica solo la percentuale di omologia ottenibile più alta (gli altri dati non sono visibili)
- Software B:
 - Il database di riferimento per l'analisi BLAST è GeneBank (sistema aperto con un numero elevato di specie)
 - La percentuale di omologia rilevata è variabile (dato visibile e modificabile)

Quindi, il software A restituisce “*Crocus sativus*” perché non contiene le altre specie di “*Crocus*” nel suo database. Il fatto che il software B ritrovi tre specie con la stessa percentuale di omologia (cioè 100 %), indica che i geni utilizzati dal kit commerciale non sono in grado di distinguere queste particolari specie. Questo problema viene evidenziato anche dai campioni che sembrano mostrare più specie presenti ma discrepanti tra i due software. Vengono, infatti, indicati ma probabilmente hanno percentuali di omologia minori di 100 %.

Anche i risultati relativi al gene ITS2 sono stati analizzati con entrambi i software (Tabella 26, colonne a destra). Come si può vedere, viene riproposto un risultato simile al precedente. Quindi, sembrerebbe che la regione ITS2 analizzata in NGS, non permetta di arrivare a definire la specie, almeno nel caso dello zafferano. Questo probabilmente indica un punto di potenziale miglioramento del software, non una limite della regione ITS2 ad essere utilizzata come gene barcoding; infatti, se si analizzano i risultati dell'analisi BLAST della sequenza ITS2 ottenuta con il metodo Sanger (Figura 29) si nota come le prime specie identificate di “*Crocus*”, tra cui anche il “*C. sativus*”, presentino la stessa omologia ma una diversa percentuale di *coverage*, cioè di allineamento fra la sequenza incognita e quella contenuta nel database, che permette di identificare il “*C. sativus*”. Il software B non tiene conto del parametro di *coverage*.

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Query cover	E value	Ident
Crocus sativus voucher 20130328082 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	2e-166	99%
Crocus sativus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA, partial and complete sequence	100%	2e-166	99%
Crocus sativus 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	1e-164	99%
Crocus sativus isolate SD-02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	99%	5e-163	99%
Crocus cartwrightianus genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher B:s/n, isolate DB4304	97%	2e-162	99%
Crocus oreoreticus genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher MAIC:3674	97%	2e-162	99%

Figura 29: risultato BLAST mediante metodo Sanger per un campione di zafferano nella regione di DNA ITS2

Per confrontare ulteriormente i due software, un'analisi simile è stata condotta anche in campioni di origano. I risultati sono riportati in Tabella 27.

Tabella 27: riassunto dei risultati ottenuti, tramite NGS, dalle varie corse nei campioni di origano analizzati

ID	Kit ID Plant		ITS2 fusion	
	SGS (A)	PLUG IN 100% (B)	SGS (A)	PLUG IN 100% (B)
Origano 4	<i>Origanum sp</i> <i>Thymus vulgaris</i>	<i>Origanum onites</i> <i>Origanum vulgare</i> <i>Thymus vulgaris</i>	<i>Origanum sp</i> <i>Thymus vulgaris</i>	<i>Origanum onites</i> <i>Thymus vulgaris</i>
Origano 5	<i>Origanum sp</i>	<i>Origanum onites</i>	<i>Origanum sp</i>	<i>Origanum onites</i>
Origano 2	<i>Origanum sp</i>	<i>Origanum vulgare</i> <i>Origanum majorana</i>		

Possiamo notare come il discorso precedente sulla differenza dei software sia applicabile anche in questo caso: il software A non contiene tutte le specie di origano nel database. La regione ITS2, invece, in questo caso specifico è in grado di identificare la specie. Allineando le sequenze corrispondenti a ITS2 delle due specie principali di origano, "*O. onites*" e "*O. vulgare*", la percentuale di identità risulta del 98 % (Figura 30). Se si allineano, poi, entrambe le specie con la sequenza ITS2 di "*O. majorana*" si

ottiene una percentuale di omologia del 96 % (dati non mostrati). La possibilità di distinguere queste specie dalle altre è importante nell'ottica dell'identificazione di eventuale adulterazioni, in quanto nell'origano commerciale la specie "*O. majorana*" non deve essere presente.

