

Caratterizzazione e utilizzazione delle risorse pastorali alpine e tracciabilità delle produzioni casearie derivate

Parte III° - Metaboliti volatili di natura terpenoidica

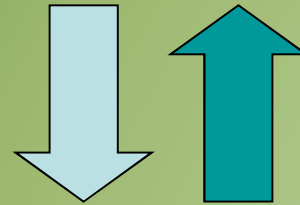
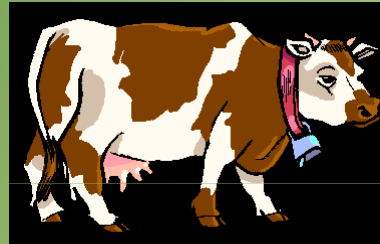
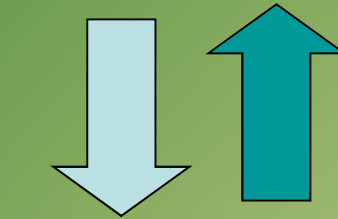
Zeppa G., Giordano M., Belviso S.

Acidi grassi

CLA

Composti volatili

Terpeni



Altri composti
(polifenoli, carotenoidi ... ?)

Isotopi



TERPENI → BIOMARKERS

della catena

Pianta → Animale → Latte → Formaggio

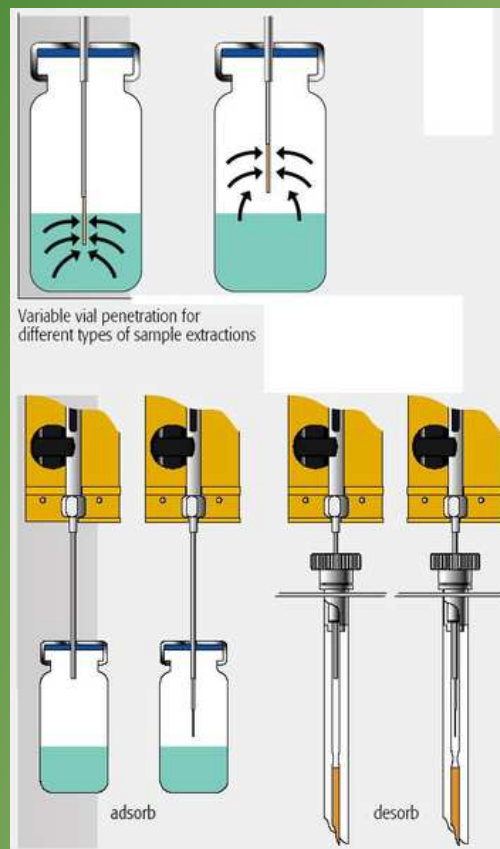
- ▶ **Metaboliti secondari** delle piante, noti per la loro attività biologica e come **composti aromatici chiave** di oli essenziali
- ▶ Rilevati in tracce in **latte** e **formaggio**
- ▶ Sono risultati in grado di differenziare i prodotti di **pianura** da quelli di **montagna** e quelli provenienti da **differenti aree pascolive**

Scopo del lavoro

Differenziare le formazioni in studio, i latti ed i formaggi derivati mediante il loro fingerprint terpenico



Fase 1 – La tecnica HS-SPME



Fase 2 – L'analisi delle formazioni

➤ **PREPARAZIONE CAMPIONE**

20 g di erba tagliata in pezzatura uniforme e inserita in un contenitore da 1 L

➤ **ESTRAZIONE HS-SPME**

1) 45' equilibrio/25' estrazione a 53°C in bagno d'acqua termostato

2) Fibra trifasica StableFlex 2 cm-50/30 μm (DVB/CAR/PDMS)

Fase 3 – L'analisi dei lattici e dei formaggi

➤ **PREPARAZIONE CAMPIONE**

1a) Latte → 50 mL + 1,3,5-triisopropilbenzene + HCl 6M fino a pH 4,6 → 12 g cagliata

1b) Formaggio → 15 g grattugiato + 1,3,5-triisopropilbenzene

2) Distillazione in alto vuoto e raccolta del distillato acquoso in azoto liquido

➤ **ESTRAZIONE HS-SPME**

1) 3 mL di distillato in un vial da 10 mL

2) 5' equilibrio/30' estrazione a 45°C

3) Fibra trifasica StableFlex 2 cm-50/30 μm (DVB/CAR/PDMS)



