



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

ZAFFERANO (*Crocus sativus* L.):
Metodi analitici per la determinazione di adulterazioni

SAFFRON (*Crocus sativus* L.):
Analytical methods for the determination of
adulterations

TIPO TESI: (compilativa)

Studente:

ELISA MARCHETTI

Elisa Marchetti

Relatore:

DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Roberta Foligni

Correlatore:

DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

Cinzia Mannozi

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

Un sentito grazie alla Dott.ssa Roberta Foligni per il supporto costante, la disponibilità e le dritte indispensabili, alla Dott.ssa Cinzia Mannozi, mia correlatrice, per la gentilezza che ha mostrato nei miei confronti durante la mia permanenza nei laboratori universitari.

Un grande ringraziamento a mia madre e mio padre che, con il loro sostegno, mi hanno permesso di riprendere gli studi, contribuendo alla mia formazione personale.

Infine, una dedica speciale, alle mie coinquiline Francesca, Piera, Sarah e Giulia a cui devo la maggior parte delle mie risate in questi anni.

SOMMARIO

SOMMARIO	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	12
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	16
CAPITOLO 1 ZAFFERANO E FRODI ALIMENTARI	18
1.1 Zafferano (<i>Crocus sativus</i>) premesse di carattere generale	18
1.1.1 Scheda botanica <i>C. sativus</i>	20
1.2 Definizione di frodi alimentari.....	24
1.3 Le frodi alimentari più diffuse	25
1.4 Materiali vegetali e sintetici di frequente riscontro in <i>C. sativus</i> L.	29
CAPITOLO 2 OBIETTIVO DELLA TESI, MATERIALE E METODI.....	32
2.1 Obiettivo della tesi	32
2.2 Fonti dei dati	32
2.3 Metodi analitici sfruttati per l'individuazione di adulterazioni negli alimenti.....	33
2.4 Metodi analitici sfruttati per la determinazione di autenticità di <i>Crocus sativus</i> ed individuazione dei suoi adulteranti	35
2.4.1 Normativa ISO 3632.....	37
2.4.1.1 Analisi microscopica o analisi farmacognostica tradizionale	41
2.4.1.2 Determinazione dell'adulterazione di <i>C. sativus</i> con il test colorimetrico	41
2.4.1.3 Determinazione delle caratteristiche principali con il metodo spettrometrico UV-Vis.....	42
2.4.1.4 Rilevamento di coloranti artificiali: identificazione di coloranti acidi sintetici solubili in acqua - Metodo della cromatografia su strato sottile (TLC).....	48
2.4.1.5 Rilevamento di coloranti artificiali: identificazione di coloranti acidi sintetici solubili in acqua - Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)	58
2.4.2 Spettroscopia infrarossa (IR)	71
2.4.3 Gas cromatografia (GC).....	80

2.4.4 Cromatografia liquida (LC)	85
2.4.5 Naso elettronico, mucosa elettronica e lingua elettronica.....	91
2.4.6 Risonanza magnetica nucleare protonica (¹ H NMR).....	99
2.4.7 Metodi molecolari.....	109
2.4.7.1 Impiego dei marcatori SCAR a partire dai marcatori RAPD per identificare l'utilizzo di adulteranti vegetali	110
2.4.7.2 Barcoding Melting Curve Analysis (Bar-MCA).....	121
2.4.7.3 Confronto dell'efficienza di differenti kit utili all'estrazione del DNA e approfondimento dell'analisi genetica ed epigenetica.....	131
2.4.7.4 DNA barcoding-High Resolution Melt (Bar-HRM).....	142
2.4.8 Reazione di trasferimento protonico - Spettrometria di massa (PTR-MS).....	147
CONCLUSIONI	148
BIBLIOGRAFIA	150

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Valori nutrizionali e composizione chimica dello zafferano (espressi in 100 g). Fonte FDA	21
Tabella 1-2: Controlli effettuati nell'anno 2019 dall'ICQRF	27
Tabella 1-3: Elenco degli adulteranti vegetali molto spesso utilizzati per adulterare lo zafferano.....	29
Tabella 1-4: Elenco delle varie sostanze utilizzate come adulteranti nello zafferano.....	31
Tabella 2-1: Metodi analitici utilizzati per la definizione di autenticità dello zafferano e determinazione di eventuali frodi.....	35
Tabella 2-2: Elenco dei prodotti chimici utilizzati nelle diverse analisi, nelle diverse tecniche, affrontate da Ordoudi et al.	44
Tabella 2-3: Elenco degli adulteranti utilizzati, a sinistra i prodotti di origine vegetale mentre a destra quelli artificiali.....	52
Tabella 2-4: Elenco dei solventi e dei materiali utilizzati per le analisi	52
Tabella 2-5: Identificazione dei coloranti sintetici in base ai relativi tempi di eluizione .	63
Tabella 2-6: Marcatori identificati dall'ICQRF delle diverse specie vegetali utilizzate comunemente come adulteranti dello zafferano.....	66
Tabella 2-7: Elenco dei prodotti utilizzati per l'analisi HPLC/PDA/ESI-MS	66
Tabella 2-8: Elenco degli adulteranti e delle porzioni utilizzate durante le analisi NIR...	72
Tabella 2-9: Spettri presenti nel database del LFCT FT-IR.....	77
Tabella 2-10: Elenco dei prodotti chimici adoperati nel corso delle analisi	86
Tabella 2-11: Campioni utilizzati e la loro rispettiva provenienza	110
Tabella 2-12: Elenco dei campioni utilizzati nel presente studio con il relativo luogo di acquisto; ad eccezione degli adulteranti. * luogo riportato nella figura 2-40	122
Tabella 2-13: Temperatura di fusione dei picchi delle singole specie vegetali	128
Tabella 2-14: Risultati ottenuti dall'analisi dalle diverse tipologie di campioni	132

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Regioni di produzione dello zafferano con le relative nazioni con maggiore e minore influenza nella produzione e sono evidenziati anche i centri di vendita.....	20
Figura 1-2: Fioritura dello zafferano (<i>C. sativus</i> L.).....	20
Figura 1-3: Formule chimiche dei principali costituenti responsabili della qualità dello zafferano.....	23
Figura 2-1: I 16 approcci strumentali più comuni per la determinazione di adulterazioni nei prodotti alimentari.....	33
Figura 2-2: Caratteristiche analizzate e categorizzazione di <i>C. sativus</i> secondo la ISO/TS 3632:2011.....	38
Figura 2-3: Esempio di un profilo UV-Vis di un estratto acquoso di zafferano	40
Figura 2-4: Spettro UV-Vis che mostra il confronto del prodotto commerciale (linea blu) con un campione di zafferano autentico (linea nera) e le lunghezze d'onda caratteristiche ..	44
Figura 2-5: Confronto degli spettri in derivata seconda del prodotto commerciale con dei coloranti sintetici. I rapporti dei coloranti artificiali sono espressi come % p/p	45
Figura 2-6: Risultati della spettrofotometria UV-Vis; applicazione della norma ISO/TS 3632 al campione autentico di zafferano e alle miscele prodotte artificialmente	47
Figura 2-7: Cromatogrammi UV-Vis degli estratti analizzati (a sinistra).....	47
Figura 2-8: Proporzioni, in peso, delle miscele di zafferano e di adulteranti	53
Figura 2-9: Controllo dell'autenticità dello zafferano basato sui metodi TLC (a destra) e UV-Vis (a sinistra).....	54
Figura 2-10: Spettri UV-Vis sovrapposti dei campioni analizzati. Safflower: Cartamo; Quinoline: Giallo Chinolina; Madder: Robbia; Sumac: Sommacco; Sunset: Giallo Tramonto; Tartrazine: Tartrazina; Tumeric: Curcuma; Saffron: Zafferano.....	56
Figura 2-11: Rappresentazione dei tempi e gradienti di concentrazione dell'eluente utilizzato per la corsa cromatografica	59
Figura 2-12: Esempio di un cromatogramma riportato nella normativa ISO 3632:2010-2, ottenuto a 440 nm di 1 mg/kg di standard (A=assorbanza; t= tempo di eluizione)	63

Figura 2-13: Profili cromatografici (HPLC-DAD) a 440 nm e 550 nm. I picchi cromatografici 1 e 2 corrispondono, rispettivamente, alla picrocrocina e al trans-4-GG estere della crocetina. In nero il profilo cromatografico dello zafferano autentico, mentre in blu il profilo ottenuto dal campione commerciale.....	65
Figura 2-14: Cromatogrammi ottenuti dall'iniezione di estratti di zafferano (in alto) e gardenia (in basso). Sono evidenziati gli esteri della crocetina	70
Figura 2-15: Spettri NIR grezzi, intervallo 9000-4000 cm^{-1} , di campioni rappresentativi di zafferano (linea continua blu); cartamo (linea quadrata rossa); stami di zafferano (rotonda a punti verde); buccia di melograno (linea tratteggiata lunga viola,; paprika (linea tratteggiata lunga celeste); calendula (linea tratteggiata arancione); curcuma (linea quadrata gialla); ibisco (linea rosso mattone); estratto di zafferano esausto (linea tratteggiata tonda grigia).....	73
Figura 2-16: Modelli SIMCA di zafferano (non adulterato); la linea nera rappresenta la soglia di accettazione del modello della classe di interesse (zafferano). Il modello è applicato a tutti gli adulteranti nel set di prova. Calendula (cerchi verdi); curcuma (quadrati blu); stami di zafferano (triangoli rossi); ibisco (triangolo giallo rovesciato); paprika (rombo celeste); melograno (pentagono viola); cartamo (esagono arancione); estratto esausto di zafferano (stelle marroni) oltre ai campioni di zafferano (stelle rosse)	75
Figura 2-17: Modello PLS-DA applicato allo zafferano (non adulterato, quadrati blu); agli otto adulteranti (triangoli rossi) e alle miscele di adulterazione (adulterati, cerchi verdi).....	75
Figura 2-18: Elenco dei prodotti vegetali utilizzati. L1: campioni 1-20, L2: campioni 21-40, L3: campioni 41-60, L4 campioni 61-80; reperiti in diverse località a Kozani, Grecia...	78
Figura 2-19: Cromatogrammi HPLC di estratti di acqua-metanolo dello zafferano con la curcuma a tre diverse concentrazioni (0,5; 1,0; 5,0% p/p) e con le miscele di adulteranti	79
Figura 2-20: Elenco dei campioni utilizzati come standard esterni	81
Figura 2-21: Confronto del profilo LC-MS ottenuto per il cromatogramma dell'estratto di geniposide da un campione di zafferano autentico adulterato con 10 ng/ml di geniposide standard in una colonna C_{18} con eluizione a gradiente (A) ed eluizione isocratica (B).....	88
Figura 2-22: Confronto delle corse cromatografiche utilizzando le due colonne C_{18} (A e B) e Cyano (C e D) per i campioni miscelati, zafferano + standard e il singolo standard, geniposide	90
Figura 2-23: Schema sintetico del sistema "naso elettronico"	92
Figura 2-24: Rappresentazione delle dimensioni e delle diverse parti che compongono gli stimmi di zafferano. Si mette in evidenza uno stimma con stile giallo.....	93
Figura 2-25: Schema del sistema e-nose.....	94

Figura 2-26: Risposta del sensore del naso elettronico ad un odore generico(A); risposta tipica del naso elettronico ai campioni di zafferano (B); cartamo (C); mais (D)	95
Figura 2-27: Grafico prodotto da PCA. I differenti campioni sono correttamente distinti ed in modo facile. PC1 e PC2 rappresentano la varianza totale tra le differenti misure.....	96
Figura 2-28: Sistema schematizzato dell'e-tongue.....	97
Figura 2-29: Regione alifatica dell'estratto del prodotto commerciale (linea rossa) e dei 3 campioni DOP greco, spagnolo e italiano (linee nere) con ¹ H-NMR CDCl. Per la legenda vedere le figure sopra	101
Figura 2-30: Regioni selezionate di spettri ¹ H-NMR acquisiti da estratti in DMSO-d ₆ . Lo spettro incorniciato e nero rappresenta lo zafferano puro. Si osservano gli spettri dei diversi agenti di carica puri: (A) Curcuma; (B) stami di <i>C. sativus</i> ; (C)Cartamo; (D) estratto di <i>Gardenia jasminoides</i>	104
Figura 2-31: PCA eseguita considerando 10 campioni di zafferano greco puro (cerchi viola) e gli stessi campioni adulterati al 20% (p/p) con estratto del frutto di <i>G. jasminoides</i> (cerchi azzurri); <i>C. tinctorius</i> (cerchi neri); stami di <i>C. sativus</i> (cerchi rosa)	105
Figura 2-32: Spettro completo ¹ H NMR con ingrandimento di segnali specifici dello zafferano in diversi campioni: (linea blu) campione zafferano autentico; (linea rossa) campione adulterato con una bassa percentuale di composti adulteranti; (linea verde) campione completamente fraudolento. In quest'ultimo campione non si rileva nessun segnale dello zafferano.....	107
Figura 2-33: Analisi RAPD del DNA genomico di <i>C. sativus</i> e delle 7 specie contaminanti; scala del DNA 100 bp. In (A) i profili di amplificazione ottenuti con il primer OPA10; (B) con il primer OPA11; (C) con il primer OPB08 e (D) con il primer OPB10.	113
Figura 2-34: Elenco e dettagli di ogni primer utilizzato, RAPD e SCAR, per ogni specie	114
Figura 2-35: Validazione del marcatore SCAR ScCs263 e ScCv304 su campioni di stigma essiccati commerciali di zafferano di diverse origini geografiche.....	115
Figura 2-36: Test della sensibilità del marcatore SCAR: (A) PCR eseguita con la coppia di primer ScAm190 specifica per <i>Arnica montana</i> ; (B) con la coppia di primer ScBo267 specifica per <i>Bixa orellana</i> ; (C) con la coppia di primer ScCo390 specifica per <i>Calendula officinalis</i> ; (D) con la coppia di primer ScCt131 specifica per <i>Carthamus tinctorius</i> ; (E) con la coppia di primer ScCv304 specifica per <i>Crocus vernus</i> ; (F) con la coppia di primer ScCl289 specifica per <i>Curcuma longa</i> ; (G) con la coppia di primer ScHsp354 specifica per <i>Hemerocallis</i> sp. Il controllo negativo, -, è l'amplificazione senza il DNA modello e come ulteriore controllo	

negativo si utilizza C.s.: DNA da stigmi essiccati di *C. sativus*. M: scala di DNA da 100 bp. Come controllo positivo si utilizza A.m.: DNA dai fiori essiccati di *A. montana*; B.o., DNA dai semi essiccati di *B. orellana*; C.o., DNA dai fiori essiccati di *C. officinalis*; C.t., DNA dai fiori essiccati di *C. tinctorius*; C.v., DNA dagli stigmi essiccati di *C. vernus*; C.l., DNA dai rizomi essiccati di *C. longa*; H.sp., DNA dai tepali essiccati di *Hemerocallis sp.*..... 116

Figura 2-37: Elenco dei prodotti alimentari e le relative informazioni sui singoli campioni. Sono riportati anche gli interferenti che causano problemi quando si utilizza un unico metodo di estrazione. I polifenoli come anche i grassi e gli zuccheri legano il DNA, gli oli essenziali presenti nelle altre spezie determinano interferenze durante le fasi di estrazione, amplificazione e trattamento del DNA 118

Figura 2-38: Corsa elettroforetica di alcuni prodotti alimentari contenenti zafferano come ingrediente dichiarato (righe 18-24). Ref: standard di DNA. La corsa elettroforetica è in gel di agarosio 1,5% e il DNA è colorato con bromuro di etidio. La degradazione si nota dagli strisci in quasi tutti i campioni..... 119

Figura 2-39: Analisi del marcatore SCAR di 17 campioni commerciali di zafferano macinato (righe 1-17) e 7 prodotti alimentari contenenti zafferano come ingrediente dichiarato (righe 18-24). (A) PCR eseguita con la coppia di primer ScCs263 specifica per *Crocus sativus*; (B) PCR eseguita con la coppia di primer ScCt131 specifica per *Carthamus tinctorius*; (C) PCR eseguita con la coppia di primer specifici ScCv304 per *Crocus vernus*; (D) PCR eseguita con la coppia di primer ScCl289 specifica per *Curcuma longa*; (E) PCR eseguita con la coppia di primer ScHsp354 specifica per *Hemerocallis sp.*; -: controllo negativo; C.s.: DNA da stigmi essiccati di *C. sativus*; C.t.: DNA da fiori essiccati di *C. tinctorius*; C.v.: DNA da foglie fresche di *C. vernus*; C.l.: DNA da rizomi essiccati di *C. longa*; H.sp.: DNA da tepali essiccati di *Hemerocallis sp.*..... 120