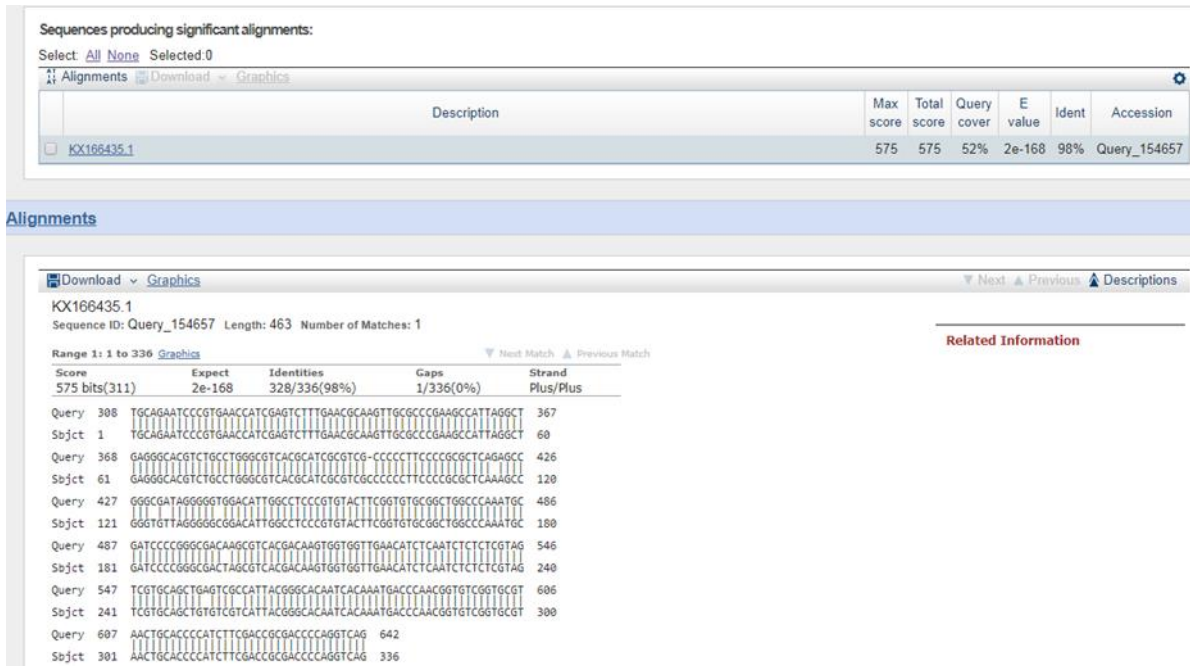


Figura 30: risultati dell'allineamento e della percentuale di omologia fra la specie "*O. onites*" e "*O. vulgaris*"

Infine, nella Tabella 28, sono riportati i risultati dell'analisi di due campioni morfologicamente identificati (mirto e calendula) e di un prodotto commerciale (hamburger di soia). Nei primi due casi si riconferma il problema del database chiuso e limitato del software A. I risultati concordanti ottenuti con un campione commerciale complesso come l'hamburger di soia, invece, indicano come il software A abbia la stessa efficienza di elaborazione del software B, quando le specie contenute nel campione risultano presenti in entrambi i software (campione aggiunto alla trattazione a questo scopo).

Tabella 28: riassunto dei risultati ottenuti, tramite NGS, per i campioni di mirto, calendula e per un campione commerciale di hamburger di soia

ID	Kit ID Plant	
	SGS (A)	PLUG-IN 100% (B)
mirto	<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Myrtus communis</i>
calendula	<i>Artemisia dracunculus</i> <i>Helianthus annuus</i>	<i>Calendula officinalis</i>
hamburger soia	<i>Allium cepa</i> <i>Glycine max</i> <i>Petroselinum crispum</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Coriandrum sativum</i> <i>Cuminum cyminum</i>	<i>Allium cepa</i> <i>Glycine max</i> <i>Petroselinum crispum</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Coriandrum sativum</i> <i>Cuminum cyminum</i>

Analisi di fingerprinting

Per quanto riguarda l'analisi di fingerprinting dei composti mediamente volatili e volatili, il lavoro è stato svolto in modo sinergico con il laboratorio di chimica presente anch'esso nella sede Coop Italia dove è stato eseguito questo lavoro di tesi.

In questo elaborato viene descritta solamente una parte dei risultati ottenuti. In particolare, l'attenzione è focalizzata sui dati conseguiti mediante analisi gas-cromatografica (Heracles II) e HPLC, e sulla loro analisi chemiometrica al fine di ottenere, in futuro, un modello chemiometrico valido per l'identificazione di possibili adulterazioni dello zafferano.

Nella Tabella 29 vengono riportate le tipologie di zafferano analizzate in questo studio e il numero di campioni appartenenti ad ogni gruppo. In totale sono stati considerati 126 campioni.