Fase 4 – L'analisi GC/MS

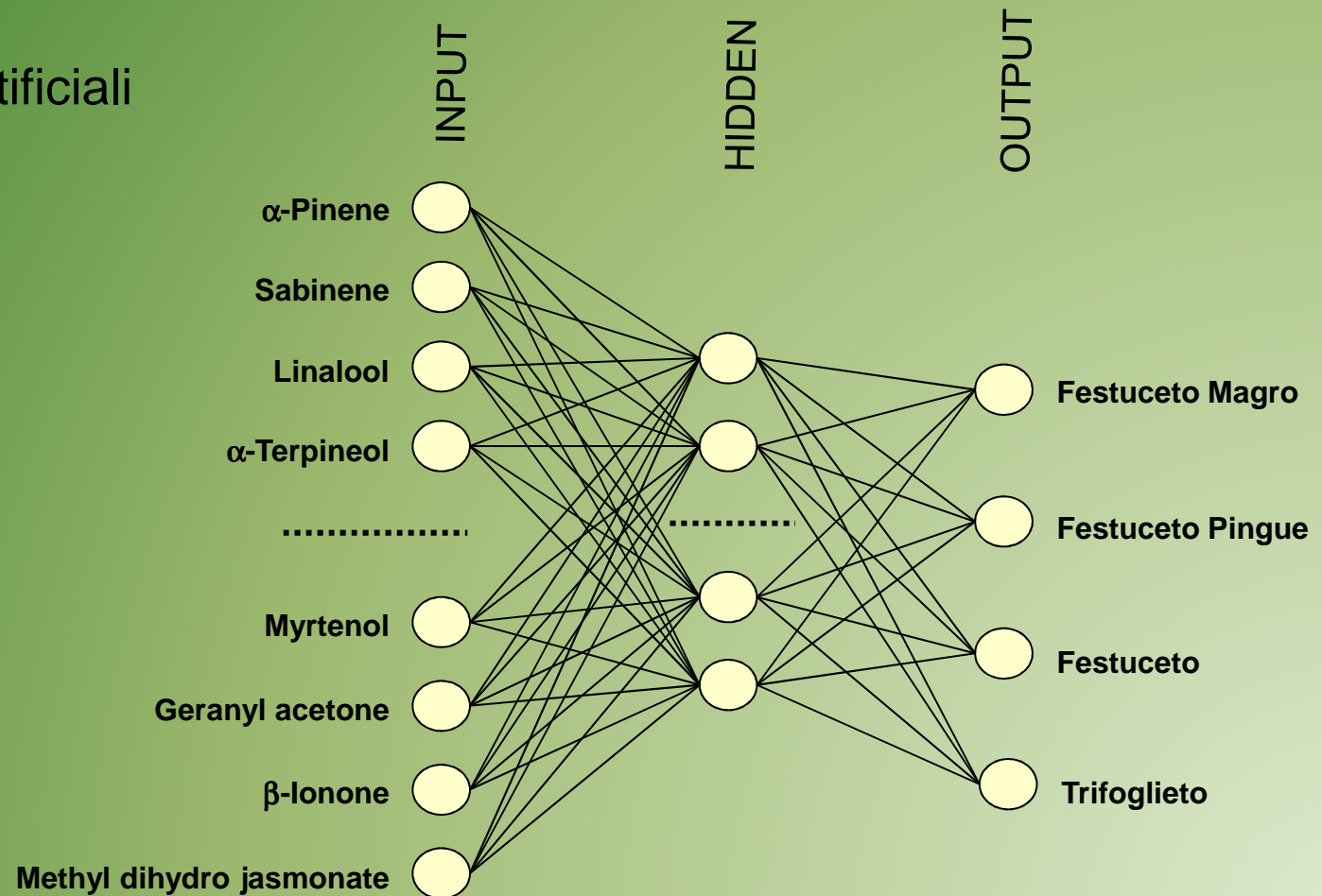
- Gas-cromatografo Shimadzu GC-17A accoppiato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo Shimadzu QP-5000
- Colonna capillare DB-WAX, 30m×0.25mm i.d., 0.25 mm film thickness
- Temperatura della colonna: 35°C per 5 min, aumento si no a 173°C a 2°C/min, sosta per 1 min quindi aumento a 210°C a 15°C/min e so sta per 5 min
- Iniettore Splitless: desorbimento 4' a 270°C
- Carrier gas: elio 1.0 ml/min
- Spettri di massa registrati a 70 eV nel range 33–300 amu
- Sorgente ionica ed interfaccia a 230°C
- Scan rate: 500 amu/s, start time 1.0 min.

Fase 5 – L'identificazione

- Identificazione: composti puri standard, banche dati NIST12, NIST62 ed Adams e LRI (C₅-C₂₅ n-alcani)
- Terpeni quantificati in SIM (m/z= **93**, 121, 136, **161**, 204 o altri ioni caratteristici)
- Normalizzazione del dato: integrazione dei picchi degli ioni caratteristici ed espressione dei risultati come aree normalizzate (unità arbitraria)

Fase 6 – L'analisi statistica

- Analisi della varianza semplice e fattoriale
- Analisi discriminante lineare
- Reti Neurali Artificiali

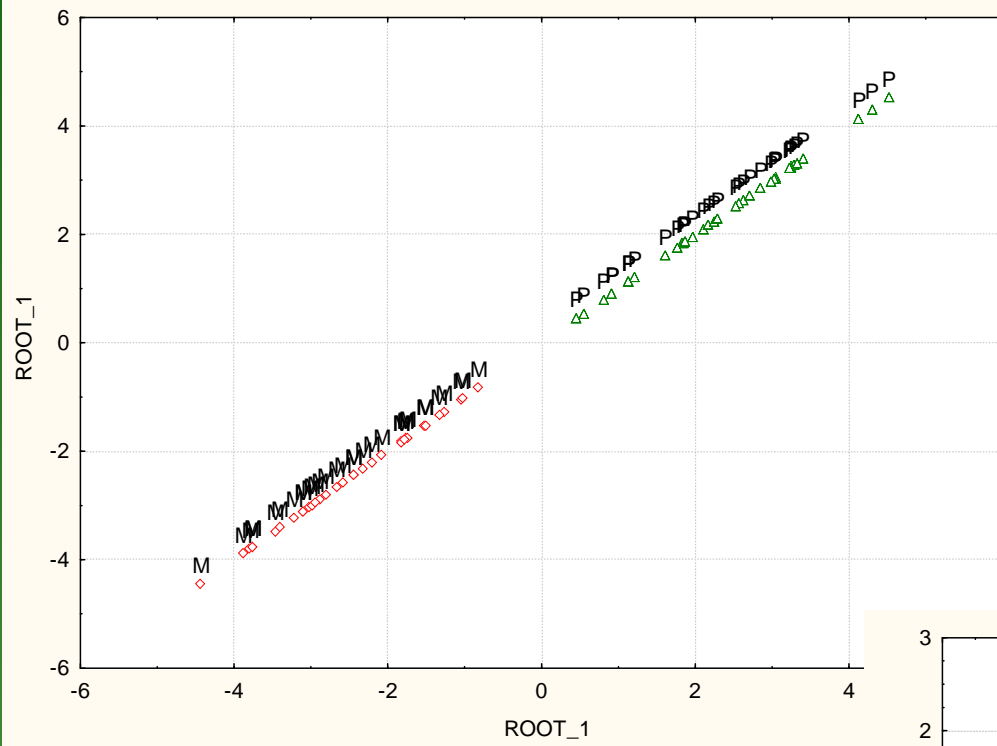


Risultati – Le formazioni

- A causa della elevata variabilità della matrice vegetazionale è necessario un elevato numero di campioni per rappresentare la formazione
- Identificati 50 monoterpeni, 30 sesquiterpeni, 9 composti “miscellanea”
- Le formazioni di Asiago risultano più ricche quali-quantitativamente di componenti terpenici di quelle provenienti da Valle Stura
- Molti dei composti che caratterizzano le formazioni non sono influenzati dalla annualità