Figura 2-40: Elenco degli adulteranti utilizzati e relativi luoghi di acquisto 123

Figura 2-41: Elenco dei primer e delle condizioni di RT-PCR. Condizioni che ne hanno permesso la formazione 125

Figura 2-42: Rappresentazione della curva di fusione di *Crocus sativus* ottenuta dal barcode trnH-psbA..... 127

Figura 2-43: Curve di fusione dello zafferano e dei suoi adulteranti ottenute con la Real Time PCR. Le miscele di zafferano autentico e di adulterante preparate sono in rapporto 1:1 (stessa reazione PCR) e sono amplificate in triplicato con la coppia di primer psbAF/trnHR 128

<p>Figura 2-44: Bar-MCA per l'autenticazione dello zafferano commerciale sconosciuto. (linea rossa) curva di fusione dello zafferano autentico, (linea blu) campione commerciale sconosciuto e (linea viola) miscela dei due prodotti. Si osservano delle curve significativamente diverse tra di loro; ciò significa che il campione può essere fraudolento</p>	129
<p>Figura 2-45: Identificazione dei campioni utilizzati per sviluppare i metodi con le relative informazioni</p>	131
<p>Figura 2-46: Amplificazione della PCR con i marcatori specifici matK sulle diverse specie in esame. S (zafferano); G (gardenia); C (cartamo); B (buddleja); Cu (curcuma) e Ca (calendula); NC (controllo negativo)</p>	135
<p>Figura 2-47: Confronto dei diversi campioni in termini di rilascio di colore in acqua; sono stati testati sia campioni di zafferano adulterato che campioni di zafferano autentico. (A e B) Mostrano la differente capacità dei pigmenti di solubilizzarsi in acqua considerando lo stesso quantitativo di prodotto in polvere e in stimmi. (C) Considera la differente capacità di rilasciare il colore nel solvente da parte di zafferano autentico, spagnolo in polvere, e un campione commerciale, di zafferano spagnolo, oltre a due campioni adulterati di cui si sono avvalsi nel presente lavoro. Sia gli adulterati che i prodotti commerciali rilasciano una colorazione molto più forte rispetto al vero zafferano.</p>	136
<p>Figura 2-48: Confronto degli stimmi di zafferano, stesso quantitativo, di un prodotto autentico e di uno adulterato; confronto ottenuto dopo solo tre minuti in acqua fredda. Il dettaglio degli stimmi adulterati permette di osservare colorazioni differenti di questi ultimi dal rosso a giallo; si ipotizza che l'adulterazione del campione sia un mix di molti zafferani differenti e di anni diversi proprio perché quest'ultimi diventano marroni con il passare degli anni. Il criminale per riportare il colore originale ha utilizzato dei coloranti sintetici. L'assenza di amplificazione con altri marcatori, tranne che per <i>Crocus</i>, supporta questa teoria.</p>	136
<p>Figura 2-49: Confronto dei profili AFLP di (in blu) di un campione di stimmi interi e 2 (in rosso) di zafferano in polvere.</p>	138
<p>Figura 2-50: Confronto del profilo epigenetico ottenuto utilizzando l'analisi MS-AFLP di differenti parti del fiore del <i>crocus</i>. Il profilo epigenetico degli stami interi è davvero differente rispetto a quello dei filamenti o delle altre parti del fiore. Si hanno elevati polimorfismi tra gli stami e altre parti del fiore stesso</p>	139
<p>Figura 2-51: Dettagli delle copie primer specie-specifiche con le relative temperature di annealing</p>	141

Figura 2-52: Esempio di utilizzo di uno dei marker ISSR per distinguere <i>C. sativus</i> da <i>C. cartwrightianus</i> . La loro miscela assomiglia ad entrambe, ma comunque il marker consente la rilevazione.....	145
Figura 2-53: Curve HMR normalizzate per gli ampliconi delle diverse specie vegetali ottenute dal marker specifico trnL	146
Figura 2-54: Rappresentazione delle curve di fluorescenza normalizzate del DNA con le diverse concentrazioni delle due specie vegetali, curcuma e zafferano. In figura anche il riferimento di <i>Curcuma longa</i> autentica (curva grigia).....	147
Figure 2-1: Recenti applicazioni della spettroscopia e cromatografia per la valutazione della qualità dello zafferano. Le tecniche spettroscopiche in alto e in basso le tecniche cromatografiche	34
Figure 2-2: Piastre TLC-IA di campioni reali (a'; b'; c')	54
Figure 2-3: Modelli cromatografici prodotti, dalla TLC, di campioni di zafferano e dei suoi adulteranti. (a) sommacco; (b) giallo tramonto; (c) tartrazina; (d) curcuma; (e) robbia; (f) giallo chinolina; (g) cartamo; (h) zafferano	55
Figure 2-4: Profili gas cromatografici rappresentativi dello zafferano (a), della curcuma (b) e della calendula (c) ottenuti con lo strumento Eracle II. I cromatogrammi della colonna MXT5 (parte sinistra della figura), mentre i cromatogrammi della colonna MXT1701 (parte destra)	83
Figure 2-5: (A) Regione aromatica e (B) alifatica degli estratti di zafferano commerciale (in rosso); dall'alto verso il basso (in nero) i campioni di zafferano autentico dalla Grecia, Spagna e Italia analizzati con ¹ H-NMR DMSO. (C) è un ingrandimento di una porzione dello spettro (B). Legenda delle abbreviazioni presenti nelle figure: sucresteri di crocettina (CSE); tartrazina (T); giallo tramonto (SY); propan-1,2-diolo (PD); 1,2 DAG (diacilglicerolo; propan-2-olo (2P); monoacilglicerolo (1MAG); triacetina (TA); U e U1 (composti sconosciuti); glu e gen per α-glucosio e α-gentiobiosio rispettivamente	100
Figure 2-6: (a sinistra) L'analisi PLS-DA analizza i campioni di zafferano puro (cerchi viola) e zafferano adulterato (cerchi neri). (a destra) L'analisi dei campioni adulterati con le diverse specie vegetali alla concentrazione del 20% di adulterante, p/p. Gardenia (cerchi blu); cartamo (cerchi neri); stami di <i>C. sativus</i> (cerchi rosa); curcuma (cerchi verdi)	106

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
ANN	Artificial Neural Networks
ANOVA	Analysis of Variance
AQ	Quality Assurance
ASPCR	Allele-Specific PCR
Bar-MCA	Barcoding Melting Curve Analysis
BSA	Bovine Serum Albumin
C.I.	Codice Identificativo
CDCl	Cloroformio deuterato
CE	Capillary Electrophoresis
CQ	Controllo Qualità
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
D	Deuterio
DAD	Diode Array Detector
DFE	Dietary Folate Equivalents
DHA	Acido docosaesaenoico
DMSO	Dimetilsolfossido
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DOP	Denominazione di Origine Protetta
DPA	Acido docosapentaenoico
dS/m	unità di misura della conduttività, deci Siemens/metro

EPA	Acido eicosapentaenoico
ESI-MS	Electrospray Ionization – Mass Spectrometry
FID	Flame Ionization Detector
FT-IR	Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier
FT-NIR	Fourier Transform Near-Infrared spectroscopy
H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRM	High Resolution Melt
HS-GC	Head Space – Gas Chromatography
i.d.	Internal diameter
ICQRF	Ispettorato Centrale della tutela della Qualità e della Repressione Frodi dei prodotti agroalimentari
IGP	Indicazione Geografica Protetta
IR	Infrared spectroscopy
IRMS	Isotope-Ratio Mass Spectrometry
ISO	International Organization for Standardization
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
ITS	Internal Transcribed Spacer
IU	International Unit
LAMP	Loop-mediated isothermal Amplification
LC	Liquid Chromatography
LDA	Linear Discriminant Analysis
LFCT	Laboratory Food Chemistry and Technology
LOD	Limit Of Detectability
LOQ	Limit Of Quantification
m/z	Massa/carica
MIR	Mid-Infrared spectroscopy

MLP	Multilayer Perception
MOS	Metal Oxide Semiconductor
MS	Mass Spectrometry
MS-AFLP	Methylation Sensitive-Amplification Length Polymorphism
NIR	Near-infrared spectroscopy
PA	Poliammide
PCA	Principal component analysis
PCB	Policlorobifenili
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Photo-Diode Array detector
PE	Polietilene
PLS-DA	Partial Least Squares - Discriminant Analysis
PLSR	Partial Least Squares Regression
PP	Polipropilene
Psi	unità di misura della pressione, pound per square inch
PTFE	Politetrafluoroetilene
PTR-MS	Proton Transferreaction-Mass Spectrometry
PVDF	Polivinilidenfluoruro
PVP	Polivinilpirrolidone
QTOF	Quadrupole Time Of Fly
RAE	Retinol Activity Equivalent
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RBF	Radial Basis Function
r _{cf}	Relative centrifugal force
R _f	Fattore di ritenzione

RP-HPLC-FLD	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector
RSD	Relative Standard Deviation
RT-PCR	Real Time- Polymerase Chain Reaction
S/N	Signal/Noise
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SIMCA	Soft Independent Modelling of Class Analogy
SPE	Solid Phase Extraction
TAE	Tris Acetate EDTA
TLC	Thin-Layer Chromatography
TLC-IA	Thin-Layer Chromatography - Image Analysis
VOC	Volatile Organic Compound

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi si affrontano tecniche e possibili metodi, utili per riconoscere eventuali adulterazioni di diversa natura; in quello che è considerato, in campo alimentare, come l'oro rosso: lo zafferano. In particolare, si pone l'attenzione come nel tempo stiano cambiando le tecniche utilizzate proprio per il continuo progresso scientifico e tecnologico. Ci si trova di fronte ad un quadro estremamente variegato che offre numerosi spunti di analisi.

Le motivazioni che mi hanno spinto ad approfondire tale tema hanno una duplice natura. L'interesse nei confronti dell'etichettatura, dei prodotti alimentari, è stato influenzato e sicuramente incentivato dalle curiosità nate durante il mio percorso universitario e dall'interesse personale di come si possano sfruttare i diversi strumenti analitici per la determinazione di composti organici presenti nella grande varietà di alimenti.

L'obiettivo di questa tesi di laurea è quello di fornire una panoramica delle diverse metodologie utili ai fini del riconoscimento e all'identificazione di eventuali adulterazioni a carico dello zafferano, mettendone in evidenza le peculiarità ed eventuali mancanze. L'elaborato, in questo modo, mira a proporre uno sguardo generale delle metodiche ad oggi in uso, e affermate, e quelle che stanno iniziando a prendere campo proprio a seguito dei risultati potenzialmente utili ai fini analitici.

La ricerca bibliografica è stata condotta ricorrendo al motore di ricerca Sciencedirect, Scopus, Google Scholar e leggendo diversi documenti *on-line*, ma sono stati considerati solo quelli affidabili. Le diverse pubblicazioni ricercate vertono soprattutto sugli adulteranti più comunemente utilizzati, metodi che permettano di definire l'autenticità dello zafferano e l'individuazione di eventuali materiali estranei aggiunti volontariamente alla spezia.

La tesi è articolata in due capitoli: nel primo capitolo viene fornita un'introduzione della materia prima vegetale, attraverso la definizione delle caratteristiche biologiche e chimiche, l'elenco delle sostanze, vegetali e/o sintetiche, comunemente utilizzate per adulterare *C. sativus* e precisato il termine "frode alimentare" secondo la legge oltre a chiarire i settori maggiormente colpiti da questa pratica. Nel secondo capitolo ci si occupa di sviluppare un resoconto di alcune analisi pubblicate sull'argomento facendo anche riferimento alla normativa ISO 3632:2010, norma relativa all'autenticità della spezia presa in esame. Nelle

conclusioni, infine, sono presenti delle considerazioni nate dai concetti più rilevanti dell'indagine svolta.

Grazie a questo lavoro di ricerca è stato possibile analizzare alcuni importanti aspetti legati ai vari metodi sfruttati per lo scopo sopra definito.

Capitolo 1

ZAFFERANO E FRODI ALIMENTARI

1.1 Zafferano (*Crocus sativus*) premesse di carattere generale

Lo zafferano è comunemente conosciuto come oro rosso ed è utilizzato come ingrediente in molti prodotti trasformati come nelle miscele di condimenti, tisane, pasta o riso pronto, precotto o liofilizzato. Gli stimmi essiccati di *C. sativus*, genere *Crocus*, famiglia *Iridaceae*, sono i più costosi delle 85 specie (Shawky, et al., 2020; ISO, 2011; Torelli, et al., 2014). Come riporta (Soffritti, et al., 2016), il prezzo risulta raggiungere i 20000 €/kg. L'elevato prezzo è dovuto alla notevole manodopera per piantare, coltivare e raccogliere i fiori; tutto questo rende la spezia particolarmente costosa e suscettibile ad essere adulterata con ingredienti più economici (Shawky, et al., 2020; Schumacher, et al., 2016). Tra le diverse fasi colturali, quella della raccolta dei fiori, la loro pulitura e la conseguente estrazione degli stimmi sono le operazioni che richiedono più tempo. I fiori si deperiscono rapidamente e come conseguenza si ha la perdita della qualità dello zafferano, soprattutto se esposto alle intemperie. In genere, la raccolta si effettua quotidianamente e nelle prime ore della giornata così che i fiori siano ancora chiusi quando raccolti. La raccolta, ancora manuale, si effettua tagliando il fiore alla base della corolla per poi porlo in cestini; si evita così lo schiacciamento dovuto dal peso dei diversi fiori raccolti. Una volta raccolti i fiori, gli stimmi vanno estratti il prima possibile altrimenti si va incontro alla perdita della qualità ma anche perché risulterebbe più complicata la rimozione stessa. La separazione degli stimmi dal fiore prende il nome di mondatura. Una volta estratti, la fase successiva è l'essiccazione. Al giorno d'oggi si utilizzano essiccatoi elettrici termostati la cui temperatura è impostata a 45°C. Terminato questo stadio gli stimmi hanno perso più di 3/4 del proprio peso e sono pronti per la conservazione (Agostinucci, 2009).

Va detto che per produrre 1 Kg di zafferano sono necessari 150000 fiori (Heidarbeigi, et al., 2015).

È apprezzato non solo dall'industria alimentare per le sue caratteristiche sensoriali quali colore e sapore, ma anche dall'industria farmaceutica e da quella cosmetica (Bosmali, et al., 2017). Da recenti ricerche condotte in campo farmaceutico si evince che lo zafferano può avere

delle proprietà benefiche quali: attività antitumorali, antiossidanti, analgesiche, antinfiammatorie oltre che alle antidepressive (Jiang, et al., 2014).

Questa spezia è comunemente coltivata in azienda, ma si trova anche in natura. Non necessita di particolari condizioni climatiche, difatti l'altitudine alla quale questa pianta è in grado di crescere va dal livello del mare fino a sopra i 2000 m. In realtà, si è acclimatata alle condizioni che si verificano nei fianchi di collina, negli altipiani e nelle valli montane; altitudini di 600-1700 m (Kiani, et al., 2018). Come anche descritto nei lavori di (Agostinucci, 2009; Sabatino, et al., 2011) richiede un clima mediterraneo: inverni freddi ed estati calde e secche, anche se, è capace di resistere a temperature estreme sia in estate che in inverno. Richiede terreni con tessitura franco-argillosa, ben drenati e permeabili, la concentrazione ottimale di calcare è pari al 40-50% e un pH ottimale compreso fra 6 e 7. La profondità ideale del terreno è di 60-70 cm e non tollera gli eccessi di salinità (>4 dS/m).

Sembra che le sue origini siano nelle aree dell'Iran, Turchia e Grecia, ma ora la sua coltivazione si è espansa con successo in Spagna, Francia, Italia, Svizzera, Marocco, Egitto, Azerbaijan, Pakistan, India, Nuova Zelanda, Australia e Giappone. Le diverse aree di coltivazione come anche il processamento post-raccolta, il tempo e le condizioni di conservazione influenzano la qualità dello zafferano (Kiani, et al., 2018). Tra le diverse aree, è famosa la spezia prodotta in Europa per le sue distinte caratteristiche di qualità principalmente associate ai metodi di lavorazione tradizionale e proprio dalle caratteristiche dovute alle aree geografiche di produzione (Bosmali, et al., 2017). L'Iran risulta essere il primo produttore, ricopre più del 90% della produzione; si stima che la produzione totale annua nel mondo sia di 190 tonnellate (Bosmali, et al., 2017; Kiani, et al., 2018). In Italia la produzione annua si aggira intorno ai 400 Kg. Si coltiva soprattutto in Sardegna (35 ettari) ed in Abruzzo (7 ettari), poi in misura minore in Umbria, Toscana, Liguria e Sicilia. Alcune produzioni hanno ottenuto la DOP, denominazione di origine protetta, quali "Abruzzese di Navelli", "zafferano di San Gimignano" e lo "zafferano di Sardegna" (Sabatino, et al., 2011). In realtà, in Europa si hanno in totale 5 DOP perché, insieme alle italiane, concorrono anche la DOP greca "Krokos Kozanis" e l'"Azafran de la Mancha" (Spagna) (Bosmali, et al., 2017).