Tabella 29: tipologie di campioni di zafferano trattati con Heracles II

Zafferano	Codice	Campioni	Campioni Totali*
Zafferano in polvere	ZP	23	90
Zafferano in polvere italiano	ZI	1	4
Zafferano in polvere biologico	BI	1	4
Zafferano prima categoria ISO	ZS	2	8
Zafferano in pistilli	ZT	5	20

Per ogni campione analizzato in Heracles II sono state effettuate in genere 4 ripetizioni, secondo il protocollo descritto nei Materiali e Metodi. Terminata l'analisi strumentale, le aree dei picchi ottenuti dai vari cromatogrammi sono state esportate in un foglio Excel, creando una matrice (*dataset*). Nelle righe vengono riportati i campioni analizzati (oggetti) con tutte le 4 ripetizioni di analisi, mentre nelle colonne sono riportate le aree dei picchi cromatografici, che rappresentano le variabili originali.

Viene poi eseguita, mediante il programma The Unscramble[®], l'analisi delle componenti principali (PCA – Principal Component Analysis) sull'intero set di dati. Il metodo PCA esegue la trasformazione delle variabili originali in componenti principali (PC) con l'obiettivo di eliminare informazioni inutili (ad esempio uguali per tutti i campioni), ridurre la dimensionalità dei dati ed individuare eventuali outliers⁹. Si ottengono così due grafici significativi, tipici di ogni analisi PCA, per la visualizzazione dei dati:

⁹ Termine utilizzato in [statistica](#) per definire, in un insieme di osservazioni, un valore anomalo; un valore quindi chiaramente distante dalle altre osservazioni disponibili.

- 1) *Scores plot*: in questo grafico vengono riportati gli scores, ovvero le nuove coordinate dei campioni o oggetti, nello spazio delle componenti principali, PC1 e PC2 in questo caso. Importante osservare l'ellissi di Hotelling¹⁰ la quale va a discriminare i campioni da eventuali outliers con un livello di significatività del 5 %;
- 2) *Correlation Loading plot*: questo grafico permette di analizzare la correlazione esistente tra le variabili e l'importanza di ciascuna variabile nelle diverse componenti principali. Per valutare la correlazione tra le variabili si analizza la matrice di correlazione, dove variabili caratterizzate da coefficienti di correlazione in valore assoluto maggiore di 0.7 risultano tra loro altamente correlate (variabili presenti tra le due elissi nel grafico in Figura 32).

Nelle Figure 31 e 32 si riportano i grafici che compongono la PCA ottenuta dai dati totali dei campioni di zafferano analizzati (in polvere o come pistilli).

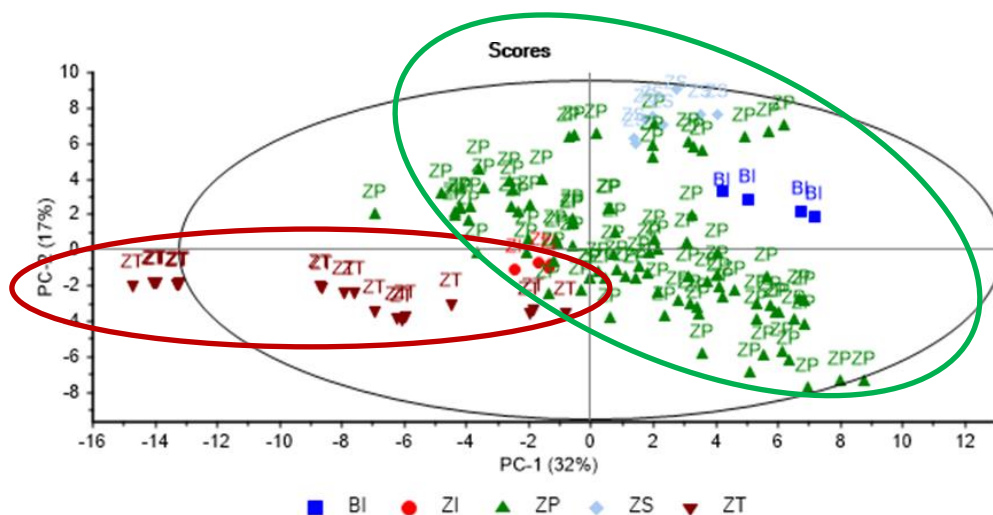


Figura 31: Scores plot dei campioni di zafferano in polvere (cerchiati in verde) e in pistilli (cerchiati in rosso).

Dal grafico dello Scores plot si evidenzia come i campioni di zafferano in polvere, cerchiati in verde, risultino ben discriminati dai campioni di zafferano in pistilli, cerchiati in rosso. Si può ipotizzare che tale discriminazione sia dovuta al differente metodo di preparazione.