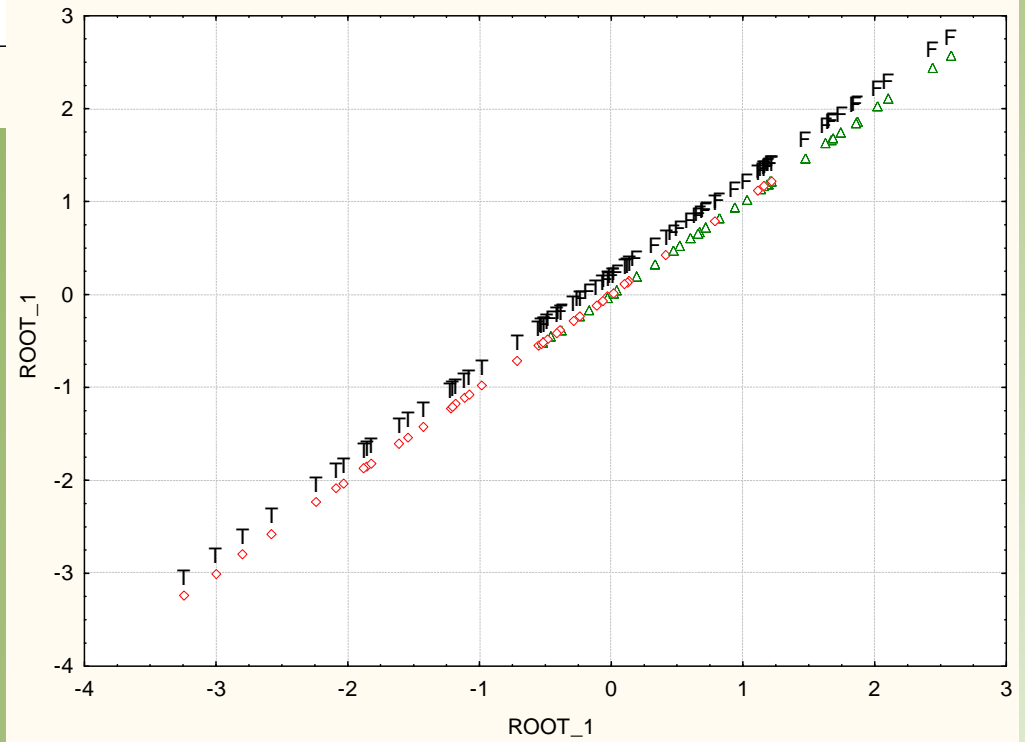
	Anno 2007		Anno 2008	
	Magro	Pingue	Magro	Pingue
α -Thujene	0.89	0.447	0.887	0.534
Sabinene	4.15	2.552	10.322	2.743
Monoterpene n.i. 1	0.063	0.041	0.035	0
Limonene	73.003	97.97	25.774	95.477
β -Phellandrene	1.63	0.762	1.918	0.525
γ -Terpinene	1.068	0.784	2.653	0.855
(E)- β -Ocimene	5.57	2.977	3.057	1.245
Carvone	22.416	43.858	2.422	43.088
Myrtenol	0.294	0.151	0.186	0.044
Methyl salicylate	0.686	0.373	0.283	0.171
Sesquiterpene n.i. 1	0.112	0.304	0.067	0.178
α -Copaene	0.578	2.329	0.485	1.238
Sesquiterpene n.i. 6	0.079	0.345	0.528	2.176
δ -Amorphene	1.569	3.858	2.236	5.629
Calamenene <i>cis</i>	0.371	0.485	0.143	0.45
Calamenene <i>trans</i>	0.313	0.428	0.097	0.4

	Anno 2007		Anno 2008	
	Trifoglieto	Festuceto	Trifoglieto	Festuceto
β -Pinene	0.314	0.869	0.297	0.554
Sabinene	0.359	6.319	0.271	0.536
β -Myrcene	2.799	0.184	1.141	0.093
Cineol	0.073	0.401	0.306	0.496
γ -Terpinene	16.915	1.183	6.948	0.509
(E)- β -Ocimene	29.999	0.314	7.288	0.161
<i>p</i> -Cymene	27.435	4.259	8.919	1.324
α -Terpineol	2.844	1.553	1.534	0.843
Geraniol	0.084	0.001	0.704	0.001
β -Caryophyllene	1.857	0.21	0.439	0.152
δ -Amorphene	0.193	0.624	0.239	0.511
β -Cyclocitral	0.222	0.199	0.365	0.26
5,6-Epoxy- β -ionone	0.116	0.08	0.06	0.023
Eugenol	0.124	0.058	0.059	0.035
Linalool oxide <i>cis</i>	0.356	0.189	0.044	0.023
Sesquiterpene n.i. 5	0	0.185	0.099	0.174
Somma Monoterpeni	112.221	20.303	36.248	11.494