Negli ultimi anni la domanda di *C. sativus* è in aumento in Medio Oriente ed in Occidente, ma la quantità di zafferano essiccato prodotto a livello mondiale è costante e/o, addirittura, la produzione sta diminuendo rapidamente in molti paesi produttori. Nel bacino del Mediterraneo la produzione diminuisce a causa dell'aumento del tenore di vita che provoca un aumento del costo del lavoro (Sabatino, et al., 2011).

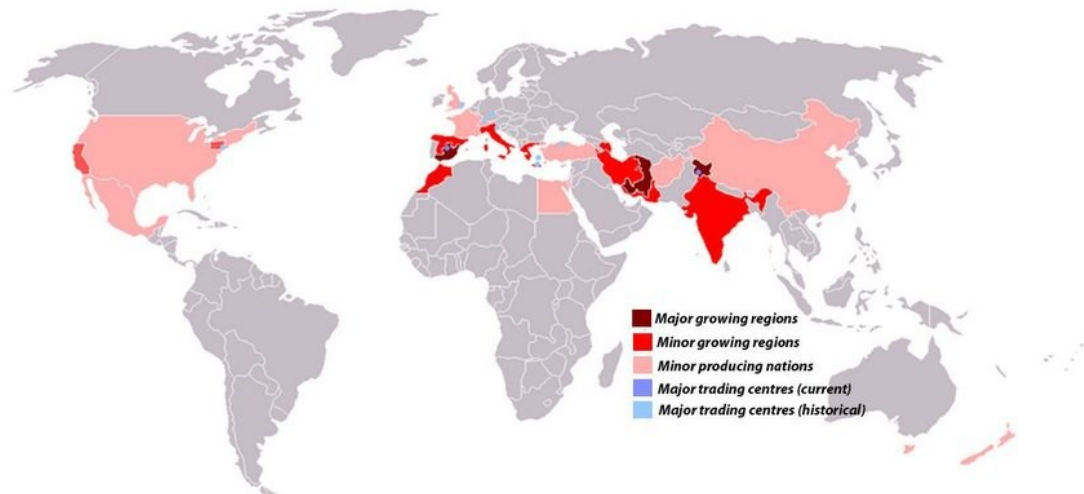


Figura 1-1: Regioni di produzione dello zafferano con le relative nazioni con maggiore e minore influenza nella produzione e sono evidenziati anche i centri di vendita (<https://www.researchgate.net>)

1.1.1 Scheda botanica *C. sativus*



Figura 1-2: Fioritura dello zafferano (*C. sativus* L.) (<https://www.rivistadiagraria.org>)

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Regno	<i>Plantae</i>
Divisione	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Ordine	<i>Asparagales</i>
Famiglia	<i>Iridaceae</i>
Genere	<i>Crocus</i>
Specie	<i>C. sativus</i>

Nomenclatura binomiale *Crocus sativus* L.

Crocus sativus L. deriva dalla mutazione di *Crocus cartwrightianus*, specie originaria dell'isola di Creta. La differenziazione della specie *sativus* deriva dalla selezione artificiale; lo scopo è quello di ottenere piante caratterizzate da stimmi allungati e di maggiori dimensioni. Però, si ottenne una specie sterile incapace di produrre semi e quindi, moltiplicabile solo per via vegetativa, la riproduzione e la diffusione di questa specie è vincolata all'uomo.

È un' pianta perenne, triploide, con fiori viola intenso e costituiti da sei petali, uno stelo di tre rami, che può raggiungere i 10-25 cm di altezza, presenta foglie strette (5 mm) e lunghe (30-35 cm) e si riproduce attraverso bulbi di diametro variabile (3-5 cm); i bulbi sono ricoperti da tuniche fibrose dalle quali poi emergeranno i diversi organi della pianta. Il fiore, insieme ai petali, presenta tre antere gialle dalle quali si producono il polline. La porzione femminile del

fiore è costituita dall'ovario e da un lungo stilo giallo chiaro che origina, a seguito di divisione, tre stimmi di colore rosso carminio. Sono proprio gli stimmi ad essere utilizzati nei diversi settori. (Sabatino, et al., 2011; Bosmali, et al., 2017; Jiang, et al., 2014; Agostinucci, 2009).

È una specie che ha bisogno di una stasi vegetativa durante l'estate. A inizio estate, maggio, la porzione epigea della pianta inizia a seccarsi così che poi nel mese successivo i bulbi inizieranno ad assimilare il materiale di riserva, per tutto il periodo estivo. Ad inizio autunno, con le prime piogge, le gemme dei bulbi inizieranno a riattivarsi, a fronte dell'interruzione della stasi vegetativa. Ad ottobre si ha l'emissione delle foglie dalle tuniche di protezione, poi, trascorsi 10-20 giorni inizieranno a comparire i primi fiori (1-3 fiori per getto). Il periodo di fioritura ha una durata di circa due settimane. Durante l'inverno l'attività vegetativa rallenta per poi riprendere durante la primavera con la produzione di bulbilli (Agostinucci, 2009).

Per avere la massima produzione, lo zafferano necessiterebbe di due periodi di precipitazioni; uno in primavera così che ci sia la produzione di bulbi e l'altro a fine estate così che ci sia la produzione di fiori. L'intervallo ottimale di precipitazioni annue si aggira intorno ai valori 800-900 mm, ma data la sua adattabilità riesce a crescere anche, ad esempio, in regioni della Spagna dove le precipitazioni annue sono pari a 400 mm o all'estremo opposto in Kashmir dove si può arrivare a valori di 1500 mm di pioggia (Agostinucci, 2009).

In tabella (Tab 1-1) si riportano i valori nutrizionali e la composizione di *C. sativus*, espressi in 100 g.

Tabella 1-1: Valori nutrizionali e composizione chimica dello zafferano (espressi in 100 g). Fonte FDA

Nome	Quantità	Unità di misura
<i>Acqua</i>	11,9	g
<i>Energia</i>	310	Kcal
<i>Energia</i>	1298	KJ
<i>Proteine</i>	11,43	g
<i>Totale lipidi (grassi)</i>	5,85	g
<i>Ceneri</i>	5,45	g
<i>Carboidrati, da differenza</i>	65,37	g
<i>Fibra, totale dieta</i>	3,9	g
<i>Calcio, Ca</i>	111	mg
<i>Ferro, Fe</i>	11,1	mg
<i>Magnesio, Mg</i>	264	mg
<i>Fosforo, P</i>	252	mg
<i>Potassio, K</i>	1724	mg
<i>Sodio, Na</i>	148	mg
<i>Zinco, Zn</i>	1,09	mg
<i>Rame, Cu</i>	0,33	mg
<i>Manganese, Mn</i>	28,41	mg
<i>Selenio, Se</i>	5,6	µg

Nome	Quantità	Unità di misura
<i>Vitamina C, acido ascorbico totale</i>	80,8	mg
<i>Tiamina</i>	0,115	mg
<i>Riboflavina</i>	0,267	mg
<i>Niacina</i>	1,46	mg
<i>Vitamina B-6</i>	1,01	mg
<i>Folato, totale</i>	93	µg
<i>Acido folico</i>	0	µg
<i>Folato, alimento</i>	93	µg
<i>Folato, DFE</i>	93	µg
<i>Vitamina B-12</i>	0	µg
<i>Vitamina A, RAE</i>	27	µg
<i>Retinolo</i>	0	µg
<i>Vitamina A, IU</i>	530	IU
<i>Vitamina D (D2+D3), IU</i>	0	IU
<i>Vitamina D (D2+D3)</i>	0	µg
<i>Acidi grassi, saturi totali</i>	1,586	g
<i>4:0</i>	0	g
<i>6:0</i>	0	g
<i>8:0</i>	0	g
<i>10:0</i>	0	g
<i>12:0</i>	0	g
<i>14:0</i>	0,006	g
<i>16:0</i>	1,157	g
<i>18:0</i>	0,247	g
<i>Acidi grassi, totali monoinsaturi</i>	0,429	g
<i>16:1</i>	0,003	g
<i>18:1</i>	0,39	g
<i>20:1</i>	0,006	g
<i>22:1</i>	0	g
<i>Acidi grassi, totali polinsaturi</i>	2,067	g
<i>18:2</i>	0,754	g
<i>18:3</i>	1,242	g
<i>18:4</i>	0	g
<i>20:4</i>	0,013	g
<i>20:5 n-3 (EPA)</i>	0	g
<i>22:5 n-3 (DPA)</i>	0,006	g
<i>22:6 n-3 (DHA)</i>	0	g
<i>Acidi grassi, trans totali</i>	0	g
<i>Colesterolo</i>	0	mg

La spezia presa in esame ha la capacità di aggiungere colore ed aroma negli alimenti in cui viene aggiunta. I composti responsabili dei diversi attributi sono (Fig. 1-3):

- Crocine ($C_{44}H_{64}O_{24}$): monoglicosidi e diglicosidi di polienestere. Sono responsabili del colore. A seguito di idrolisi producono glucosio e crocetina, il pigmento colorante.
- Crocetina ($C_{20}H_{24}O_4$): acido carotenoide dicarbossilico; deriva dalla decomposizione della crocina o da un derivato carotenoide. Al contrario dei pigmenti carotenoidi tipici questo risulta essere idrosolubile.
- Picrocrocina ($C_{16}H_{26}O_7$): glicoside monoterpeneo che insieme al picrocrozioide è responsabile della sensazione di amaro.
- Safranale ($C_{10}H_{14}O$): aldeide monoterpeneica; è la principale molecola insieme al cineolo responsabile dell'aroma.

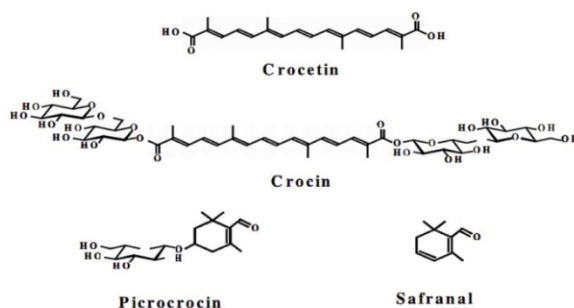


Figura 1-3: Formule chimiche dei principali costituenti responsabili della qualità dello zafferano (Kiani, et al., 2018)

La presenza, ma soprattutto la concentrazione di queste molecole definisce la qualità di *C. sativus L.* (Guijarro-Díez, et al., 2017; Heidarbeigi, et al., 2015; Sabatino, et al., 2011; Kiani, et al., 2018; Schumacher, et al., 2016).

Dal lavoro di (Kiani, et al., 2018) si apprende che le crocine sono approssimativamente il 6-16% della sostanza secca totale ed il loro contenuto dipende dalla varietà, dalle condizioni di coltivazione e dai metodi di trasformazione. La picrocrocina è il secondo componente più abbondante in termini di peso, difatti rappresenta l'1-13%, mentre l'aldeide monoterpeneica, in termini di sostanza secca, rappresenta lo 0,001-0,006%, ma se considerati i composti volatili costituisce il 30-70% del totale.

1.2 Definizione di frodi alimentari

Dal rapporto, di aprile 2011, della Polizia sanitaria si evince che le frodi si suddividono in frodi commerciali e sanitarie. Le prime sono definite come «tutte le azioni fraudolente sugli alimenti o sulle loro confezioni che, pur non determinando concreto o immediato nocumento per la salute pubblica, favoriscono illeciti profitti a danno del consumatore», mentre nel secondo caso «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».

La frode alimentare è suddivisa in:

- Sofisticazione
- Adulterazione
- Alterazione
- Contraffazione

La **sofisticazione** «è un'operazione che consiste nell'aggiungere all'alimento sostanze estranee che ne alterano l'essenza, corrompendo o viziando la composizione naturale e simulandone la genuinità con lo scopo di migliorarne l'aspetto o di coprirne i difetti». Può essere definita sofisticazione il trattamento di una mozzarella con perossido di benzoile per “sbiancarla” oppure aggiungere alle salsicce fresche anidride solforosa per renderle rosse.

L'**adulterazione** «comprende tutte le operazioni che alterano la struttura originale di un alimento mediante sostituzione di elementi propri dell'alimento con altri estranei, ovvero con la sottrazione di elementi propri dell'alimento, o ancora, con l'aumento della quantità proporzionale di uno o più dei suoi componenti. Le adulterazioni hanno riflessi non solo commerciali ma anche igienico-nutrizionali e, in alcuni casi, di grave pericolo per la salute pubblica». Alcuni esempi riportati dal rapporto sono l'aggiunta di metanolo al vino o nel settore lattiero l'aggiunta di acqua o la sottrazione di grasso al latte.

L'**alterazione** riguarda «una sostanza alimentare nella quale si modifica la composizione originaria a causa di fenomeni degenerativi spontanei, determinati da errate modalità o eccessivo prolungamento dei tempi di conservazione». Un esempio è a carico delle uova conservate oltre alla data di scadenza; all'interno di esse e sulle superfici del guscio rotto possono svilupparsi larve di insetto.

La **contraffazione**, invece, «consiste nel formare ex novo un alimento con l'apparenza della genuinità in quanto prodotto con sostanze diverse, per qualità o quantità, da quelle che normalmente concorrono a formarlo». Far passare l'olio di semi per olio di oliva o margarina

che contiene idrocarburi di origine minerale sono esempi di questa categoria di frode (Tirrò, aprile 2011).

Oltreoceano hanno anch'essi definito la frode alimentare come un insieme di pratiche scorrette, all'insaputa del consumatore, con il fine ultimo di portare guadagno economico al venditore. Molto spesso la frode viene vista solo sotto il punto di vista economico quando in realtà sarebbe necessario considerare maggiormente la sicurezza alimentare, gli interventi di protezione e prevenzione e come le organizzazioni rispondono al rischio. Coloro che attuano le adulterazioni si ingegnano in modo tale che possano eludere i sistemi di controllo qualità (CQ) e garanzia di qualità (AQ) al momento esistenti. Solo il criminale conosce l'ingrediente che è manipolato, è l'unico con le informazioni, però non è detto che abbia le competenze per valutare gli eventuali rischi tossicologici e igienici sia per quanto concerne l'acquirente e il consumatore (Moore, et al., 2012).

1.3 Le frodi alimentari più diffuse

Al giorno d'oggi i temi quali autenticità alimentare, genuinità e rilevazione delle adulterazioni sono sempre presenti in un modo o nell'altro nel parlato comune perché i consumatori hanno il diritto di acquistare prodotti sani, adeguati e soprattutto sicuri ed essere in grado di ottenere informazioni accurate e complete (Soffritti, et al., 2016; Petrakis, et al., 2015). Tutto questo, è particolarmente rilevante per prevenire problemi di salute, morali e influire in modo corretto sul valore commerciale degli alimenti soprattutto quando gli ingredienti non sono dichiarati o ne sono stati aggiunti, di meno preziosi, con l'inganno come agenti di carica. In etichetta, idealmente, sono elencati gli ingredienti effettivamente presenti nel prodotto acquistato ma a volte questo requisito non è soddisfatto. Le descrizioni errate, fraudolente sono con il passare del tempo sempre più comuni; evidenze date da diversi rapporti riguardo carne, caffè, pesce, integratori alimentari e alimenti trasformati ma soprattutto quelli con il prezzo maggiorato; un esempio di quest'ultima categoria sono i prodotti biologici. Gli alimenti venduti al dettaglio sono oggetto di maggiore controllo perché molto spesso capita la sostituzione di ingredienti con qualità inferiore nelle materie prime o nei prodotti trasformati (Torelli, et al., 2014). Con la globalizzazione e con la crescita delle conoscenze scientifiche emergono sempre più rischi lungo la filiera alimentare; si parte dalla produzione, si passa per la trasformazione, distribuzione fino alla vendita dei prodotti alimentari; tutti questi passaggi sono a rischio frode per scopo economico. A questo proposito l'industria, i governi e le organizzazioni che stabiliscono gli standard sono particolarmente preoccupate di questa pratica (Moore, et al., 2012; Sereshti, et al., 2014).