¹⁰ Rappresenta la distanza pesata di ciascun set di misure dalla media attesa per quel set. All'interno del modello PCA è una misura della variabilità

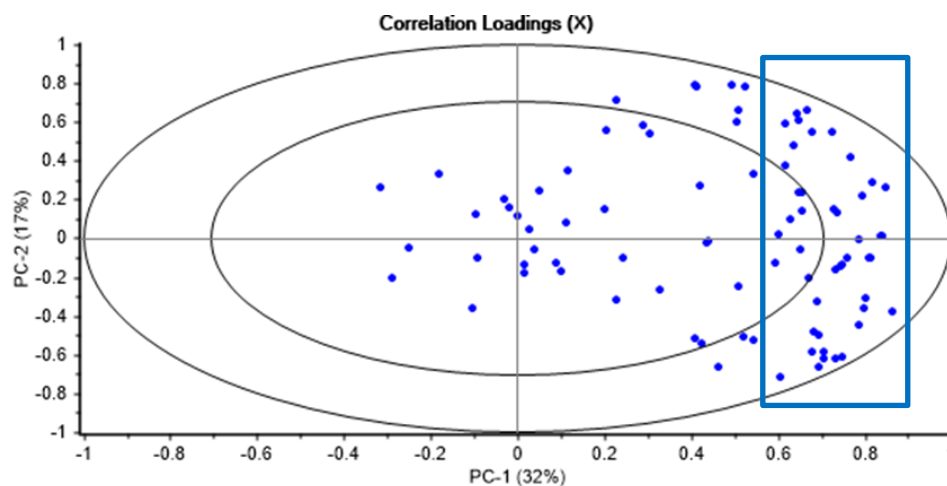


Figura 32: Correlation Loading plot dei campioni di zafferano in polvere e in pistilli

I puntini, che si trovano nella regione di spazio fra le due ellissi, riquadrate in blu, identificano le variabili significative, le quali hanno un coefficiente di correlazione superiore allo 0.7 in valore assoluto (Figura 32). Questo permette di eliminare quelle variabili che non concorrono alla discriminazione dei gruppi.

Dopo questa prima analisi, lo studio si è focalizzato solamente sui campioni di zafferano in polvere per vedere se fra loro si poteva attuare una suddivisione in classi (cluster), che potesse essere supportata da un'analisi PCA e confermata poi dall'analisi discriminante lineare LDA (Linear Discriminant Analysis).

Il metodo LDA è un metodo di classificazione non parametrico, la cui ipotesi di partenza risulta essere quella di considerare le variabili come distribuite normalmente. Questo metodo va a confrontare la probabilità di appartenenza a priori e a posteriori degli oggetti alle classi di appartenenza assegnate. Perciò, a partire dalla matrice di dati, viene stimata a priori la probabilità di appartenenza alle varie classi. Il metodo LDA, assegna poi gli oggetti alle classi con la più alta probabilità di appartenenza calcolata a posteriori.

Prima dell'elaborazione PCA è stata eseguita una Cluster Analysis, o analisi dei gruppi, mediante il software JMP. La Cluster Analysis, o clustering, ha il compito di raggruppare un insieme di oggetti in modo tale che gli elementi appartenenti allo stesso cluster siano più simili l'uno all'altro rispetto a quelli di altri cluster. L'algoritmo utilizzato per il clustering, nel nostro caso, è l'algoritmo K-means. L'obiettivo dell'algoritmo è quello di minimizzare la varianza totale intra-cluster. Ogni cluster viene identificato mediante un centroide o punto medio. Elaborando solamente i dati dei campioni di zafferano in polvere che la PCA precedente aveva unito in un unico gruppo, è stato possibile ottenere tre cluster ben distinti tra di loro (Figura 33) i quali contengono a loro volta:

- 1) Cluster A: 21 elementi
- 2) Cluster B: 41 elementi
- 3) Cluster C: 40 elementi

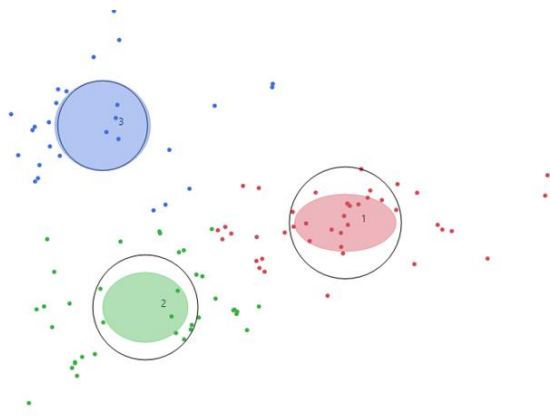


Figura 33: rappresentazione dei 3 cluster mediante software JMP: cluster A (elementi blu), cluster B (elementi rossi), cluster C (elementi verdi).

Si è passati, infine, all'elaborazione dei dati mediante PCA. In particolare, per ogni cluster trovato grazie alla Cluster Analysis, sono stati estrapolati i loadings principali con i quali è possibile costruire il dataset della PCA.