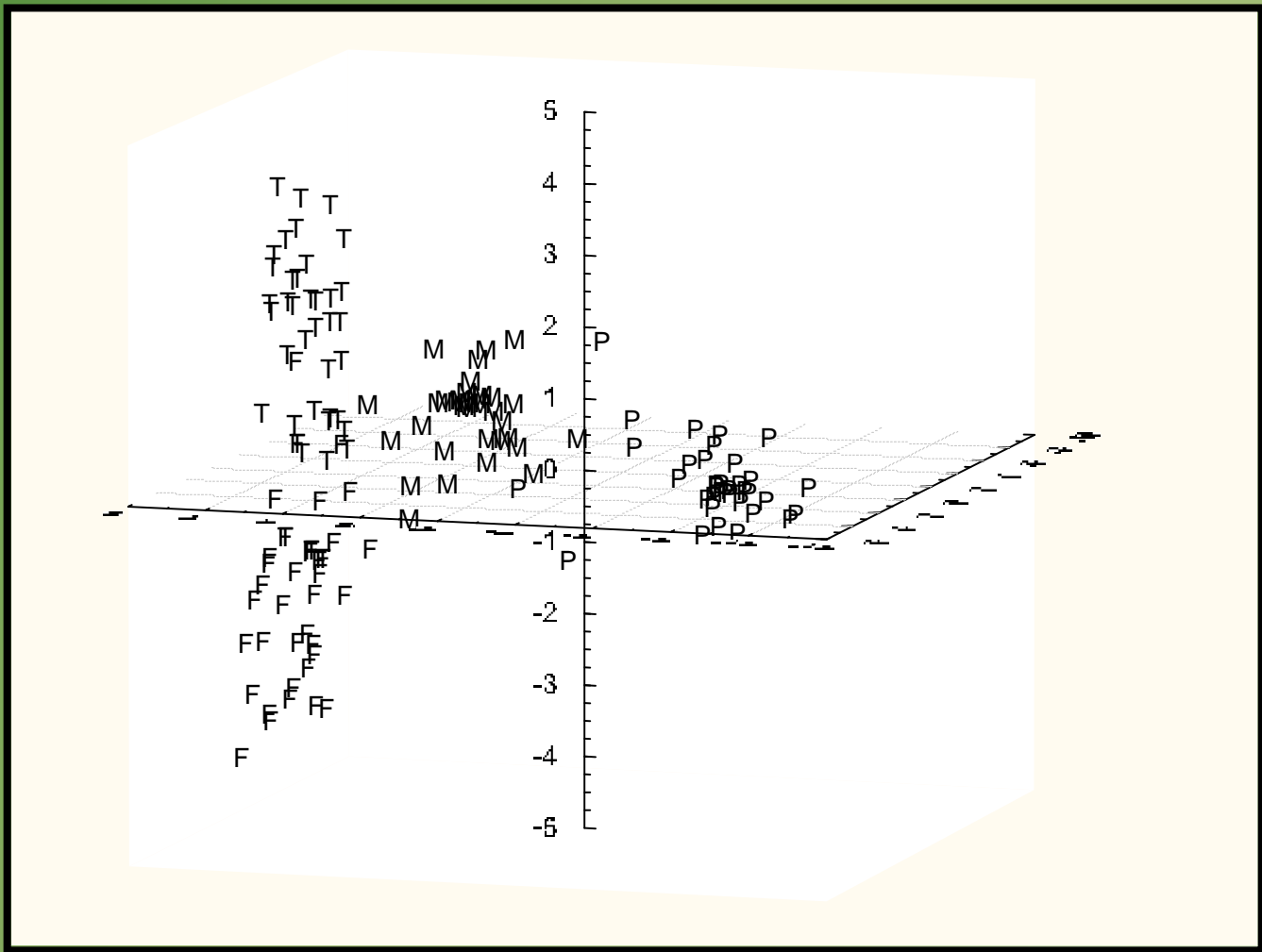


Asiago			
	%	M	P
M	100	34	0
P	100	0	36
Totale	100		

Valle Stura			
	%	T	F
T	80	32	8
F	78	8	29
Totale	79		

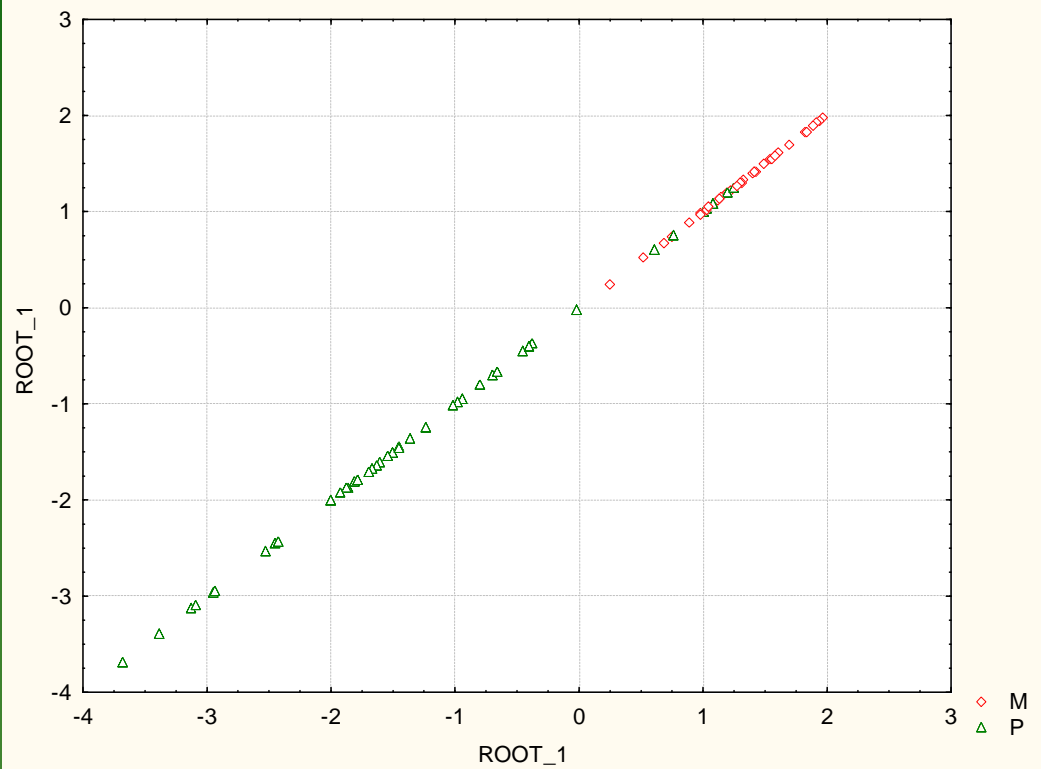


	%	T	F	M	P
T	92	37	3	0	0
F	92	3	34	0	0
M	100	0	0	34	0
P	100	0	0	0	36
Totale	96				



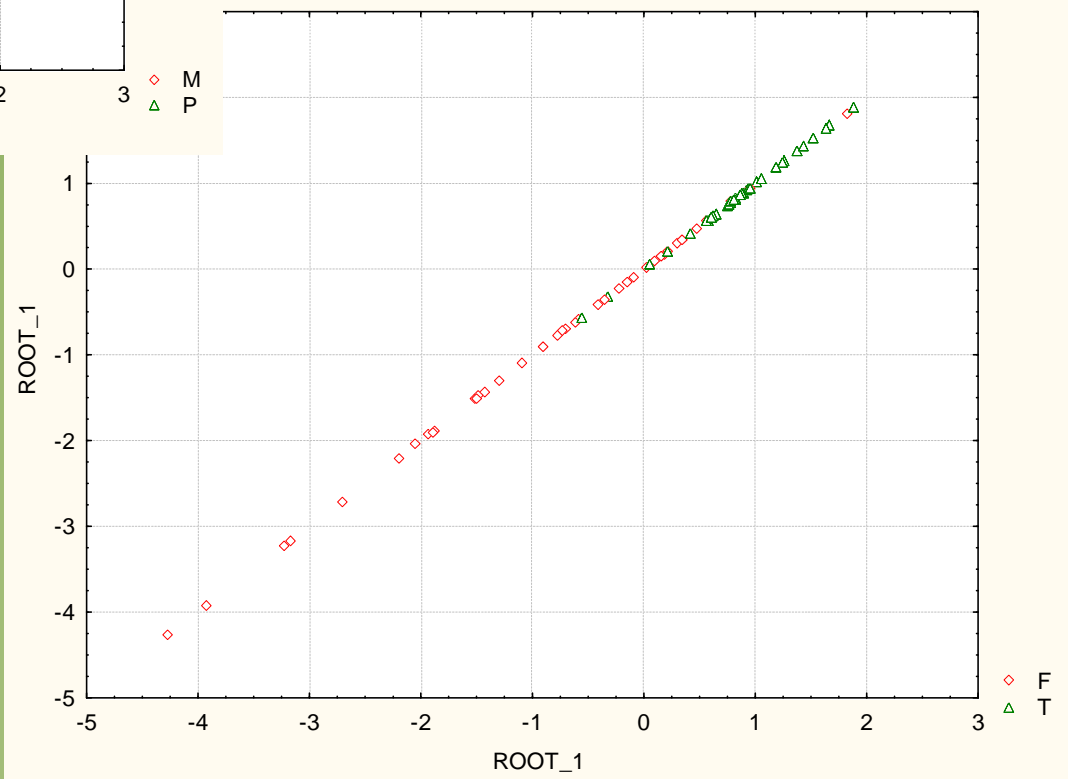
Risultati – Il latte

- Identificati 40 monoterpeni, 7 sesquiterpeni, 3 composti “miscellanea”
- I latti di Asiago risultano più ricchi quali-quantitativamente di componenti terpenici di quelli provenienti da Valle Stura
- Tre tipologie di comportamento
 - ✓ Composti “**ubiquitari**” (β -pinene, 1,8-cineolo, *p*-cymene, linalolo, β -cariophyllene, ...) presenti in tutti o quasi tutti i campioni esaminati indipendentemente dalla formazione di provenienza del prodotto
 - ✓ Composti “**casuali**” (pulegone, monoterpene 1, verbenolo ecc.) rilevati solo in alcuni campioni e la cui presenza sembra essere dovuta più ad un evento accidentale che ad un reale collegamento con la formazione. Spesso presenti solo in una delle due annate il che non rende possibile il loro utilizzo come biomarker
 - ✓ Composti “**biomarker potenziali**” (terpinolene, myrtenolo) presenti esclusivamente o principalmente nei campioni provenienti da una delle due aree considerate e non influenzati dalla annualità