Tra i diversi scandali emersi nel tempo si ricorda il latte con melamina nel 2007/2008 dove i criminali si sono concentrati in modo tale che potessero ingannare le analisi dell'azoto totale delle proteine. Tutto ciò per un riscontro economico a discapito della sicurezza degli ingredienti fraudolenti. Difatti, il profilo tossicologico della melamina e i suoi derivati non sono stati pienamente compresi fino a quando non è stato troppo tardi. Prima del 2007 la melamina non era considerata un potenziale contaminante o adulterante perché non era inclusa nelle analisi di routine di controllo qualità e garanzia della qualità. Altri esempi riguardano l'aggiunta di glicerolo agli sciroppi liquidi proprio per le sue caratteristiche visive e organolettiche che rende difficile la differenziazione da quest'ultimi. A volte, il glicerolo stesso è stato sostituito con il glicole di etilenico e come ben si può intuire ha avuto un grande impatto sulla sicurezza pubblica proprio per le conseguenze mortali (Moore, et al., 2012).

Nel 1986 in Italia venne alla luce uno scandalo con risvolti negativi per i connazionali: lo scandalo del metanolo nel vino italiano. Causò l'avvelenamento e l'intossicazione di parecchie decine di persone e in 23 decessi. Lo scopo finale era quello di innalzare il grado alcolico di vini a bassa gradazione o annacquati (Rai, 2016; Moore, et al., 2012).

Altre frodi sono a carico del pesce: pesce venduto per fresco quando invece è stato scongelato, vendita di prodotti di allevamento per prodotti di cattura, vendita di specie diverse da quelle dichiarate in etichetta, vendita di prodotti congelati ricoperti da glassatura senza l'indicazione del peso netto o della percentuale di glassatura o anche la vendita di prodotti trattati con additivi per mascherare un preesistente stato di alterazione della materia prima. Da non tralasciare anche le azioni a carico dell'olio di oliva in cui vengono aggiunti oli di altri semi, ultimamente di nocciola o oli deodorati, ma si è arrivati addirittura ad aggiungere clorofilla e β -carotenoidi per rendere il prodotto il più possibile identico all'originale.

Anche il settore lattiero caseario non sfugge a queste azioni a discapito dei consumatori, difatti è nota l'attività di utilizzo di latte in polvere ad uso zootecnico o caseine industriali magre per la produzione di mozzarelle. Il settore cerealicolo subisce danni per l'utilizzo di sfarinati provenienti da paesi differenti da quelli riportati in etichetta; il settore della carne è colpito per l'uso di sostanze proibite per l'ingrasso degli animali (ormoni, stilbenici...) con effetto sulla perdita di umidità durante la cottura, il che provoca una diminuzione del volume del pezzo di carne (Barani, Ciclo XXIII di dottorato).

Nella banca dati costruita da Moore (Moore, et al., 2012) sono riportati differenti casi di frode, quali la sostituzione dell'anice stellato cinese (*Illicium verum* Hook f.) con l'anice giapponese (*Illicium anisatum* L.); quest'ultimo non idoneo al consumo umano perché contiene sesquiterpeni altamente tossici. L'articolo cita la sostituzione della curcuma con il

cromato di piombo o il tetrossido di piombo come sostituto della paprika o anche l'uso di coloranti rossi Sudan dannosi in spezie come il peperoncino in polvere, la presenza della diossina nella carne a causa dell'utilizzo di mangimi con i policlorobifenili (PCB) è un altro esempio.

«L'Italia nel 2019 si è confermata essere tra i paesi nel mondo a effettuare numerosi controlli con il fine di garantire la qualità, a contrastare le frodi e a prevenire i crimini agroalimentari in modo tale da assicurare ai cittadini prodotti alimentari sani e sicuri». Questi sono concetti espressi dalla Ministra Teresa Bellanova durante l'esposizione al Parlamento delle linee programmatiche del MIPAAF (ICQRF, 2019).

Nel documento redatto dal Capo dell'Ispettorato Stefano Vaccari (ICQRF, 2019) sono riportati in dettaglio le attività portate avanti dal dipartimento contro le frodi, usurpazioni, fenomeni di *Italian sounding* e le contraffazioni a carico del *Made in Italy* oltre alla criminalità agroalimentare. Si riporta: «i risultati operativi del 2019 confermano la qualità del sistema controlli italiano e il posizionamento dell'ICQRF tra le principali Autorità antifrode nel *food* a livello mondiale. I controlli antifrode sono stati 55539, di cui 41462 ispettivi e 14077 analitici. Gli operatori ispezionati sono stati 27683 e i prodotti controllati 51289. Le irregolarità hanno riguardato il 17,5% degli operatori, l'11,4% dei prodotti e il 10% dei campioni analizzati sono risultati irregolari». Il risultato complessivo dei controlli effettuati durante tutto l'anno 2019 è stato di circa 72 milioni di kg di merce sequestrata per un valore di oltre 301 milioni di €.

Tabella 1-2: Controlli effettuati nell'anno 2019 dall'ICQRF

Comparti agroalimentari	Numero controlli
<i>Settore vitivinicolo</i>	18179
<i>Settore oleario</i>	6875
<i>Settore lattiero caseario</i>	5434
<i>Settore ortofrutticolo</i>	4117
<i>Settore delle conserve vegetali</i>	3542
<i>Settore dei cereali e derivati</i>	2831
<i>Settore della carne</i>	2588
<i>Settore del miele</i>	1180
<i>Settore delle uova</i>	596
<i>Settore delle bevande spiritose</i>	517
<i>Settore delle sostanze zuccherine</i>	391
<i>Altri settori</i>	2765

«L'ICQRF è l'Autorità sanzionatoria per le violazioni nell'agroalimentare, anche contestate da altre Autorità di controllo. In particolare, è l'Autorità competente ad irrogare le

sanzioni per violazioni amministrative in materia di: etichettatura dei prodotti alimentari, produzione e denominazione d'origine e ad indicazione geografica protetta (DOP e IGP), vino e prodotti vitivinicoli, produzioni da agricoltura biologica, Organismi Geneticamente Modificati, sementi e materiale di propagazione vegetale, mangimi e materie prime per i mangimi».

Tra gli “altri settori” ricade anche quello dello zafferano proprio perché nella categoria si fa riferimento a: prodotti dolciari, prodotti ittici, birre, aceti, spezie, bevande nervine, additivi, acque minerali e bevande analcoliche.

C. sativus è soprattutto danneggiato per «usurpazione o evocazione delle denominazioni di origine» (ICQRF, 2019).

La conferma di pratiche fraudolente si ha anche da articoli scientifici presenti in letteratura difatti, nei lavori di (Bosmali, et al., 2017) si riporta che lo zafferano è un target attraente sia nei riguardi dell'etichettatura errata sia nelle pratiche di miscelazione con altri materiali estranei perché non è ancora possibile completamente rintracciare queste pratiche con le norme correnti specifiche commerciali ISO e con i metodi di prova adottati (ISO 3632-1; 3632-2); anche perché individuare le adulterazioni con i metodi analitici di routine oltre ad essere difficile sono anche dispendiosi in termini di tempo (Sereshti, et al., 2014).

1.4 Materiali vegetali e sintetici di frequente riscontro in *C. sativus* L.

L'adulterazione si basa sull'utilizzo di materiali vegetali che abbiano un aspetto simile allo zafferano o coloranti sintetici che ricordano il colore tipico di questa spezia; caratteristiche che permettono di vendere il prodotto adulterato allo stesso prezzo dello zafferano puro pur utilizzando prodotti più economici, non tenendo conto, già come espresso nel precedente paragrafo, della sicurezza dei consumatori.

Nelle tabelle 1-3; 1-4 si riportano gli adulteranti di maggiore utilizzo citati in letteratura.

Tabella 1-3: Elenco degli adulteranti vegetali molto spesso utilizzati per adulterare lo zafferano

Adulterante vegetale	Parte anatomica	Riferimenti bibliografici
<i>Arnica montana</i> <i>Arnica</i>	fiori	(Marieschi, et al., 2012; Torelli, et al., 2014; Schumacher, et al., 2016)
<i>Beta vulgaris</i> <i>Barbabietola</i>	radice	(Heidarbeigi, et al., 2015)
<i>Bixa orrellana</i> <i>Annatto</i>	semi macinati	(Marieschi, et al., 2012; Torelli, et al., 2014)
<i>Buddleja officinalis Maxim</i> <i>Albero delle farfalle</i>	tintura estratta dai fiori	(Shawky, et al., 2020; Heidarbeigi, et al., 2015)
<i>Calendula officinalis L.</i> <i>Calendula</i>	petali foglie	(Shawky, et al., 2020; Bosmali, et al., 2017; Heidarbeigi, et al., 2015; Marieschi, et al., 2012; Jiang, et al., 2014; Torelli, et al., 2014; Soffritti, et al., 2016; Schumacher, et al., 2016)
<i>Capsicum annum</i> <i>Peperone (paprika)</i>	frutto	(Shawky, et al., 2020)
<i>Carthamus tinctorius L.</i> <i>Cartamo</i>	petali semi	(Shawky, et al., 2020; Bosmali, et al., 2017; Ordoudi, et al., 2007; Heidarbeigi, et al., 2015; Marieschi, et al., 2012; Jiang, et al., 2014; Torelli, et al., 2014; Soffritti, et al., 2016; Petrakis, et al., 2015; Sereshti, et al., 2018)
<i>Crocus sativus</i> <i>Zafferano</i>	stami tagliati o tinti	(Ordoudi, et al., 2007; Soffritti, et al., 2016; Petrakis, et al., 2015)
<i>Crocus vernus</i> <i>Zafferano maggiore</i>	stimmi	(Marieschi, et al., 2012; Torelli, et al., 2014)

Adulterante vegetale	Parte anatomica	Riferimenti bibliografici
<i>Curcuma longa</i> <i>Curcuma</i>	rizoma in polvere	(Shawky, et al., 2020; Bosmali, et al., 2017; Marieschi, et al., 2012; Jiang, et al., 2014; Torelli, et al., 2014; Soffritti, et al., 2016; Petrakis, et al., 2015; Sereshti, et al., 2018; Schumacher, et al., 2016)
<i>Daucus carota</i> <i>Carota</i>	radice	(Bosmali, et al., 2017; Ordoudi, et al., 2007; Soffritti, et al., 2016; Guijarro-Díez, et al., 2017; Petrakis, et al., 2015)
<i>Dendranthema morifolium</i> <i>Crisantemo</i>		(Bosmali, et al., 2017)
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis <i>Gardenia</i>	frutto	(Bosmali, et al., 2017; Soffritti, et al., 2016; Carmona, et al., 2006; Petrakis, et al., 2015)
<i>Hemerocallis</i> sp. <i>Giglio</i>	tepali	(Marieschi, et al., 2012; Jiang, et al., 2014; Torelli, et al., 2014)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> <i>Ibisco</i>	calice	(Shawky, et al., 2020; Bosmali, et al., 2017; Marieschi, et al., 2012; Jiang, et al., 2014; Torelli, et al., 2014; Soffritti, et al., 2016; Petrakis, et al., 2015; Sereshti, et al., 2018; Schumacher, et al., 2016)
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn <i>Fiore di loto</i>	stigmi	(Bosmali, et al., 2017; Jiang, et al., 2014)
<i>Punica granatum</i> <i>Melograno</i>	buccia	(Shawky, et al., 2020)
<i>Rhus coriaria</i> <i>Sommacco siciliano</i>		(Sereshti, et al., 2018)
<i>Rubia tinctorius</i> <i>Robbia</i>		(Sereshti, et al., 2018)
<i>Zea mays</i> <i>Mais</i>	stigmi	(Bosmali, et al., 2017; Jiang, et al., 2014)

Tabella 1-4: Elenco delle varie sostanze utilizzate come adulteranti nello zafferano

Altri adulteranti	Riferimenti bibliografici
<i>Acido carminico</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Amaranto</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Arancio II</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Azorubina</i>	(Sereshti, et al., 2018)
<i>Carta colorata con colorante</i>	(Schumacher, et al., 2016)
<i>Chinolina</i>	(Sereshti, et al., 2018; Ordoudi, et al., 2007)
<i>Eritrosina</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Fibre di legno di sandalo</i>	(Schumacher, et al., 2016)
<i>Fibre di seta tinte di rosso</i>	(Heidarbeigi, et al., 2015)
<i>Fibre di zafferano immerse in glicerolo</i>	(Heidarbeigi, et al., 2015)
<i>Fibre di zafferano immerse in miele</i>	(Heidarbeigi, et al., 2015)
<i>Fibre vegetali</i>	(Heidarbeigi, et al., 2015)
<i>Giallo 2G</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Giallo di nitrantrone 2G</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Giallo tramonto</i>	(Sereshti, et al., 2018; Ordoudi, et al., 2007)
<i>Pouceau 4R</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Rocellina</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Rosso 2G</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Rosso Allura</i>	(Sereshti, et al., 2018; Ordoudi, et al., 2007)
<i>Rosso cocciniglia</i>	(Torelli, et al., 2014)
<i>Sudan I</i>	(Ordoudi, et al., 2007)
<i>Sudan II</i>	(Sereshti, et al., 2018)
<i>Tartrazina</i>	(Sereshti, et al., 2018; Ordoudi, et al., 2007; Schumacher, et al., 2016)

Capitolo 2

OBIETTIVO DELLA TESI, MATERIALE E METODI

2.1 Obiettivo della tesi

Il presente lavoro mira a fornire una panoramica delle metodologie scientifiche attualmente utilizzate per definire l'autenticità di *C. sativus*, individuare e/o determinare se sono occorse eventuali adulterazioni in prodotti commerciali trasformati ma anche nella spezia tal quale. Si è anche cercato di comprendere se c'è la possibilità di poter adottare altri metodi, non ancora validati, che possano essere in grado di affiancare o addirittura sostituire i metodi in uso ad oggi per i loro risvolti positivi nel rilevare eventuali attività fraudolente.

2.2 Fonti dei dati

I dati, presi in esame nel presente studio, derivano da ricerche bibliografiche nei motori di ricerca scientifici quali Scopus, Google Scholar, Sciencedirect e ricerche nel web di siti e documenti attendibili quali il report dell'ICQRF (Ispettorato centrale della tutela della qualità e della repressione frodi), MIPAAF, dei NAS e dalla "rivista Agraria *on-line*". Le pubblicazioni reperite ricadono nell'intervallo di tempo 2006-2020. La maggior parte degli articoli derivano dalla ricerca in Scopus e Sciencedirect. Le parole chiave inserite, in tutti i motori di ricerca di cui mi sono avvalsa, sono "*saffron adulteration*" e "*saffron fraud*". In Scopus risultano 79 articoli per "*saffron adulteration*", mentre 28 per "*saffron fraud*", mentre in Sciencedirect 575 e 231, rispettivamente. Nel presente elaborato, sono citati 19 articoli, i più pertinenti al caso studio. In realtà, non tutte le pubblicazioni impiegate provengono dalle parole chiave sopra citate perché alcune di esse sono state reperite all'interno di articoli, come citazioni.

Durante le ricerche non è stato possibile consultare alcuni articoli scientifici o la normativa attuale con oggetto *C. sativus*, la ISO 3632-1:2011; 3632-2:2011, per mancanza di autorizzazioni d'accesso. Per ovviare a questi limiti si è cercato di porre rimedio consultando la normativa meno recente (ISO 3632-2:2010) e cercando articoli che si avvicinassero il più possibile all'argomento preso in esame. Anche così facendo non è stato possibile affrontare in modo dettagliato alcune metodiche.

2.3 Metodi analitici sfruttati per l'individuazione di adulterazioni negli alimenti

Sono state sviluppate diverse metodologie, alcune direttamente utilizzate per *C. sativus*. Queste permettono l'individuazione di frodi; rendono più difficile l'operato di coloro che sfruttano questa pratica, soprattutto per fini economici, senza tener presente dei rischi che potrebbero causare nei consumatori, a seguito dell'ingestione di particolari sostanze.

Il gruppo di ricerca (Moore, et al., 2012) ha riportato sotto forma di grafico, Fig. 2-1, i diversi approcci strumentali, i più comuni, per la rilevazione analitica di sostanze estranee in campo alimentare. Questi, potrebbero essere utili alle strutture che si occupano della garanzia di qualità (AQ) per future esigenze di monitoraggio di frodi alimentari. La gas cromatografia (GC) e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sono già ampiamente sfruttate mentre la spettrometria di massa (MS) e la spettrometria di massa isotopica (IRMS) non sono così comuni, ma grazie alla potenza dimostrata e all'uso crescente della spettrometria di massa possono diventare di routine.