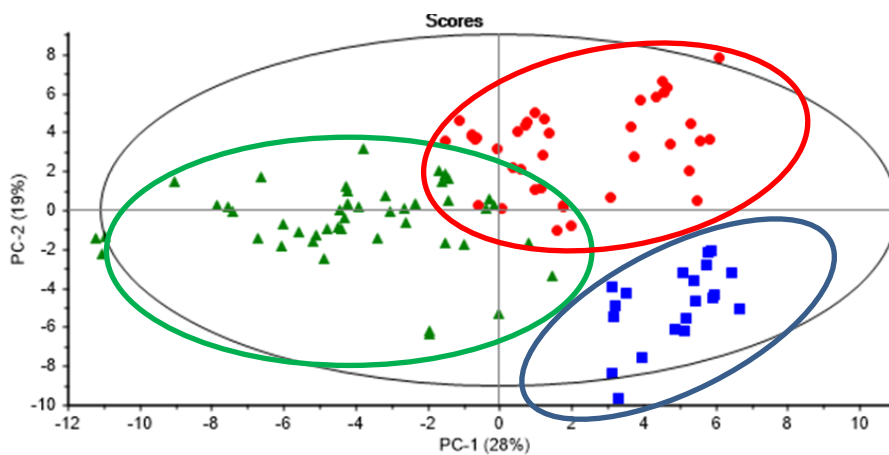


Figura 34: Scores plot dei campioni di zafferano in polvere. Si evidenziano i tre cluster ben separati: cluster A (elementi blu), cluster B (elementi rossi), cluster C (elementi verdi).

Lo Scores plot generato dall'analisi PCA (Figura 34) conferma la divisione in tre cluster ottenuto con la precedente Cluster Analysis.

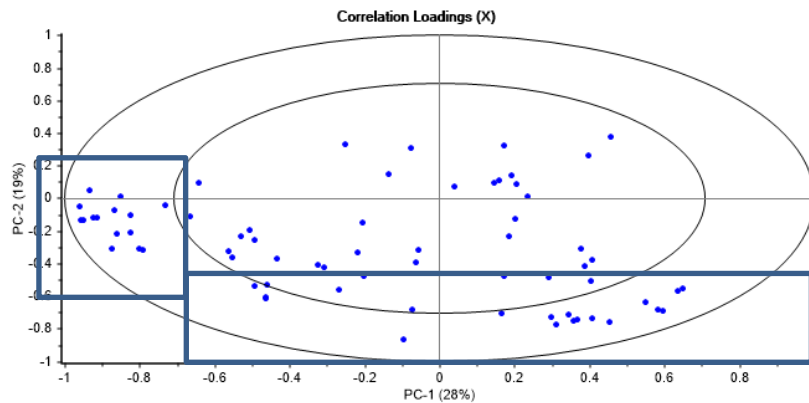


Figura 35: Correlation loading plot dei campioni di zafferano in polvere

Come visibile in Figura 35, nel Correlation Loading plot dei campioni di zafferano in polvere, sono state riquadrate in blu le variabili che risultano essere più significative. Tali variabili sono state utilizzate per l'analisi LDA usando il software libero R. Il grafico risultante viene mostrato in Figura 36.

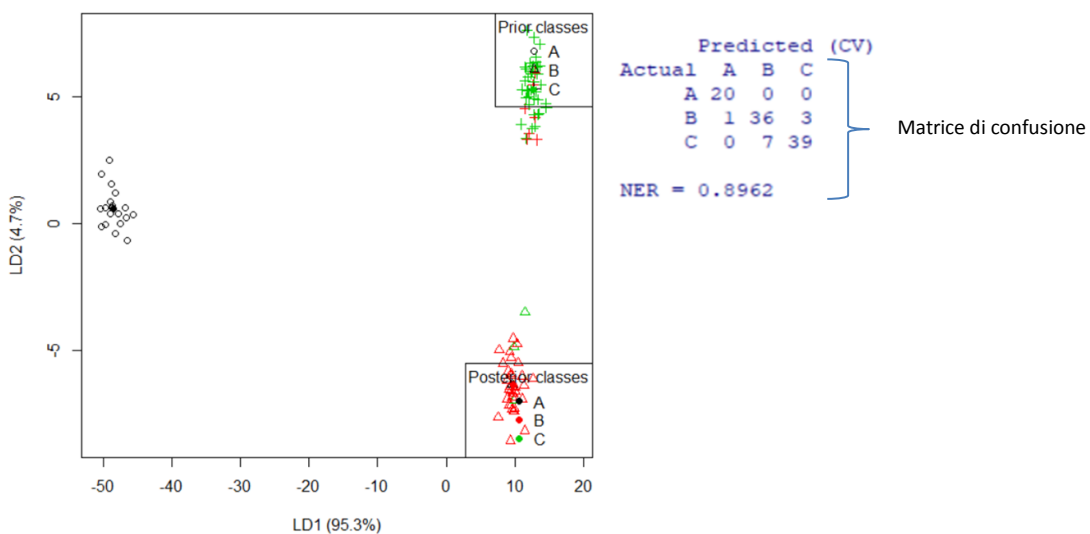


Figura 36: LDA sui tre cluster di zafferano in polvere con matrice di confusione e valori di sensibilità e specificità