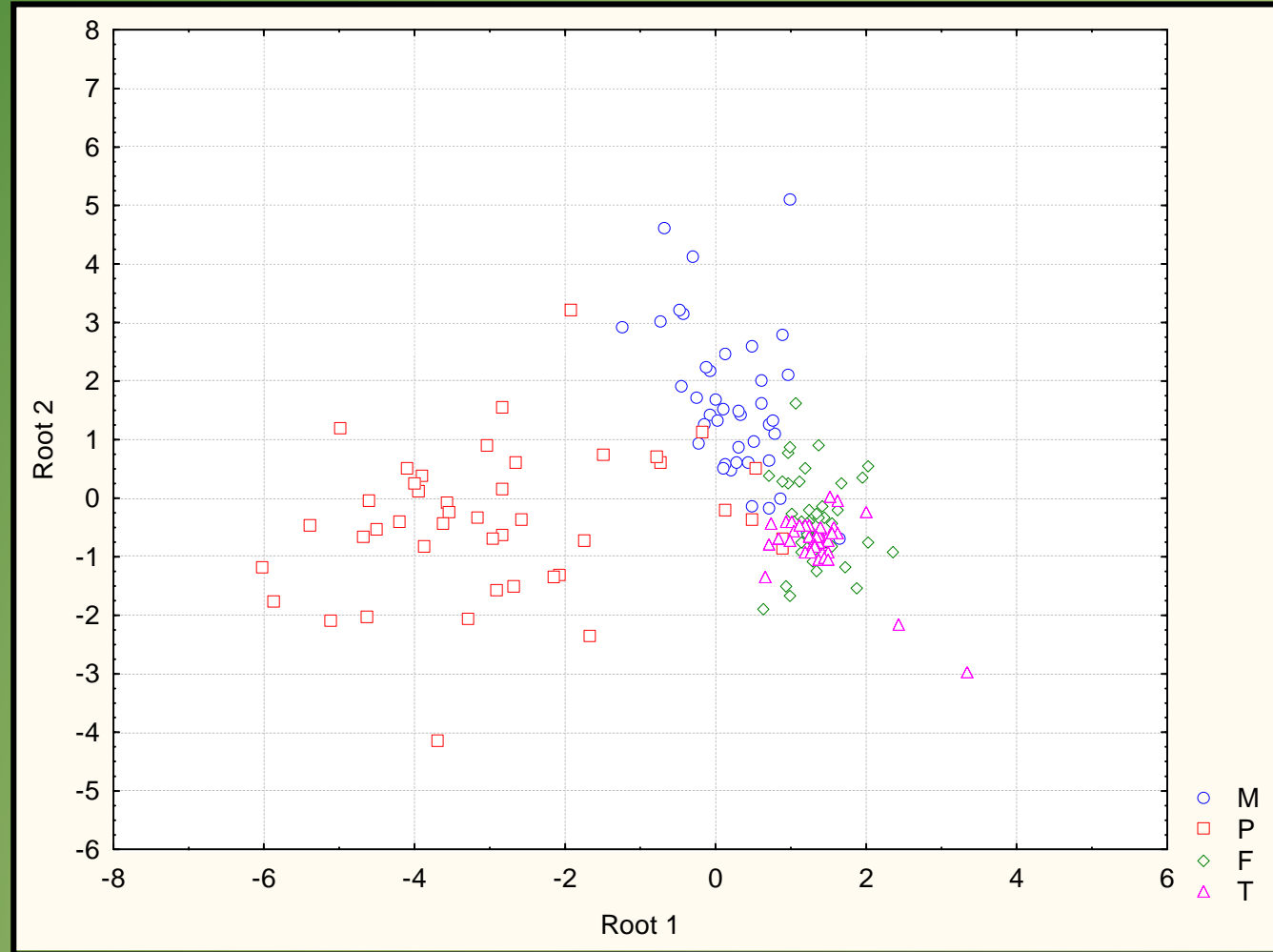


	%	M	P
M	100	41	0
P	82	8	36
Totale	91		

	%	F	T
F	66	29	15
T	95	2	40
Totale	80		

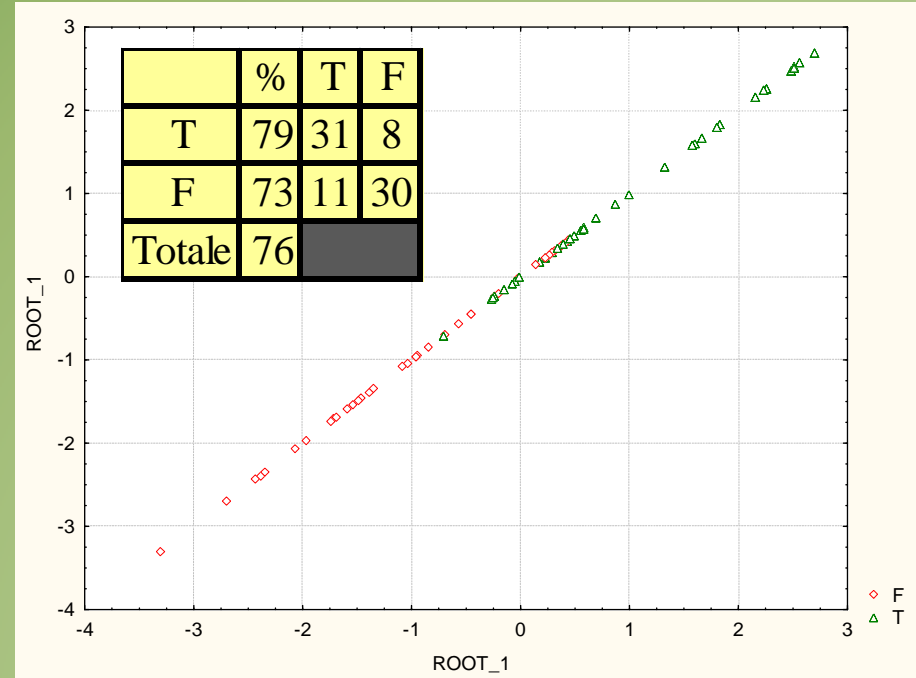
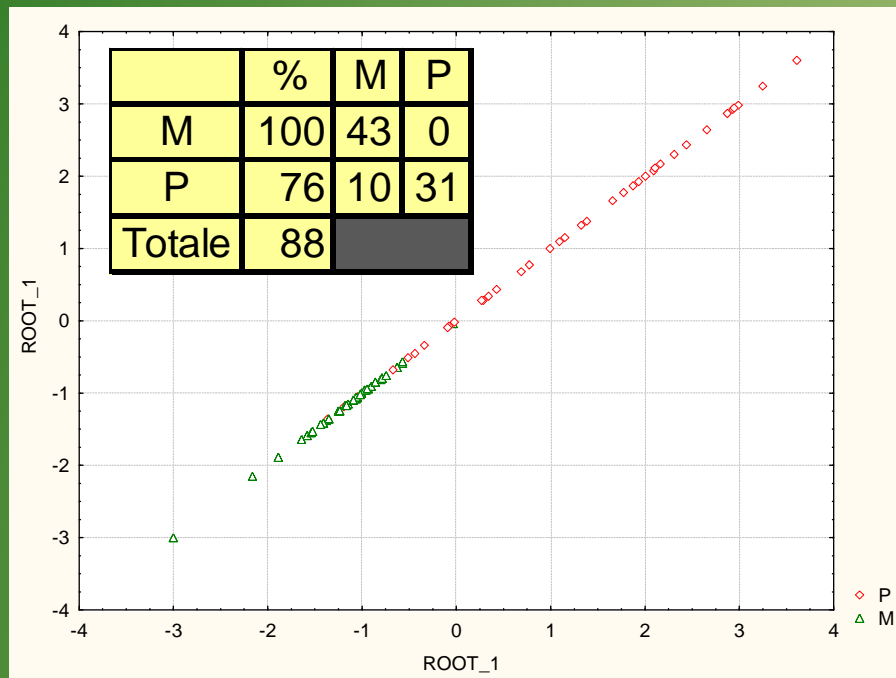