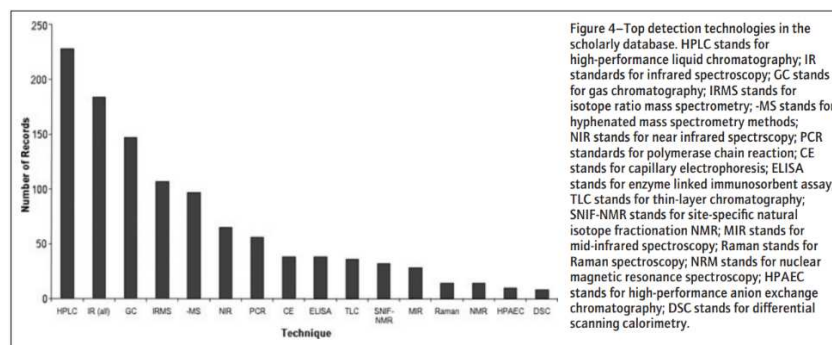


Figura 2-1: I 16 approcci strumentali più comuni per la determinazione di adulterazioni nei prodotti alimentari (Moore, et al., 2012)

Anche (Kiani, et al., 2018) riassume le tecniche impiegate negli ultimi tempi e la loro finalità nelle figure 2-1.

Method	Objective	Reference (s)
UV-Vis	Detection of artificial red colorants in saffron	Ordoudi and Tsimidou, 2004
	Influence of corm provenance and environmental condition on yield and apocarotenoid profiles in saffron	Siracusa et al., 2010
	Detection of artificial colors in saffron	Zalacain et al., 2010
	Evaluation of saffron adulteration	Sabatinoa et al., 2011
	Rapid determination of Safranal in the quality control of saffron spice (based on non-polar solvent extraction)	Maggi et al., 2011a
	Geographical origin differentiation of saffron spice	Maggi et al., 2011b
	Characteristics of Picrocrocin, Safranal and Crocins	Jouki et al., 2012
	Influence of drying conditions on Crocins, Picrocrocin and Safranal contents	Cossignani et al., 2014
	Quality assessment of the saffron samples (quantitative analysis of synthetic colorants in adulterated saffron)	Masoum et al., 2015
	Near Infrared spectroscopy (NIR)	Saffron quality control and safety characterization
Mid-infrared spectroscopy (MIR)	Determination of chemical composition and geographical origin	Zalacain et al., 2005b
	Differentiation of saffron from four countries	Anastasaki et al., 2010
NMR	Quality control of traded saffron that suffers various types of fraud	Ordoudi et al., 2014
	Structural characterizations of saffron derivatives	Pfister et al., 1996;
		Straubinger et al., 1998
	To analyze Italian protected designation of origin	Cagliani et al., 2014
	To characterize saffron samples of different geographical origin	Sobolev et al., 2014
	Quality control of saffron by prediction length of storage after its harvest.	Ordoudi et al., 2015
	Evaluation of saffron adulteration with plant adulterants	Petrakis et al., 2015
	Identification and quantification of Sudan dyes in adulterated saffron	Petrakis et al., 2017
	Assessing saffron adulteration with plant-derived adulterants	Petrakis and Polissiou, 2017
	Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS)	
Method	Objective	Reference (s)
LC	Analysis of saffron components	Lozano et al., 2000; Verma and Middha, 2010
HPLC	Exploiting saffron metabolome for determining its authenticity	Rubert et al., 2016
	Analysis of the saffron metabolites: Crocins, Picrocrocin and Safranal for the determination of the spice quality	Sujata et al., 1992
	Determination of saffron components in crude plant	Tarantilis et al., 1995
	Saffron components and its purity	Lozano et al., 1999
	Separation of several ingredients from alcoholic extracts of four different saffron types.	Caballero-Ortega et al., 2004
	Quantification of major active components from 11 different saffron samples	Caballero-Ortega et al., 2007
	Quantify the most important saffron components: Crocins, Picrocrocin, and Safranal,	Lage and Cantrell, 2009
	Influence of corm provenance and environmental condition on yield and apocarotenoid profiles in saffron	Siracusa et al., 2010
	Effects of altitude on anatomy and concentration of Crocins, Picrocrocin and Safranal	Zarinkamar et al., 2011
	Evaluation of Saffron (<i>Crocus sativus L.</i>) Adulteration	Sabatinoa et al., 2011
LC-MS	Identification of saffron from saffron raw material	Sheikh et al., 2013
	Analysis of bioactive constituents of saffron	Chaharlangi et al., 2015
	Geographical classification of Italian saffron based on chemical constituents	D'Archivio et al., 2016
	Detection of chemicals attributing color, flavor, taste and medicinal properties to saffron	Verma and Middha, 2009
	Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters	Goupy et al., 2013
	In tepals of saffron	
	Detection of saffron adulteration with gardenia extracts through the determination of geniposide	Guijarro-Diez et al., 2017a
	Analysis of the saffron metabolites: Crocins, Crocetins, Picrocrocin and Safranal for the determination of the quality for the spice	Sujata et al., 1992
	Quantitative analysis of Picrocrocin and Crocetins of saffron	Corti et al., 1996;
		Ahmad Pathan et al., 2009
GC	Discrimination of saffron based on its origin	Djozan et al., 2014
	Analysis of the saffron metabolites: Crocins, Crocetins, Picrocrocin and Safranal for the determination of the spice quality	Sujata et al., 1992
	Composition of Crocins and Picrocrocin from Spanish saffron	Alonso et al., 2001
	To relate volatile content to origin and post-harvest processing	Carmona et al., 2006
	Characterization of aroma active compounds of Spanish saffron	Cullere et al., 2011
	Classification of gas chromatographic fingerprints of saffron	Aliakbarzadeh et al., 2016
	Saffron quality evaluation by sensory profile	Narasimhan et al., 1992;
		Tarantilis and Polissiou, 1997
	Determining the authenticity of saffron aroma	Alonso et al., 1998
	Analysis of volatile organic compounds from saffron	D'Auria et al., 2004
GC-MS	Characterization of volatile components of Iranian saffron	Jalali-Heravi et al., 2009
	Identification of changes in saffron volatile profile according to its storage time	Maggi et al., 2010
	Determination of volatile components of saffron	Sereshti et al., 2014
	Characterization of the most aroma-active components in a representative aromatic extract from Iranian saffron	Amanpour et al., 2015

Figure 2-1: Recenti applicazioni della spettroscopia e cromatografia per la valutazione della qualità dello zafferano. Le tecniche spettroscopiche in alto e in basso le tecniche cromatografiche (Kiani, et al., 2018)

Ciò che è importante è la necessità di poter utilizzare il test analitico più adatto ad individuare una determinata tipologia di adulterazione. Esistono due strategie analitiche per rilevare l'adulterazione. La prima, il test per l'assenza di specifici adulteranti, è l'approccio più comunemente usato, ma ha un limite critico: non riesce a rilevare, per sua natura, i diversi adulteranti che non siano quelli che specificatamente si stanno ricercando. Eccelle, però, nel

caso di concentrazioni molto basse. L'altra strategia, la strategia compendiarica, verifica in modo specifico l'identità, l'autenticità e la purezza dell'ingrediente che dovrebbe o meno essere presente con la relativa concentrazione. Il vantaggio di questa strategia riguarda la capacità di poter rilevare sia gli adulteranti noti che sconosciuti, ma è in grado di rilevare solo concentrazioni relativamente alte (Moore, et al., 2012).

Lo sviluppo del database proposto da (Moore, et al., 2012) e i suoi successivi aggiornamenti prevedono, per la maggior parte, test basati su approcci compendiali perché è importante individuare l'adulterante e scoraggiare le possibili frodi alimentari. Dal 2012, l'anno di pubblicazione dell'articolo, nel sito accessibile a tutti (www.foodfraud.org) risultavano 1305 *records*; ad oggi, sempre in continuo aumento, si è arrivati a circa 12100 *records*. La banca dati si basa su studi, media e rapporti disponibili al pubblico.

2.4 Metodi analitici sfruttati per la determinazione di autenticità di *Crocus sativus* ed individuazione dei suoi adulteranti

In tabella 2-1 sono elencati i metodi analitici, citati in letteratura, riconosciuti dalla norma ISO e altri che sono ancora in fase di sperimentazione, che permettono di autenticare e/o identificare eventuali adulterazioni con prodotti vegetali o coloranti sintetici.

Tabella 2-1: Metodi analitici utilizzati per la definizione di autenticità dello zafferano e determinazione di eventuali frodi

Metodi analitici	Bibliografia
<i>Spettrofotometria UV-Vis</i>	(Shawky, et al., 2020; Sereshti, et al., 2018; Ordoudi, et al., 2007; Kiani, et al., 2018)
<i>TLC</i>	(Sereshti, et al., 2014)
<i>HPLC - PDA</i>	(Shawky, et al., 2020; Sereshti, et al., 2018;
<i>HPLC-ESI-MS</i>	Ordoudi, et al., 2007; Kiani, et al., 2018;
<i>HPLC-DAD-MS</i>	Carmona, et al., 2006)
<i>Spettroscopia IR</i>	(Shawky, et al., 2020; Sereshti, et al., 2018;
<i>Spettroscopia MIR</i>	Ordoudi, et al., 2007; Kiani, et al., 2018;
<i>Spettroscopia NIR</i>	Sabatino, et al., 2011)
<i>Spettroscopia FT-NIR</i>	
<i>Spettroscopia Raman</i>	(Sereshti, et al., 2014)

Metodi analitici	Bibliografia
<i>Naso elettronico</i>	(Heidarbeigi, et al., 2015)
<i>Lingua elettronica</i>	(Kiani, et al., 2018)
<i>Mucosa elettronica</i>	(Kiani, et al., 2018)
<i>Metodi molecolari</i>	(Soffritti, et al., 2016; Torelli, et al., 2014; Bosmali, et al., 2017; Marieschi, et al., 2012; Jiang, et al., 2014)
<i>GC</i>	(Sereshti, et al., 2014)
<i>HS-GC</i>	(Morozzi, et al., 2019)
<i>H-NMR</i>	(Pettrakis, et al., 2015; Schumacher, et al., 2016; Sereshti, et al., 2014)
<i>LC</i>	(Guijarro-Díez, et al., 2017; Carmona, et al., 2006)
<i>PTR-MS</i>	(Kiani, et al., 2018)

La spettrofotometria **UV-Vis** è utile per rilevare le adulterazioni comuni, ma sono necessarie concentrazioni relativamente alte per essere rilevate (>200 mg). Nei successivi sottoparagrafi si approfondirà la questione.

L'**IR** è una tecnica ampiamente utilizzata in ambiti differenti dal settore alimentare, ma sta iniziando a prendere campo anche in questa area poiché le analisi sono rapide e non distruttive. La spettroscopia **NIR** è utile per il controllo qualitativo, non è ancora molto utilizzata, mentre la **spettroscopia FT-NIR** è utilizzata insieme alla micro-spettroscopia ad immagini solo per determinare la presenza di cartamo (Shawky, et al., 2020).

Anche se diversi autori hanno proposto metodi analitici, ad esempio la cromatografia liquida, per rilevare in modo simultaneo nello zafferano i composti responsabili del colore, crocettina, l'amaro, picrocrocina, e l'aroma, safranale, nello studio di (Carmona, et al., 2006) si apprende che non sono possibili le estrazioni con una singola polarità e con un'unica tecnica capace di rilevarle. L'aldeide tipica, il safranale, e gli altri volatili dello zafferano dovrebbero essere estratti con solventi non polari e analizzati attraverso la gascromatografia; i derivati della picrocrocina dovrebbero essere analizzati con la cromatografia controcorrente, comunque la

forma acida della picrocrocina viene identificata nello zafferano quando si identificano gli esteri della crocetina prodotti dalla cromatografia a fase inversa (Carmona, et al., 2006).

2.4.1 Normativa ISO 3632

L'ISO (Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione) è una federazione mondiale di organismi di normazione nazionali il cui lavoro è di preparare delle norme internazionali grazie ai comitati tecnici dell'ISO. Ai lavori partecipano anche organizzazioni internazionali, governative e non governative, in collegamento con l'ISO stessa.

La norma relativa allo zafferano è la ISO 3632-1 e 3632-2, prodotte dal Comitato Tecnico ISO/TC 34, “Prodotti alimentari, Sottocommissione SC 7, Spezie, erbe culinarie e condimenti”. Nel corso del tempo è stata sottoposta a diverse revisioni, attualmente l'ultima è del 2011; sostituisce la normativa redatta nel 2010 che a sua volta ha sostituito la ISO 3632:2003 (ISO, 2010).

La ISO 3632-1 definisce la qualità dello zafferano in funzione a diversi principi così che vi siano raggruppamenti definiti categorie. Le categorie, tre, sono basate su parametri chimico-fisici caratteristici di questa spezia. I criteri considerati, come riporta (Sabatino, et al., 2011) sono il contenuto di umidità, i residui di fiori e di materiale estraneo, il contenuto in ceneri, le sostanze solubili e il potere colorante; questi, sono influenzati da elementi esterni quali assenza di altre parti di piante, assenza di flora microbica e residui di pesticidi; riportati in fig.2-2 i parametri presenti nel lavoro sopra citato.

Characteristics	Specifications			Test method
	Categories			
	I	II	III	
Moisture and volatile matter, % (w/w), max.	12 ^a 10 ^b	12 ^a 10 ^b	12 ^a 10 ^b	ISO/TS 3632-2:2003, Clause 7
Total ash, % (w/w), on dry basis, max.	8	8	8	ISO 928:1997, Clause 8, and ISO/TS 3632-2:2003, Clause 12
Acid-insoluble ash, % (w/w), on dry basis, max.	1	1	1.5	ISO 930:1997, Clause 7, and ISO/TS 3632-2:2003, Clause 13
Bitterness, expressed as direct reading of the absorbance of picrocrocine at about 257 nm, on dry basis, min.	70	55	40	ISO/TS 3632-2:2003, Clause 14
Safranal, expressed as direct reading of the absorbance at about 330 nm, on dry wt basis				ISO/TS 3632-2:2003, Clause 14
min.	20	20	20	
max.	50	50	50	
Coloring strength, expressed as direct reading of the absorbance of crocine at about 440 nm, on dry wt basis, min.	190	150	100	ISO/TS 3632-2:2003, Clause 14
Artificial water soluble acid colorants	Absent	Absent	Absent	ISO/TS 3632-2:2003, Clause 16 and/or Clause 17

^afilaments; ^b powder.

Figura 2-2: Caratteristiche analizzate e categorizzazione di *C. sativus* secondo la ISO/TS 3632:2011 (ISO, 2011)

La ISO 3632-2 (ISO, 2010), titolo generale “Spezie - Zafferano (*Crocus sativus* L.)”, è composta da due parti:

- Parte 1: Specifiche
- Parte 2: Metodi di prova

All'interno della Parte 2 sono individuati diversi paragrafi che fanno riferimento:

1. Scopo
2. Normative di riferimento
3. Termini e definizioni
4. Test e dimensione dei campioni
5. Test identificativi
6. Esame microscopico dello zafferano
7. Determinazione del contenuto di umidità e di sostanze volatili
8. Determinazione del contenuto di rifiuti floreali di zafferano nei filamenti e nei filamenti tagliati

9. Determinazione del contenuto di sostanze estranee dello zafferano nei filamenti e nei filamenti tagliati
10. Frantumazione e setacciatura dei campioni per le prove descritte in particolari clausole (6, 14, 15 e 16)
11. Determinazione dell'estratto solubile in acqua fredda
12. Determinazione delle ceneri totali
13. Determinazione delle ceneri insolubili in soluzione acida
14. Determinazione delle caratteristiche principali con il metodo spettrometrico UV-Vis
15. Rilevamento di coloranti artificiali: identificazione di coloranti acidi sintetici solubili in acqua - Metodo della cromatografia su strato sottile (TLC)
16. Rilevamento di coloranti artificiali: identificazione di coloranti acidi sintetici solubili in acqua - Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)
17. Allegati

In questo capitolo si esamineranno i metodi ufficiali per l'autenticazione e la determinazione di eventuali adulterazioni a carico della spezia in questione. Dallo studio di diversi lavori emerge la questione dell'inadeguatezza dei metodi ufficiali.

A questo punto, si prendono in esame le singole metodiche riportate proprio dalla normativa internazionale ISO 3632-2:2010. L'attenzione sarà focalizzata alle analisi: microscopiche, test colorimetrico, determinazione dei coloranti sintetici.

L'analisi microscopica non presuppone l'utilizzo di strumenti analitici ma si cita poiché permette di definire correttamente se un campione sia o meno zafferano puro, ma ha svantaggi quale la necessità di tempo, personale formato e che sia in grado di dare un giudizio non soggettivo; si prendano in considerazione questi aspetti nei lavori pubblicati da (Marieschi, et al., 2012; Jiang, et al., 2014; Torelli, et al., 2014).

Innanzitutto, è necessario definire l'oggetto di applicazione della normativa. La norma si applica allo zafferano essiccato, ottenuto dal fiore di *C. sativus*. L. in forma tal quale, filamenti e filamenti tagliati, e in polvere.

Si riportano di seguito alcuni dei termini e definizioni, presenti nel testo, cosicché ne sia più semplice la comprensione.