In output il software restituisce la matrice di confusione e il valore del non-error rate¹¹, detto NER. Analizzando la matrice di confusione, si nota come alcuni campioni appartenenti ad una classe a priori vengono ricollocati in una altra classe dopo l'elaborazione.

Se consideriamo i campioni del cluster B, ad esempio, dopo l'analisi 1 campione viene ricollocato nel cluster A, mentre 3 campioni sono collocati nel cluster C. In maniera analoga, 7 campioni del cluster C sono classificati nel cluster B mentre, per il cluster A, tutti i

¹¹ Il NER è un valore di classificazione corretta espressa in percentuale

campioni sono stati riconfermati come appartenenti al cluster stesso. Il grafico ottenuto mediante LDA (discriminant plot) mostra, quindi, come il modello sia in grado di discriminare le classi con una percentuale di classificazione corretta (NER) dell'89.62 %, valore più che accettabile.

In conclusione, l'analisi statistica PCA sembra confermare la presenza di diversità nella matrice volatile dei campioni di zafferano analizzati, dato che i campioni sono risultati suddivisibili a posteriori in 3 cluster ben distinti. Al momento si possono solamente avanzare delle ipotesi sui motivi che portano a questa divisione in cluster, per esempio si potrebbe pensare ad una diversa origine, ad una tecnica di lavorazione diversa o ad una probabile adulterazione di alcuni campioni.

Di seguito viene riportato il grafico dello Scores plot ottenuto mediante analisi PCA relativo a tutti i campioni di zafferano in polvere analizzati e identificati con il loro ID (Figura 37). Scopo di questa visualizzazione è trovare una correlazione tra i risultati ottenuti mediante analisi NGS e la divisione in cluster che si ottiene utilizzando la PCA. Si può osservare come i campioni di zafferano (Z4, Z8, Z12, Z16), che dall'analisi NGS mostravano la presenza al loro interno di altri generi oltre al genere "*Crocus*", si trovino nel cluster A (eccetto il campione Z10). Questi elementi, per una visualizzazione più immediata sono stati cerchiati. Il motivo della collocazione di questi campioni nel cluster A non è determinabile con le analisi effettuate.

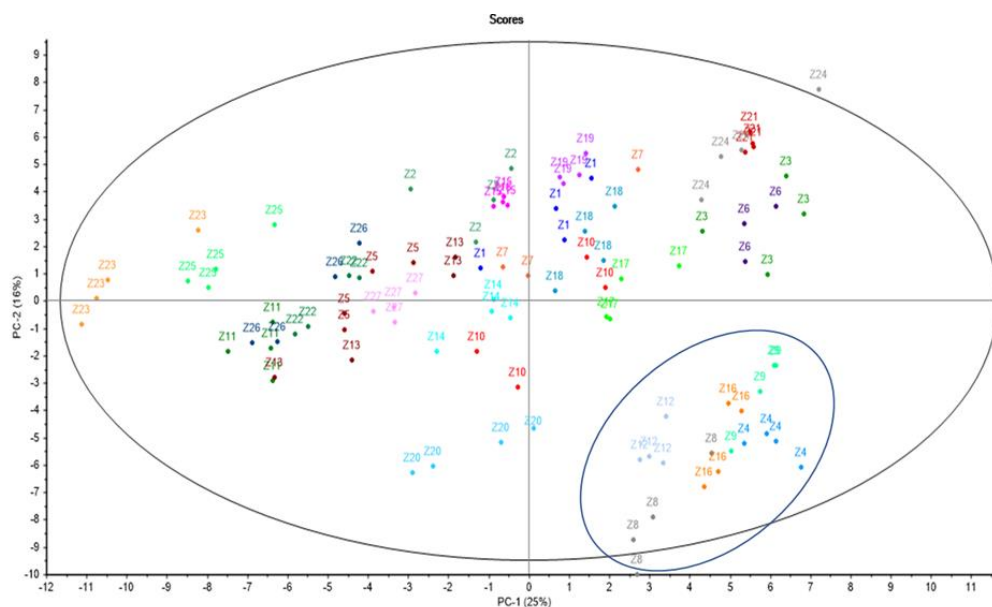


Figura 37: Scores plot dei campioni di zafferano in polvere identificati con il loro ID. Gli elementi cerchiati corrispondono ai campioni che dall'analisi NGS mostravano generi diversi oltre al genere "*Crocus*"

Correlation Loading plot (Figura 39), nel quale non è visibile un'identificazione delle variabili rilevanti, ma tutte ricadono all'interno della prima ellisse.