	%	M	P	F	T
M	88	36	0	2	3
P	80	5	35	1	3
F	59	0	0	26	18
T	85	0	0	6	36
Totale	78				

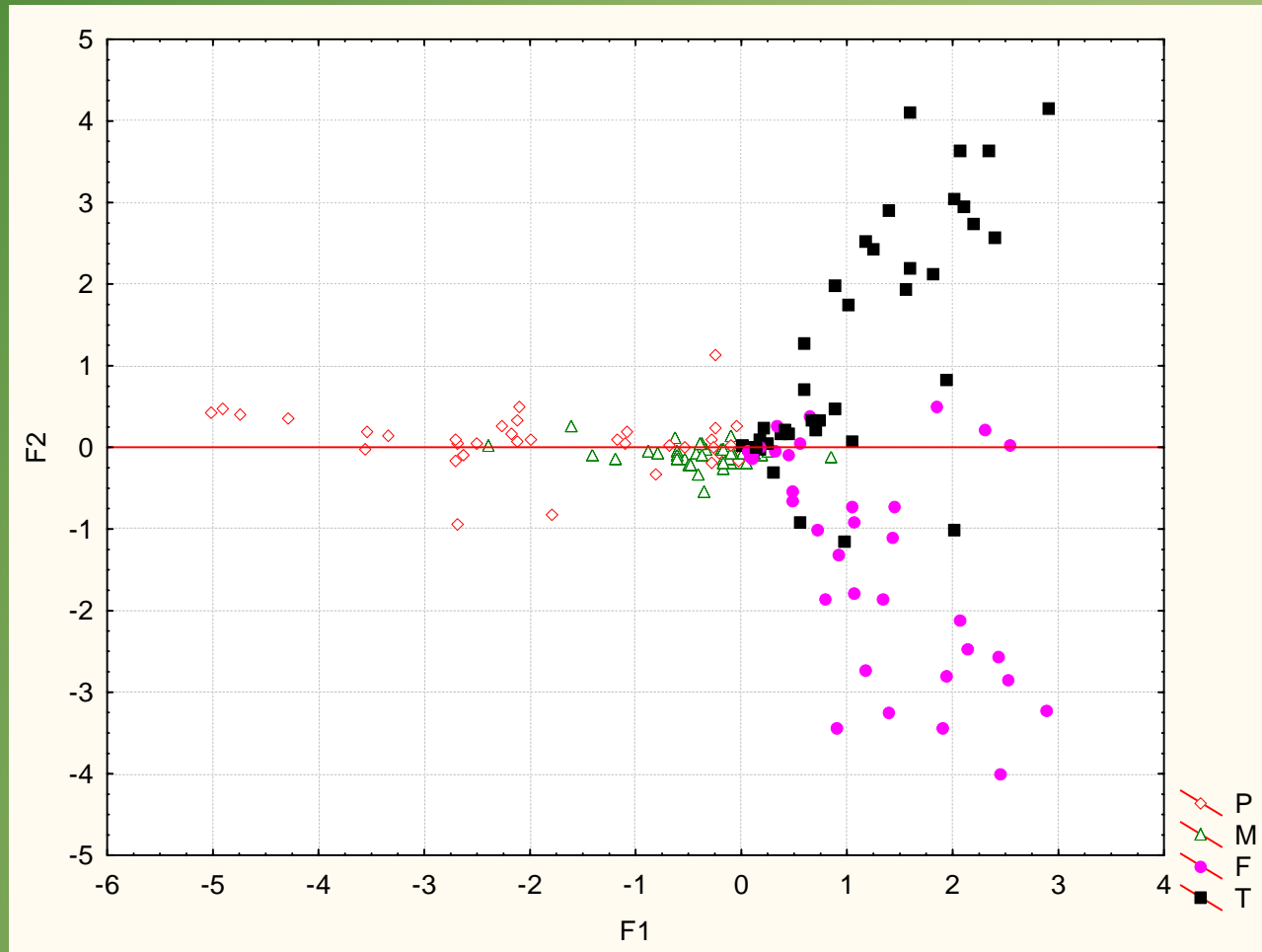


Risultati – Il formaggio

- Identificati 35 monoterpeni, 5 sesquiterpeni, 3 composti “miscellanea”
- I formaggi della prima annualità risultano più ricchi di componenti terpenici di quelli della seconda annualità



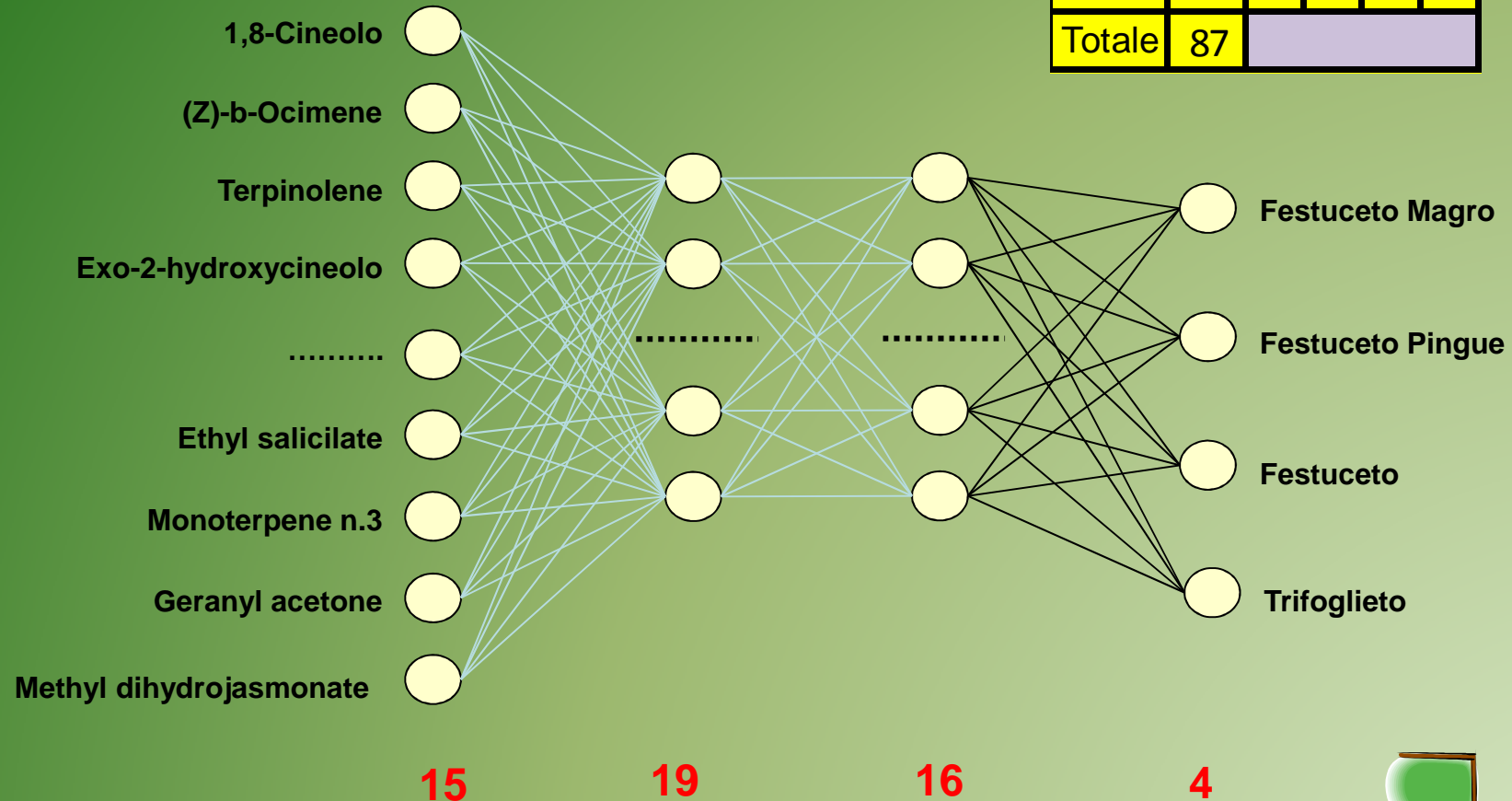
	%	M	P	T	F
M	93	40	3	0	0
P	58	16	24	1	0
T	48	17	0	19	3
F	56	16	0	2	23
Totale	65				