- Forza di colorazione, è dovuta principalmente al contenuto di crocine.
- $A_{1cm}^{1\%}$, 440 nm, è l'assorbanza alla lunghezza d'onda massima (circa 440 nm) delle crocine; per una soluzione di 1 g/100 ml di campione di prova e utilizzo di una cella in quarzo di 1 cm.

- Profilo UV-Vis dell'estratto di zafferano (Fig. 2-3) è lo spettro UV-Vis ottenuto nell'intervallo di lunghezze d'onda tra 200 nm e 700 nm.

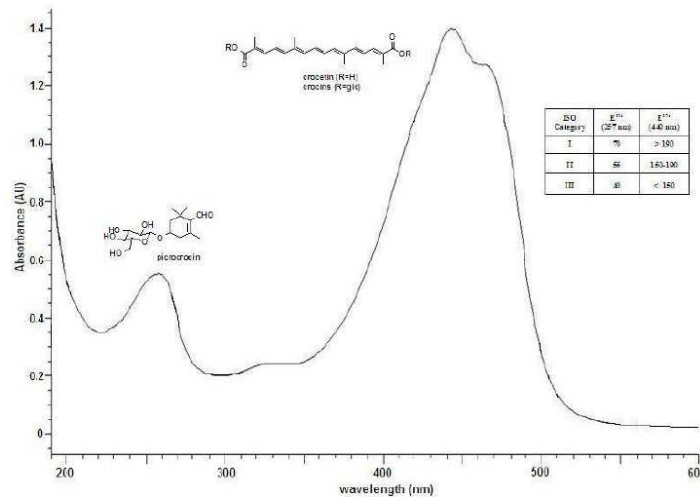


Figura 2-3: Esempio di un profilo UV-Vis di un estratto acquoso di zafferano (ISO, 2010)

La quantità minima di campione utilizzata è di 23 g ($11,5 \text{ g} \times 2$) per i filamenti e per i filamenti tagliati di zafferano, mentre per lo zafferano in polvere è di 13,5 g ($6,75 \text{ g} \times 2$); valori che permettono di effettuare le analisi in duplicato.

Date le quantità di campione ridotte, dovute all'elevato prezzo della matrice alimentare, si consiglia di prelevare la quantità necessaria da un campione omogeneizzato.

I grammi sopra menzionati sono essenziali per l'intera serie di analisi da effettuare a carico della spezia: analisi spettrofotometrica Ultravioletta-Visibile (UV-Vis) e cromatografica per l'identificazione dei coloranti sintetici; su strato sottile (TLC) e cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Per ogni indagine sono necessari 0,5 g di campione; sia per quelli interi che in polvere.

2.4.1.1 *Analisi microscopica o analisi farmacognostica tradizionale*

L'analisi microscopica si applica allo zafferano in stimmi, interi o tagliati, sia in polvere; in tal modo è possibile determinare la presenza di materiale vegetale estraneo e residui floreali associati agli stimmi di *Crocus sativus* L.

Durante l'analisi l'operatore registra in appositi moduli la presenza/assenza degli elementi osservati quali:

1 Stimmi	9 Peli
2 Stili	10 Paglia
3 Granuli di polline	11 Materia inorganica
4 Stami	12 Amido
5 Ovari	13 Materia vegetale esogena
6 Petali	14 Cellule colorate nonostante soluzione illuminante
7 Foglie	15 Anomalie delle cellule
8 Steli	

Per migliorare la rilevazione si utilizzano dei reagenti: soluzione acquosa di iodio in ioduro di potassio e soluzione illuminante costituita da idrossido di sodio o idrossido di potassio ad una concentrazione di 5 g/100 ml di acqua o soluzione acquosa clorata con 80 g/100 ml di acqua. Preparate le soluzioni si procederà con l'osservazione del campione in acqua e nelle due soluzioni preparate (ISO, 2010).

Si può ben capire come questa procedura richieda tempo ed elevati costi; non si può fare a meno di un operatore che esegua le analisi per ogni singolo campione ed è fortemente richiesta esperienza così da limitare la soggettività dei risultati, ma molto importante è anche l'interpretazione corretta (Jiang, et al., 2014; Torelli, et al., 2014).

2.4.1.2 *Determinazione dell'adulterazione di C. sativus con il test colorimetrico*

(Ordoudi, et al., 2007) descrive il test colorimetrico come metodo per l'identificazione delle adulterazioni. Il test prevede l'aggiunta graduale del campione, 0,2 g, ad una soluzione di fenilamina, non colorata. La soluzione di fenilamina è costituita da 0,1 g di fenilamina, 20 ml di acido solforico e 4 ml di acqua. L'aggiunta del campione modifica la colorazione della soluzione a blu e se il campione è zafferano puro, si passa a una colorazione marrone rossastra, mentre l'assenza di cambio colore è indice della presenza di nitrati, di conseguenza riconducibile a materiale estraneo.

2.4.1.3 *Determinazione delle caratteristiche principali con il metodo spettrometrico UV-Vis*

Il metodo spettrofotometrico UV-Vis permette di determinare le principali caratteristiche dello zafferano legate al contenuto di picrocrocina, safranale e crocina. Si applica alle tre diverse forme della spezia, sopra elencate, ma con opportuni accorgimenti per i filamenti interi e tagliati nel momento in cui si effettua la frantumazione e la setacciatura.

Si misura la variazione di densità ottica tra 200 nm e 700 nm di un estratto acquoso di zafferano a temperatura ambiente.

È necessario, affinché le misure siano valide, che vengano rispettate le indicazioni riportate nella normativa ISO. È di seguito elencata l'attrezzatura necessaria, la quantità di campione necessario e il procedimento di analisi.

- Spettrofotometro, adatto per registrare la densità ottica nel range di lunghezze d'onda 200 nm -700 nm UV-Vis
- Cella in quarzo, percorso ottico di 1 cm
- Matracci volumetrici tarati da 200 ml e 1000 ml
- Pipetta da 20 ml
- Membrana di filtrazione, in acetato di cellulosa o in PTFE idrofilo, porosità di 0,45 μm
- Campione, 500 mg in un vetrino da orologio

Trasferire quantitativamente l'aliquota di prova in un matraccio tarato da 1000 ml e aggiungere circa 900 ml di acqua distillata di grado analitico.

Mescolare con un agitatore magnetico (1000 r/min) per 1 ora, al riparo dalla luce. Rimuovere l'agitatore magnetico e portare a segno con acqua distillata. Chiudere con un tappo di vetro e omogeneizzare.

Prendere parte della soluzione con la pipetta da 20 ml e trasferirla in un matraccio tarato da 200 ml, portare a volume con acqua distillata e chiudere con un tappo di vetro e omogeneizzare.

Filtrare la soluzione, rapidamente e al riparo dalla luce, attraverso la membrana di filtrazione in modo da ottenere una soluzione limpida.

Regolare lo spettrofotometro e registrare la variazione di assorbanza, della soluzione filtrata, tra 200 nm e 700 nm, utilizzando acqua distillata come liquido di riferimento.

Un esempio di profilo UV-Vis, ottenuto dall'analisi di un campione di zafferano, è riportato nella Fig.2-3.

I risultati sono la diretta corrispondenza con l'assorbanza ottenuta dalla lettura del campione alle lunghezze d'onda caratteristiche di picrocrocina, safranale e crocine.

$A_{1cm}^{1\%}(257 \text{ nm})$: assorbanza a circa 257 nm (λ_{max} picrocrocina)

$A_{1cm}^{1\%}(330 \text{ nm})$: assorbanza a circa 330 nm (λ_{max} of safranale)

$A_{1cm}^{1\%}(440 \text{ nm})$: assorbanza a circa 440 nm (λ_{max} of crocine)

I risultati vengono espressi prendendo in esame la formula riportata anche nella pubblicazione di (Ordoudi, et al., 2007).

$$A_{1cm}^{1\%}(\lambda_{\text{max}}) = \frac{(D \cdot 100)}{(m \cdot (100 - H))}$$

D= valore dell'assorbanza specifica

m= massa, espressa in g del campione

H= umidità e composti volatili del campione, espressi in % p/p

(Ordoudi, et al., 2007) oltre a svolgere i test colorimetrici ha approfondito l'analisi spettrofotometrica UV-Vis, l'analisi HPLC, l'analisi spettroscopica infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) e l'analisi NMR. Queste si vedranno nei successivi sottoparagrafi.

Il gruppo di ricerca ha lavorato con diverso materiale vegetale:

- Prodotto commerciale etichettato, in arabo, come zafferano.

Si presenta confezionato in una bottiglia di plastica opaca di colore giallo, in polvere (circa 1 g). È stato acquistato in un'erboristeria nel Regno dell'Arabia Saudita, nel 2013. Una volta acquistato è stato consegnato al LFCT (Laboratory Food Chemistry and Technology) e conservato a temperatura ambiente, al buio, fino all'analisi.

- Campioni di zafferano ottenuti da soggetti interessati.

L'autenticità è stata garantita da "Saffron-OMICS". Questi campioni sono utilizzati come materiale di riferimento.

Soffermandosi sulle analisi UV-Vis, gli spettri sono registrati nella regione 200-600 nm grazie ad uno spettrofotometro (Shimadzu UV 1601, Kyoto, Giappone) dotato di celle al quarzo 1x1x4 cm e l'elaborazione dati è affidata al software UVPC 1601 (Personal Spectroscopy Software, v. 3.9, Shimadzu).

Le misure sono in triplice copia per ogni estratto e i campioni per le analisi sono preparati secondo la normativa ISO 3632.

Tabella 2-2: Elenco dei prodotti chimici utilizzati nelle diverse analisi, nelle diverse tecniche, affrontate da Ordoudi et al.

***L'estere di-(β-D-gentiobiosil) di trans-crocetina (estere di crocetina trans-4-GG) è stato isolato in laboratorio attraverso RP-HPLC (HPLC a fase inversa semi-preparativa) e controllato per verificarne la purezza, pari al 97%.**

***L'acqua di altissima purezza è stata prodotta con il sistema SG Ultra Clean Basic UV**

Standard, reagenti e solventi	Venditore dei prodotti chimici/strumentazione
<i>Estere di-(β-D-gentiobiosil) di trans-crocetina (estere di crocetina trans-4-GG)</i>	*
<i>Difenilammina di grado analitico</i>	Schering-Kahlbum A.G. Berlino, Germania
<i>Acetonitrile di grado HPLC</i>	Chem-Lab, Zedelgen, Belgio
<i>Metanolo</i>	Chem-Lab, Zedelgen, Belgio
<i>Acido acetico</i>	Fluka Chemie, Buchs, Svizzera
<i>Acqua di altissima purezza</i>	* SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Germania
<i>Dimetilsolfuro deuterato (DMSO-d₆ 99,96% atomo D)</i>	Euriso-Top Saclay, Francia
<i>Cloroformio</i>	Euriso-Top Saclay, Francia
<i>Altri reagenti tutti di grado analitico</i>	

Dalle analisi sono emerse diverse considerazioni, già dalla valutazione sensoriale intuiscono che non è zafferano, è atipico. La ISO suggerisce di effettuare l'analisi colorimetrica per identificare un'eventuale impurità. I risultati dimostrano che solo il valore della forza colorante soddisfa la classificazione in cat. I. L'ipotesi di adulterazione è altresì confermata dal risultato spettrofotometrico UV-Vis, in particolare nelle regioni $A_{257,330,400\text{ nm}}^{1\%}$. In fig. 2-4 si riporta lo spettro UV-Vis.

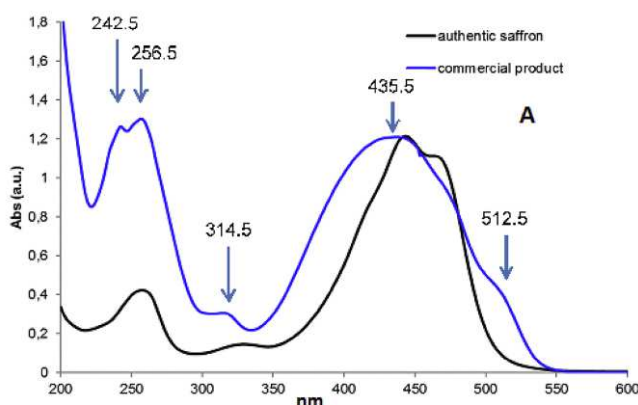


Figura 2-4: Spettro UV-Vis che mostra il confronto del prodotto commerciale (linea blu) con un campione di zafferano autentico (linea nera) e i picchi di assorbimento caratteristici (Ordoudi, et al., 2007)

Dallo spettro si nota come l'assorbanza a 257 nm è eccezionalmente superiore a quella che si avrebbe nella maggior parte di campioni di zafferano autentico di alta qualità, mentre l'assorbanza alla successiva lunghezza d'onda caratteristica è leggermente superiore alla normalità. Proprio come ribadisce (Ordoudi, et al., 2007), questi risultati sollevano preoccupazioni riguardo l'autenticità del campione. Se il prodotto commerciale fosse zafferano autentico i due spettri, di ordine zero, sarebbero sovrapposti, coinciderebbero. L'autore fa riferimento ad un ulteriore studio di (Carmona, et al., 2006) in cui si afferma che le caratteristiche spettrali più evidenti nella regione UV sono diverse rispetto a quelle riportate in letteratura. Le lunghezze d'onda di cui sta parlando sono a 242,5 nm, 256,5 nm e 314,5 nm. Considera migliori queste lunghezze d'onda, rispetto alle solite, per la presenza concomitante di picrocrocina, safranale e *cis*-isomeri dell'estere della crocetina.

Sempre dal grafico, si nota una banda larga a 425-450 nm con λ_{\max} a 435,5 nm rispetto al caratteristico range 420-480 nm dello spettro dello zafferano puro. Il picco a λ_{\max} 512,5 è completamente assente nello zafferano autentico. Ciò, mostra la possibilità di composti coloranti estranei dai sucrosteri della crocetina.

Anche se si conoscono le lunghezze d'onda specifiche dei composti principali dello zafferano è importante produrre e registrare uno spettro UV-Vis intero.

Derivatizzando lo spettro e confrontando i dati del *database* LFCT, dei coloranti sintetici, si ottengono informazioni aggiuntive per definire l'identità degli adulteranti. In fig. 2-5, lo spettro in derivata seconda del campione commerciale: coincide con gli spettri dei coloranti artificiali di arancio II, giallo chinolina, giallo tramonto e tartrazina.

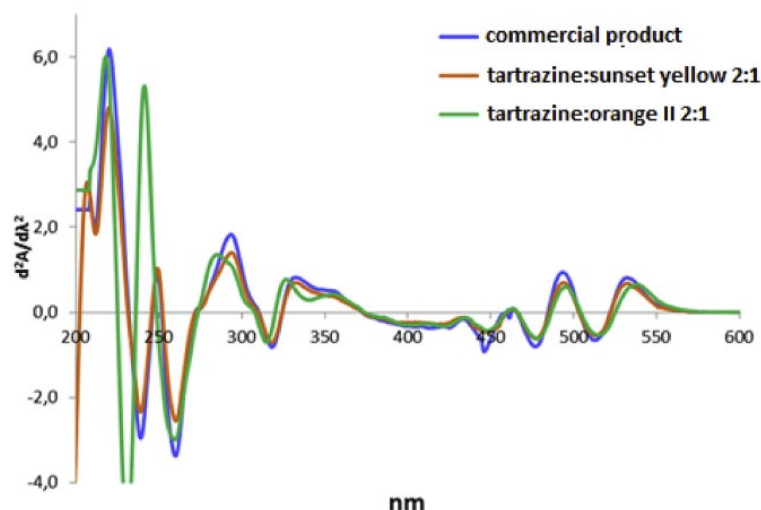


Figura 2-5: Confronto degli spettri in derivata seconda del prodotto commerciale con dei coloranti sintetici. I rapporti dei coloranti artificiali sono espressi come % p/p (Ordoudi, et al., 2007)

Un altro gruppo di ricerca, guidato da (Sabatino, et al., 2011), ha condotto uno studio il cui obiettivo è valutare l'affidabilità del metodo spettrometrico ISO/TS 3632 UV-Vis per la classificazione e analisi di campioni di zafferano; zafferano che può essere miscelato, a diverse concentrazioni, con cartamo, calendula e curcuma, gli adulteranti più ampiamente utilizzati.

Hanno condotto le analisi sia per lo zafferano puro che per lo zafferano "S. Gavino" (ISO cat. II), in più hanno prodotto dei campioni a concentrazioni differenti, comprese tra 10-67%, di cartamo, curcuma e calendula.