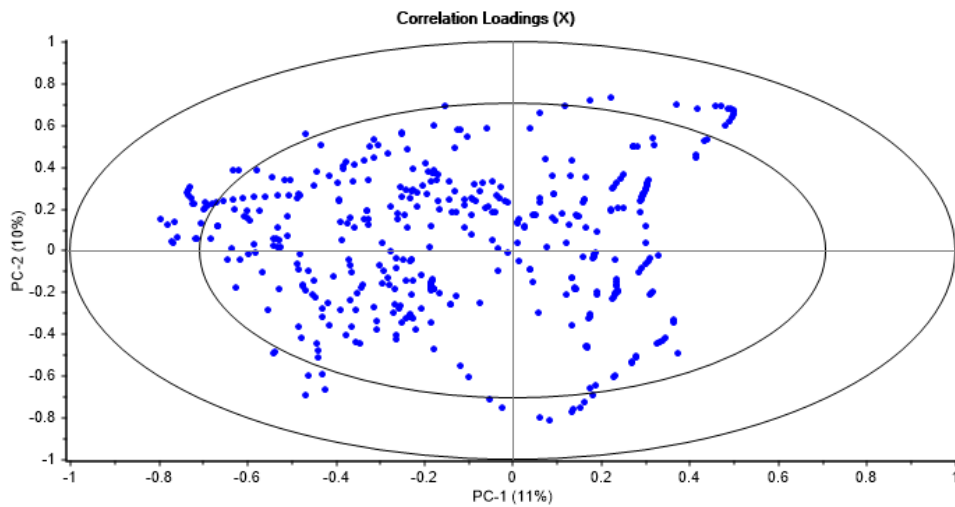


Figura 39: Correlation loading plot dei campioni di zafferano analizzati in HPLC

Da tali risultati, si può concludere che la divisione in cluster dei campioni di zafferano in polvere ottenuta dopo analisi della componente volatile in gas cromatografia, non è confermata se gli stessi campioni vengono analizzati mediante HPLC.

CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di applicare e ottimizzare alcune tecniche basate sul DNA e sull'analisi fingerprinting dei composti volatili per valutare l'autenticità di alcuni prodotti alimentari, in particolare lo zafferano.

Dai risultati ottenuti si può concludere che:

- L'approccio del DNA barcoding mostra buone potenzialità come tecnica di analisi per l'identificazione di frodi alimentari quali la sostituzione o l'aggiunta di specie non dichiarate anche nell'ambito vegetale. In questo stadio dell'attività ci sono comunque alcuni punti che devono essere ulteriormente sviluppati:
 - identificare dei geni *barcode* più informativi per diverse famiglie vegetali di interesse, con l'obiettivo di renderli tecnicamente utilizzabili nella piattaforma Ion Torrent™;
 - migliorare il software sviluppato per l'elaborazione dei dati ottenuti dal sequenziamento NGS introducendo la possibilità di variare e controllare alcuni parametri (come il “*query cover*”)
- l'approccio del fingerprinting dei composti volatili ha mostrato un'interessante capacità di discriminazione dei diversi campioni di spezie ed erbe aromatiche, come visto in precedenza con altre matrici alimentari, proponendosi come una possibile metodica di screening; in questo caso i punti di miglioramento potrebbero essere:
 - acquisire più campioni certi, da usare come standard, per la creazione di modelli specifici per ogni matrice alimentare;
 - sviluppare un'analisi target mirata ad identificare composti specifici che funzionino come discriminanti

In conclusione, si può affermare che entrambi gli approcci sperimentati sono importanti per affrontare la problematica delle frodi nelle spezie ed erbe aromatiche che sono, storicamente, tra gli alimenti più colpiti da questo fenomeno. In particolare, si può sottolineare che la loro efficacia sia maggiore quando queste, ed altre metodiche, lavorano in sinergia per rispondere alle diverse domande e sfide che riguardano il complesso problema dell'autenticità alimentare.