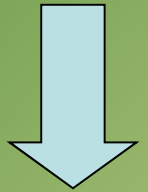
ANN

Formaggio

	%	F	P	M	T
F	87	34	0	0	5
P	92	0	36	2	1
M	87	1	4	40	1
T	80	6	1	1	32
Totale	87				

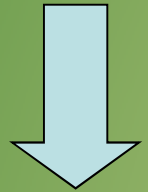
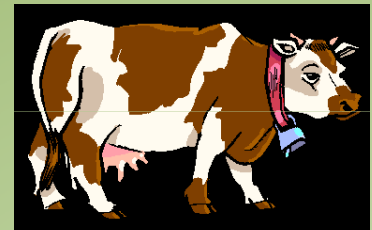
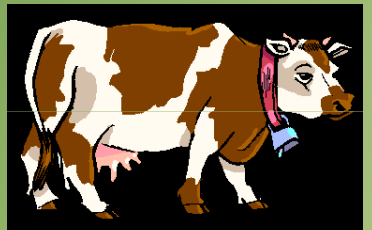
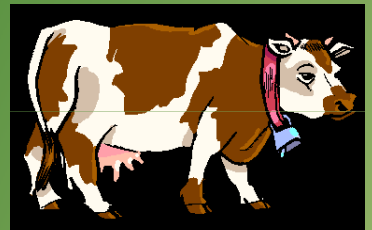


Risultati – I marker

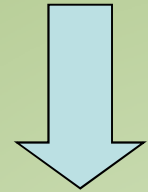


?

?



?



	E	L	F		E	L	F		E	L	F		E	L	F				
α-Pinene	X	X	X	4-Terpineol	-	-	X	Carveol cis	X	-	-	Menthol 2	-	X	-	Cis-Dihydrocarvone	-	X	-
Camphene	X	X	X	Menthol 3	-	-	X	Cymene 2.5-dim									X	X	-
α-Thujene	X	X	X	trans-Dihydrocarvone	-	-	X	p-Menth-3-									X	-	-
β-Pinene	X	X	X	Verbenol	-	-	X	Thymol 1									X	-	-
Sabinene	X	X	X	Verbenone	-	-	X	β-Cycloc									X	-	-
β-Myrcene	X	X	X	α-Terpineolo	X	-	-										X	-	-
Monoterpene n.i. 1	X	X	-	Piperitone													X	-	-
δ-3-carene	X	-	X	Monoterpene													X	-	-
α-Terpinene	X	X	X	Methyl salicylate													X	-	-
Limonene	X	X	X	Monoterpene n.i. 3	-	X	X	Euge									X	-	-
Cineol	X	X	X	Monoterpene n.i. 4	-	-	X	Isoeuger									X	-	-
γ-Terpinene	X	X	X	Monoterpene n.i. 5	-	-	X	Coumari									X	-	-
(Z)-β-Ocimene	X	X	X	Myrtenol	X	X	X	α-cubebe									X	-	-
(E)-β-Ocimene	X	-	X	Ethyl salicylate	-	X	X	Bicyclo g									X	-	-
p-Cymene	X	X	X	Terpinyl acetate	X	X	X	α-Copae									X	-	-
Terpinolene	X	X	X	Lavandulol	X	X	-	α-cubebe									X	-	-
β-phellandrene	X	-	-	Carvone	X	X	X	Sesquite									X	-	-
cis-Linalool oxide	-	X	X	β-Ionone	X	X	X	Sesquite									X	-	-
Dihydromyrcenol	-	X	X	Methyl dihydro jasmonate	-	X	X	Muurola									X	-	-
Linalool	X	X	X	Sesquiterpene n.i.	-	X	-	Muurola									X	-	-
Exo-2-hydroxycineole	-	-	X	Geranyl acetone	X	X	X	α-caryoph									X	-	-
Menthyl acetate 1	-	X	X	Sesquiterpene n.i. 4	-	X	-	Sesquiterpe									X	-	-
Menthyl acetate 2	-	X	X	4.5-dimethyl-2.6-octadiene	-	-	X	Sesquiterpene n.									X	-	-
Bornyl acetate	X	X	X	Monoterpene n.i. 6	-	-	X	Germacrene D	X	-	-	Dihydro carveol iso	X	-	-				
Camphor	X	X	X	α-Isomethyl ionone	-	-	X	Germacrene B	X	-	-	Nerol	X	-	-				
Bornyl acetate isomero	X	X	X	Carveol trans	X	-	X	δ-Amorphene	X	-	-	Geraniol	X	-	-				
β-caryophyllene	X	X	X	Dihydrocarveol	-	-	X	Sesquiterpene n.i. 6	X	-	-	Calamenene cis	X	-	-				

	E	L	F
Camphene	X	X	X
α-Pinene	X	X	X
4-Terpineol	X	X	-
Lavandulol	X	X	-
β-phellandrene	X	-	-
α-Cadinene	X	-	-
cis-Linalool oxide	-	X	X
Methyl dihydro jasmonate	-	X	X
Exo-2-hydroxycineole	-	-	X
Dihydrocarveol	-	-	X



**'Sistema'
alpeggio**

Conclusioni