I diversi campioni comprendono:

- Stimmi di zafferano di S. Gavino (Sardegna, Italia)
- Curcuma in polvere collezionata dai funzionari dell'ICQRF in Italia
- Fiori di calendula “
- Fiori di cartamo “

I risultati del metodo spettrofotometrico sono confrontati e integrati con la tecnica HPLC/PDA/ESI-MS (fig. 2-7) cosicché vi sia un'identificazione inequivocabile degli adulteranti attraverso specifici composti marker (si vedranno di seguito). Il gruppo dimostra che il metodo spettrofotometrico ISO/TS 3632-2 non è in grado di rilevare le aggiunte di adulterante fino al 10-20%, p/p, difatti, la miscela viene letta come zafferano di categoria II.

Nel caso di aggiunte comprese tra 20-50%, p/p, i tre adulteranti si classificano come peggiori della cat. III e per le aggiunte maggiori del 50%, p/p, provocano delle variazioni nei parametri studiati che non permettono di identificare le miscele come "zafferano".

Nella fig. 2-6 sono riportati i risultati ottenuti dal gruppo di ricerca.

Mix composition w/w	E ^{1%} _{257 nm}	E ^{1%} _{330 nm}	E ^{1%} _{440 nm}	ISO Category
Saffron 100%	66	32	170	II
90% Saffron - 10% Turmeric	59	27	150	II
80% Saffron - 20% Turmeric	53	25	132	III
67% Saffron - 33% Turmeric	45	21	111	III
50% Saffron - 50% Turmeric	34	15	81	-
33% Saffron - 67% Turmeric	22	9	49	-
90% Saffron - 10% Safflower	63	31	152	II
80% Saffron - 20% Safflower	59	30	136	III
67% Saffron - 33% Safflower	53	29	113	III
50% Saffron - 50% Safflower	48	27	86	-
33% Saffron - 67% Safflower	42	26	60	-
90% Saffron - 10% Marigold	61	30	151	II
80% Saffron - 20% Marigold	55	29	135	III
67% Saffron - 33% Marigold	49	25	112	III
50% Saffron - 50% Marigold	39	22	83	-
33% Saffron - 67% Marigold	31	18	54	-

E^{1%} absorbency at λ_{max} for a 1% solution of the test sample for a 1cm cell

Figura 2-6: Risultati della spettrofotometria UV-Vis; applicazione della norma ISO/TS 3632 al campione autentico di zafferano e alle miscele prodotte in laboratorio (Sabatino, et al., 2011)

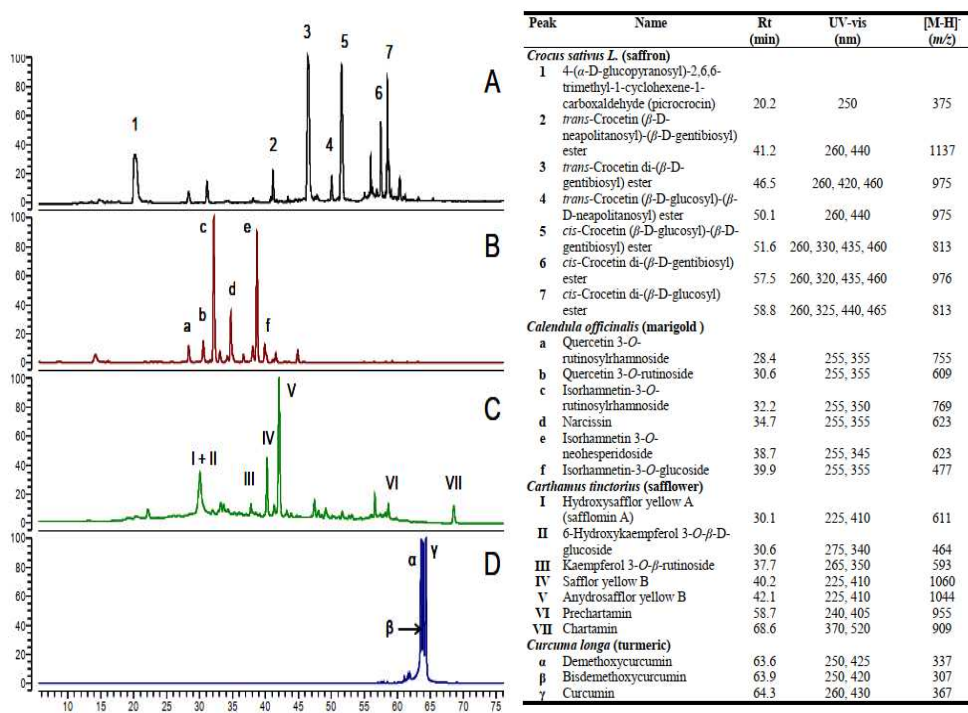


Figura 2-7: Cromatogrammi UV-Vis degli estratti analizzati (a sinistra).

A: Zafferano (λ 250 nm + λ 440 nm); B: Calendula (λ 350 nm); C: Cartamo (λ 410 nm + λ 520 nm); D: Curcuma (λ 425 nm). Elenco delle molecole rinvenute a seguito dell'applicazione di HPLC/PDA/MS degli estratti studiati (a destra) (Sabatino, et al., 2011)

I glicosidi della crocetina sono le molecole responsabile del colore giallo dello zafferano. Le loro lunghezze d'onda caratteristiche si collocano nell'intervallo d'assorbanza di circa 440-460 nm, a seconda del composto. I glicosidi *cis*- e *trans*- della crocetina hanno un comportamento spettroscopico differente tra di loro. Effettuando l'analisi ESI-MS si ha la conferma, in accordo anche con la letteratura, delle molecole individuate; sono indicate con la numerazione 2-7. I composti più abbondanti derivati dalla crocetina risultano essere: *cis*-crocetin-di-(β -D-gentibiosil) estere, *trans*-crocetin-(β -D-neapolitanosil)-(β -D-gentibiosil) estere e *trans*-crocetin-(β -D-glucosil)-(β -D-neapolitanosil) estere.

L'analisi degli estratti di calendula è caratterizzata da 6 picchi principali (a-f) il cui assorbimento UV è a circa 255-350 nm, valori tipici dei flavonoli. Se effettuato un confronto con lo ione molecolare prodotto da ESI-MS si ha un'assegnazione inequivocabile. Tra i 6 composti i più abbondanti risultano essere i derivati dell'isoramnetina.

Altro adulterante considerato è il cartamo. Il componente principale dei pigmenti rossi è la cardamina, deriva dalla precartamina (colore giallo) per decarbossilazione; molecola composta da 2 calconoidi con dei legami coniugati. Entrambi i composti sono identificati con i picchi VI e VII. Inoltre, le molecole rilevate come I, IV e V sono responsabili della colorazione gialla. Identificati anche 2 derivati del kaempferolo, II e III, i quali sono confermati dai dati spettroscopici e derivanti dalla massa.

Il colore giallo della curcuma proviene dalla presenza di 3 particolari molecole (α , β , γ) che possiedono una λ_{\max} a circa 420 nm.

2.4.1.4 Rilevamento di coloranti artificiali: identificazione di coloranti acidi sintetici solubili in acqua - Metodo della cromatografia su strato sottile (TLC)

Il metodo che si basa sulla TLC si applica alle forme della spezia già viste nel precedente sottoparagrafo. Permette di rilevare la presenza di coloranti acidi sintetici solubili in acqua a seguito di estrazione. I pigmenti naturali, quali crocine, vengono eliminati mediante lavaggi successivi o trattamenti acidi. Una volta estratti i coloranti acidi idrosolubili sintetici sono isolati ed eluiti mediante cromatografia su una micro-colonna in poliammide (PA) e identificati mediante TLC.

Per le analisi, la norma chiarisce che i reagenti utilizzati siano solo quelli di grado analitico riconosciuto e acqua demineralizzata o di purezza equivalente, salvo diversa indicazione.

- Metanolo
- Acetone
- Acido formico, purezza al 98 %, o acido acetico glaciale
- Soluzione di ammoniaca al 25%, p/p
- Acido solforico, purezza al 98 %
- Soluzione di idrossido di sodio, 40 g/100 ml
- Solvente di eluizione per la pulizia della colonna costituito da metanolo ed ammoniaca (95:5, %v/v)
- Solvente di eluizione (A) costituito da 2 g di citrato trisodico in una miscela di 80 ml di acqua e 20 ml di soluzione di ammoniaca
- Solvente di eluizione (B) costituito da 0,4 g di cloruro di potassio in una miscela di 50 ml di alcol t-butilico, 12 ml di acido propionico e 38 ml di acqua

La normativa prevede che vengano prodotte soluzioni madre di concentrazioni note pari a 1g; 0,1 g e 0,01 g di colorante per litro di metanolo.

I coloranti a titolo esplicativo presenti nella ISO sono:

- Giallo chinolina (I.C. 47005)
- Giallo tramonto S (I.C. 15985)
- Tartrazina (I.C. 19140)
- Amaranto (I.C. 16185)
- Ponceau 4R (C.I. 16255)
- Azorubina (C.I. 14720)
- Arancio II (C.I. 15510)
- Rocellina (C.I. 15620)

Come per la tecnica spettrofotometrica riporta l'attrezzatura, la quantità di campione necessario e il procedimento di analisi.

- Colonna di purificazione SPE per cromatografia, cartuccia di estrazione in fase solida riempita con 125 mg poliammide
- Rotavapor
- Centrifuga da tavolo, frequenza di rotazione fino a 4000 r/min e rotore per provette da 25 ml.
- Provette da centrifuga, capacità 25 ml

- Pallone a cuore, capacità 10 ml
- Micropipette, capacità da 100 µl a 1 ml
- Pipetta monodose, capacità di 10 ml
- Pallone volumetrico, capacità di 100 ml
- Provetta, capacità di 100 ml
- Becher, forma alta, capacità di 100 ml
- Siringa, graduata in microlitri, capace di erogare volumi fino a 10 µl
- Pipetta Pasteur
- Piastra di cellulosa
- Vasca per TLC, in vetro, con coperchio in vetro smerigliato, in grado di contenere piastre da 200×200 mm
- Siringa di plastica, in polietilene (PE) o polipropilene (PP), capacità da 10 ml e 2 ml
- Bagno termostato
- pH-metro

Pesare, la polvere ottenuta da zafferano in filamenti o filamenti tagliati o lo zafferano in polvere, 500 mg di zafferano in una provetta da centrifuga in tal modo che si proceda con l'estrazione dei coloranti artificiali.

Aggiungere 25 ml di acqua, riscaldata a 60 °C, con una pipetta graduata e mescolare manualmente per 1 minuto, facendo attenzione che tutto lo zafferano in polvere si solubilizzi e non rimanga in sospensione sui lati della provetta. Se ne rimane un po' sul fondo, sospendere ancora una volta lo zafferano mescolando con una spatola. Dopo l'agitazione, lasciare riposare per 10 minuti al riparo dalla luce e rimescolate di nuovo energicamente. A questo punto sarà necessario centrifugare a 4000 giri/min per 10 min in modo tale che sia possibile trasferire il surnatante in un becher utilizzando una pipetta Pasteur. Aggiungere al surnatante, nel becher, 500 µl di acido formico o 2,5 ml di acido acetico glaciale per portare il liquido a circa pH 2.

Si potrebbe incorrere in cromatogrammi contaminati da picchi dovuti ai pigmenti naturali della spezia. Per porre rimedio alla situazione sarà necessario adottare un'altra procedura: centrifugare le provette contenenti il campione a 4000 giri/min per 10 min per poi trasferire il surnatante, con una pipetta Pasteur, in un becher da 50 ml e aggiungere acido solforico fino a quando la soluzione non raggiunge pH 0,1. Riscaldare la soluzione per 30 minuti a 100°C in un bagno d'acqua termostato e ripetere la centrifugazione a 4000 g/min per 5 min. Trasferire il surnatante, con una pipetta Pasteur, in un becher da 50 ml e portare la soluzione ottenuta a pH 2 con la soluzione di idrossido di sodio e ri-centrifugare le provette a 4000 giri/min per 5 minuti.

Prima di far eluire il campione è necessario attivare i siti attivi; ciò è fatto utilizzando 10 ml di acqua. Una volta attivati i siti attivi, utilizzando una siringa da 10 ml, si fa passare l'estratto di zafferano ottenuto attraverso la cartuccia SPE, ma prima è d'obbligo purificare il campione cosicché vi sia l'adsorbimento dei coloranti sintetici nella cartuccia stessa e l'eliminazione di tutte le sostanze interferenti. La rimozione degli interferenti prevede che la cartuccia SPE sia lavata, in sequenza, con 45 ml di metanolo, 45 ml di acetone e 45 ml di metanolo acidificati con 500 µl di acido formico sotto flusso costante di circa 6 ml/min per 8 min. Il metanolo è acidificato così da permettere un maggiore recupero.

A questo punto si può eluire i coloranti sintetici con circa 10 ml di solvente di eluizione e raccogliere l'eluato colorato in un pallone a forma di cuore ed evaporare a secco su un evaporatore rotante a bassa pressione e a temperatura non superiore a 40°C.

Sciogliere il residuo ottenuto in 300 µl di metanolo dispensato da una micropipetta. La durata della procedura di lavaggio diminuisce drasticamente se si utilizza un apparecchio di estrazione a vuoto perché facilita l'uso di grandi volumi di solvente, ma è opportuno che la portata di eluizione da 6 ml/min passi a 8 ml/min per evitare perdite inaccettabili nel recupero.

Ora si è pronti per la TLC e successiva rilevazione dei risultati.

Rivestire le pareti della vasca per cromatografia con carta da filtro. Versare l'eluente A e l'eluente B nella vasca per una profondità di circa 1 cm e coprire con il coperchio. Aspettare 1-2 h così che l'atmosfera interna al contenitore si saturi con vapori del solvente.

Aggiungere, utilizzando la siringa da 10 µl il campione purificato in metanolo e 10 µl della soluzione standard del colorante a 15 mm dal bordo inferiore della piastra con una distanza di 7-10 mm tra le due applicazioni.

Segnare una linea parallela al bordo superiore della piastra a 70-150 mm rispetto al livello della miscela dell'eluente; distanza che l'eluato percorrerà durante la corsa cromatografica.

Mettere ogni piastra in una vasca per cromatografia. Sviluppare fino a quando il fronte del solvente non raggiunge la linea segnata. Rimuovere le piastre dalle vasche e lasciarle asciugare sotto una cappa ventilata per poi osservare le piastre sotto una luce bianca.

Va detto che la durata della cromatografia per eluente A è di circa 45 min mentre per eluente B è di circa 8 h.

Terminata la corsa cromatografica si calcolano i valori del fattore di ritenzione (R_f) delle soluzioni standard e del campione incognito/riferimento.

$$R_f = \frac{l_1}{l_2}$$

Dove l_1 = distanza percorsa dal campione di riferimento o dal campione incognito
 l_2 = distanza percorsa dal fronte del solvente

per identificare qualsiasi colorante artificiale presente nell'estratto del campione si confrontano i valori R_f ottenuti dall'aliquota di prova con quelli della soluzione di riferimento.

Le analisi che sfruttano la cromatografia su strato sottile (TLC), condotte da (Sereshti, et al., 2018), sono state svolte su:

- 12 campioni di *C. sativus* provenienti da diverse zone dell'Iran (Isfahn, Fars, Khorasan, Mazandaran) e raccolti tra gli anni 2012-2015, appartengono alla categoria I secondo la normativa ISO. Sono direttamente acquistati da produttori che certificavano l'origine di coltivazione e la garanzia che il prodotto fosse senza adulterazioni. Questi campioni, utilizzati come singolo campione di riferimento, permettono il confronto con i reali campioni da esaminare.
Il campione di riferimento è prodotto a partire dai singoli campioni e omogenizzati in proporzioni uguali così da avere una polvere omogenea costituita da zafferano più o meno vecchio e permette di coprire le diversità dovute alle varie aree.
- 7 adulteranti acquistati nei mercati Namaxon e "Iran dynamic companies"
- 4 campioni reali ottenuti da diversi mercati di Teheran

Tabella 2-3: Elenco degli adulteranti utilizzati, a sinistra i prodotti di origine vegetale mentre a destra quelli artificiali

Adulteranti vegetali	Adulteranti sintetici
<i>Curcuma</i>	<i>Giallo chinolina</i>
<i>Robbia comune</i>	<i>Giallo tramonto</i>
<i>Semi di cartamo</i>	<i>Tartrazina</i>
<i>Sommacco</i>	

Tabella 2-4: Elenco dei solventi e dei materiali utilizzati per le analisi

Solventi e materiali	Venditore dei prodotti chimici/ strumentazione
<i>1-butanolo</i>	Merck (Darmstadt, Germania)
<i>Acido acetico glaciale</i>	Merck (Darmstadt, Germania)
<i>Etanolo di grado analitico</i>	Merck (Darmstadt, Germania)
<i>Piastre TLC in gel di silice</i>	Merck (Darmstadt, Germania)

Le piastre TLC sono rivestite con l'indicatore fluorescente F254 (TLC gel di silice 60 F254) e dimensione di 20x20 cm, ma sono state tagliate alla dimensione desiderata.