BIBLIOGRAFIA

- 178/2002, Regolamento del 28 Gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo. Parlamento Europeo e del Consiglio .
- Alonso, G. L., Carmona, M., Zalacaina, G. L., & Sarasa Del Gado, F. (1999). Study of saffron adulteration by increasing its colouring strength. In *Pigments in Food Technology*, 341-346, Sevilla.
- Alonso, G. L., Salinas, M. R., & Garijo, J. (1998). Method to determine the authenticity of aroma of saffron (*Crocus sativus* L.). In *J Food Production* (61), 1525-1528.
- Alonso, G. L., Salinas, M. R., Esteban Infantes, F. J., & Sanchez Fernandez, M. (1996). Determination of safranal from saffron (*Crocus sativus* L.) by thermal desorption gas chromatography. In *J Agric Food Chem* (44), 185–188.).
- Bellagamba, F., & al., e. (2001). Identification of species in animal feedstuffs by polimerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorfism analysis of mitochondrial DNA. *Journal of agricultural and food chemistry*(49.8), 3775-3781.
- Bokulich, Nicholas, A., & al., e. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*(10.1), 57-59.
- Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R., & al., e. (2007). HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Chem.*(100), 1126-1131.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M., & Alonso, G. (2007). A new approach to saffron aroma. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2(47), 145-159.
- Chinwalla, Asif, T., & al., e. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 520-562.
- Galvin-King, P., Simon, A., & al., e. (2018). Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. *Food Control*(88), 85-97.
- Group, & al., e. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Accademy of Sciences*, 12794-12797.

- Hebert, P. D., Sujeevan, R., & al., e. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the royal society of London B: Biological Sciences* , S96-S99.
- Holst-Jensen, A., Ronning, S., Lovseth, A., & Berdal, K. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.*
- ISO3632-1. (1993). Saffron (*Crocus sativus* L.). In *ISO 3632-1 and 3632-2*. Ginevra.
- Jefferson, T., Cerbo, M., & al. (2017). *HTA Report - "Next Generation Sequencing (NGS)"* . Roma: Agenas.
- John Kress, W., & Erickson, D. (2012). *DNA Barcodes, Methods and Protocols*. Humana Press.
- Johnson, R. (2014). *Food fraud and economically motivated adulteration of food and food ingredients*.
- Lablogatory, a blog for medical Laboratory professionals*. (s.d.). Tratto da <http://www.labmedicineblog.com>
- Maggi, L., Carmona, M., Sánchez, A., & Alonso, G. (2010). saffron flavor: compounds involved, biogenesis end human perception. *Functional plant science and technology*(4), 45-55.
- Masi, E., Taiti, C., Heimler, D., & al., e. (2016). PTR-TOF-MS and HPLC analysis in the characterization of saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry*(192), 75-81.
- Ministero della Salute, Comando dei Carabinieri*. (s.d.). Tratto da Ministero della Salute, Comando dei Carabinieri: <http://www.salute.gov.it>
- Ministero delle politiche agricole, a. e. (2015). 13° rapporto monitoraggio etichettatura facoltativa carni bovine.
- Moretti, V. M. (2003). "Traceability issues in fishery and aquaculture products.". *Veterinary research communications*, (27), 497-505.
- Nebbia, G. (1962). Aspetti storici del problema del controllo della qualita delle merci nel mondo antico e nel Medioevo. In *Quaderni di merceologia*, 327-380.

- Parthasarathy, V., Chempakam, B., & Zachariah, T. (2008). *Chemistry of spices*. Cabi.
- Peter, K. (2001). Introduction. In K. Peter, *Handbook of herbs and spices*, 1-5.
- Peter, K. (2001). Quality specifications for herbs and spices. In *Handbook of herbs and spices*, 13-16.
- Peter, K. (2001). Saffron. In *Handbook of herbs and spices*, 276-282.
- Petrakis, E., & Polissiou, M. (2017). Assessing saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant-derived adulterants by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy coupled with chemometrics. *Talanta*(162), 558-566.
- Rossi, G. (2011). *Un secolo di vigilanza sugli alimenti. Dal vigile sanitario al tecnico della prevenzione*. Napoli.
- Sadava, D., Heller, C., Orians, G., Purves, W., & Hills, M. (2018). *Biologia.blu Plus*. Zanichelli.
- Senesi, E. (2010).
- Staats, M., Arulandhu, A. J., Gravendeel, B., & al. (2016). Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Anal. Bioanal. Chem.*(408), 4615-4630.
- Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (1997). Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus* L.). In *J Agric Food Chem* (45), 459–462.
- Thermo Fischer Scientific*. (s.d.). Tratto da Thermo Fischer Scientific: <http://www.thermofischer.com>
- Todeschini, R. (1998). *Introduzione alla chemiometria*. Napoli: EdiSES.
- Trygg, J., Holmes, E., & Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in metabonomics. *Journal of proteome research*, 2(6), 469-479.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. (1999). Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*.