La strumentazione prevede:

- Spettrofotometro UV-Vis (UV2610, Pechino, Cina) utilizzato per misurare l'assorbanza delle soluzioni preparate secondo l'ISO 3632
- Bagno ad ultrasuoni (CD-4820, Corea)
- Centrifuga Hermel Z200A (Hermel Labortechnik, Wehingen, Germania)
- Smartphone Apple iPhone 6S con risoluzione 12 megapixel per fotografare le lastre TLC

Il bagno ad ultrasuoni e la centrifuga migliorano l'efficienza dell'estrazione.

I 7 adulteranti comuni sono raccolti e frantumati con una diversa quantità di zafferano per preparare 7 diverse miscele (Fig. 2-8) con proporzioni, in peso, eterogenee di adulterante.

Saffron	95 mg	Second level 90 mg saffron +	Third level 85 mg saffron +	Fourth level 80 mg saffron +	Fifth level 75 mg saffron +	Sixth level 70 mg saffron +	Random level
Adulterant types							
Sumac	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	92.5 mg saffron + 7.5 mg sumac
Turmeric	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	87.5 mg saffron + 12.5 mg turmeric
Safflower	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	82.5 mg saffron + 17.5 mg safflower
Madder	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	72.5 mg saffron + 27.5 mg madder
Quinolone yellow	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	67.5 mg saffron + 32.5 mg quinolone yellow
Sunset yellow	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	97.5 mg saffron + 2.5 mg sunset yellow
Tartrazine	5 mg	10 mg	15 mg	20 mg	25 mg	30 mg	77.5 mg saffron + 22.5 mg tartrazine

Figura 2-8: Proporzioni, in peso, delle miscele di zafferano e di adulteranti (Sereshiti, et al., 2018)

La Fig. 2-9, a destra, mostra la procedura da applicare al metodo TLC; prevede che 100 mg di ciascun campione di zafferano adulterato sia posto in provette a fondo tondo e ad ogni campione aggiunto 1 ml di miscela di estrazione etanolo/acqua (80:20, %v/v). Gli estratti sono sonicati in un bagno ad ultrasuoni, per 10 minuti, per poi essere centrifugati a 4500 rpm con lo scopo di separare il surnatante dai solidi. A questo punto, si prelevano 5 µl di ogni soluzione estratta e si pone, con un capillare in vetro, sulla piastra TLC. Ogni campione prevede che sia esaminato in triplice copia.

Una volta che le piastre sono pronte sono collocate in una camera di eluizione satura di fase mobile: 1-butanolo, acido acetico e acqua distillata in rapporto reciproco fra di loro di 4:1:1 %v/v.

Il tempo di eluizione è pari a 40 minuti.

La stessa procedura si applica anche ai campioni di zafferano autentico; in tal modo si produce un modello di controllo.

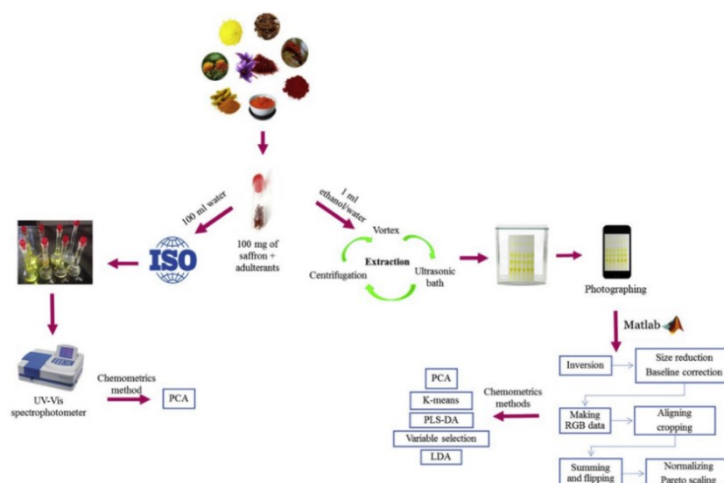


Figura 2-9: Controllo dell'autenticità dello zafferano basato sui metodi TLC (a destra) e UV-Vis (a sinistra) (Sereshti, et al., 2018)

L'esperimento prevede 21 serie di TLC (7 adulteranti x 3 repliche) per i campioni di adulteranti e 18 serie di TLC per lo zafferano autentico. In totale sono prodotte 165 serie di TLC, considerando tutte le diverse combinazioni del grado di adulterazione.

Completato il tempo di esposizione alla fase mobile, le lastre sono rimosse dalla camera di eluizione e le immagini fotografate. Nelle figure 2-2 sono riportati degli esempi di corse cromatografiche di campioni reali.

Le immagini sono ulteriormente processate con il software MATLAB (R2016b) e applicati diversi metodi chemiometrici.

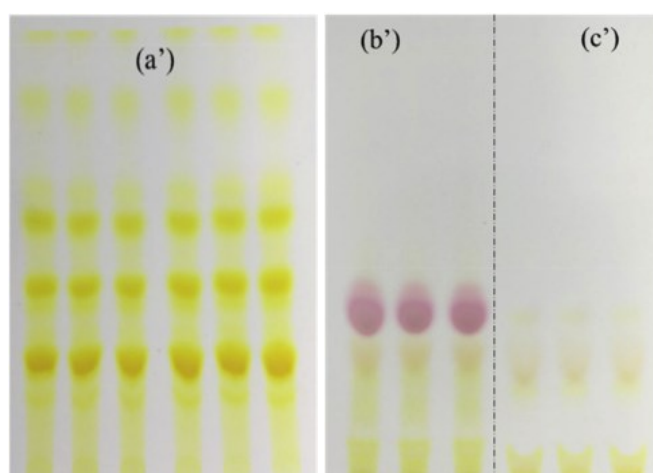


Figure 2-2: Piastre TLC-IA di campioni reali (a'; b'; c') (Sereshti, et al., 2018)

Fase successiva è la preparazione di campioni necessari all'analisi spettrofotometrica UV-Vis (porzione sinistra della figura 2-9). La fase prevede l'aggiunta di 100 ml di acqua distillata

a 100 mg di campione, fase ripetuta per tutte e 7 le concentrazioni (Fig. 2-8), e posti i campioni in agitazione per 1 ora per poi lasciarli al buio per 24 ore.

Il giorno dopo, le soluzioni dei campioni adulterati e dello zafferano autentico sono filtrate con carta da filtro e prelevato 1 ml della soluzione per poi diluirlo in un volume finale di 25 ml.

Per ottenere gli spettri UV-Vis è utilizzata acqua distillata come riferimento. Come indicato dalla normativa ISO 3632 gli spettri sono registrati nell'intervallo 200-700 nm.

Si riportano a titolo d'esempio gli spettri UV-Vis, figure 2-3, e il successivo confronto per sovrapposizione di tutti gli spettri registrati (Fig. 2-10).

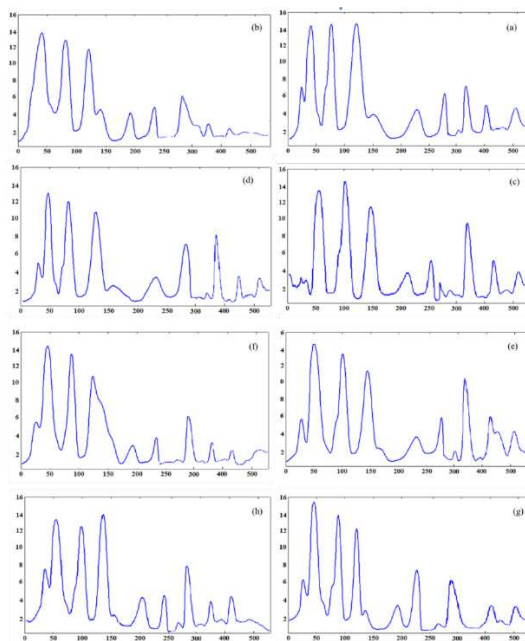


Figure 2-3: Modelli cromatografici prodotti, dalla TLC, di campioni di zafferano e dei suoi adulteranti. (a) sommacco; (b) giallo tramonto; (c) tartrazina; (d) curcuma; (e) robbia; (f) giallo chinolina; (g) cartamo; (h) zafferano (Sereshiti, et al., 2018)

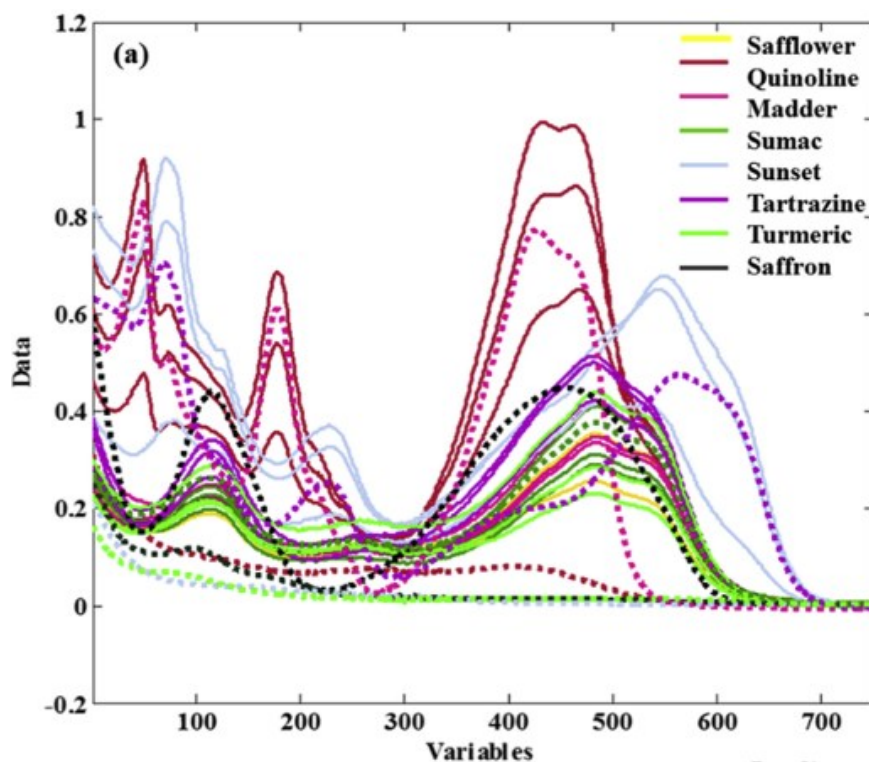


Figura 2-10: Spettri UV-Vis sovrapposti dei campioni analizzati. Safflower: Cartamo; Quinoline: Giallo Chinolina; Madder: Robbia; Sumac: Sommacco; Sunset: Giallo Tramonto; Tartrazine: Tartrazina; Tumeric: Curcuma; Saffron: Zafferano (Sereshi, et al., 2018)

Dal confronto degli spettri dello zafferano autentico, delle miscele con gli adulteranti e gli adulteranti puri i ricercatori sono arrivati a conclusione che solo due tipologie di adulteranti (giallo tramonto e giallo chinolina) hanno degli spettri unici, completamente differenti, da quelli dello zafferano puro. Gli altri, hanno uno spettro simile a quello della spezia presa in considerazione, autentica, che non ne permette la distinzione.

A tal riguardo, i dati acquisiti sono sottoposti a diversi metodi chemiometrici. Questi, consistono:

- *Principal Component Analysis (PCA)*

È uno strumento di analisi esplorativa dei dati che permette di trovare nuove variabili. I PC sono noti come combinazioni lineari di variabili originali. La PCA e ulteriori metodi relazionati a quest'ultima possono avere un ruolo molto importante in altre tecniche; si pensi al pretrattamento dei dati con la regressione o il *clustering*.

- *Kmeans*

È un metodo noto per il *clustering* partizionale.

- *Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA)*

Tecnica di classificazione lineare molto diffusa, è utilizzata perché integra le caratteristiche della regressione dei minimi quadrati parziali (PLSR) con la forza di discriminazione dei metodi di classificazione. È una tecnica che esplora l'insieme delle variabili latenti in combinazione lineare con le variabili originali. Permette di ottenere una rappresentazione grafica visiva che aiuta a comprendere i diversi modelli di dati e la loro correlazione con le variabili latenti ed i coefficienti delle variabili indipendenti in combinazioni lineari. Il modello PLS-DA costruito può prevedere la probabilità che un campione appartenga ad una classe specifica. La qualità e la validità del modello globale PLS-DA sono calcolate tramite validazione incrociata di merito che include la sensibilità, specificità, precisione, tasso di errore e tasso di non errore. Tutti i valori sono compresi fra zero e uno e i campioni non inclusi sono classificati come campioni non assegnati.

- *Linear Discriminant Analysis (LDA)*

L'analisi discriminante lineare è il più comune metodo di separazione delle risposte. Si basa su delle funzioni determinanti discriminanti lineari per massimizzare le variazioni tra le classi e minimizzare le variazioni all'interno della classe stessa.

A differenza della PCA, LDA sceglie la direzione che permette di ottenere la massima separazione fra le classi, l'LDA è particolarmente sensibile alla grande disuguaglianza dei numeri delle variabili di ogni classe.

Il gruppo di ricerca ha proseguito lo studio utilizzando dei campioni reali presi da diversi mercati di Tehran. Due di questi campioni reali avevano un prezzo elevato ed un imballaggio di marca applicato dalla fabbrica mentre gli altri due erano a basso prezzo e senza il marchio del fornitore stampato.

I campioni reali sono pretrattati ed estratti, sottoposti a TLC e le immagini ottenute processate in base all'algoritmo AsLS ed analizzate.

La fig. 2-2 b' mostra delle macchie con colori differenti; conferma dell'avvenuta adulterazione. I due campioni contengono tartrazina. All'ispezione visiva sono erroneamente riconosciuti come zafferano ma lo spettro è riuscito a sottolineare la presenza del colorante sintetico.

Entrambi metodi di selezione delle variabili confermano i risultati ottenuti dallo spettro: in due campioni reali sono stati capaci di rilevare la tartrazina e negli altri due non sono assegnati ad alcun gruppo.

Hanno concluso che il metodo presentato, basato sulla cromatografia su strato sottile, e le analisi delle immagini accoppiate a metodi chemiometrici sono un successo, è un metodo che permette di distinguere lo zafferano autentico dai prodotti contenenti zafferano adulterato. Le adulterazioni sono identificate grazie all'utilizzo delle tecniche PCA, Kmeans, PLS-DA e LDA.

L'LDA risulta essere relativamente debole nella capacità di prevedere i set di prova, ha una capacità di previsione dell'adulterazione dello zafferano inferiore al 100%; altri metodi di previsione riescono a ottenere il 100%, ma il metodo di preelaborazione utilizzato combinato insieme a gli altri metodi presenti nello studio permettono di confermare l'autenticità dei prodotti, identificare la presenza di alteranti e classificarne la tipologia.

A favore di questo metodo c'è l'assenza di una strumentazione speciale; con un semplice smartphone è possibile acquisire immagini che permettano la convalida dell'autenticità della spezia in un tempo relativamente breve. Stanno pensando di estendere il metodo da loro adottato ad altri prodotti alimentari per il riconoscimento dei caratteri dell'autenticità e per la determinazione di quest'ultima.

2.4.1.5 Rilevamento di coloranti artificiali: identificazione di coloranti acidi sintetici solubili in acqua - Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

Questo metodo di prova (ISO, 2010), è adatto per la determinazione nello zafferano dei seguenti coloranti acidi sintetici solubili in acqua:

- Amaranto
- Azorubina
- Arancio II
- Ponceau 4R
- Giallo chinolina
- Giallo tramonto S
- Tartrazina
- Giallo 2G
- Rocellina

È direttamente applicabile allo zafferano in polvere, purché la polvere sia conforme ai requisiti riportati nella norma stessa, e ai filamenti di zafferano integri e tagliati dopo la

frantumazione e la setacciatura, anch'essi necessariamente devono essere conformi alle direttive della norma.

Questo metodo si applica solo per il rilevamento e la quantificazione dei coloranti elencati prima e rispettando le indicazioni riportate in Fig. 2-11.

Stage	Time min	Phase A	Phase B	Phase C
Equilibration	10	90	10	0
1	0	90	10	0
2	7	48	52	0
3	10	48	52	0
4	14	0	60	40
5	24	0	60	40
6	25	90	10	0

Figura 2-11: Rappresentazione dei tempi e gradienti di concentrazione dell'eluente utilizzato per la corsa cromatografica (ISO, 2010)

La tecnica è specifica, in questo caso, per l'estrazione di coloranti acidi sintetici solubili in acqua. I pigmenti naturali dello zafferano, in particolare le crocine, vengono eliminati mediante lavaggi successivi o trattamenti acidi. I coloranti sintetici acidi solubili in acqua vengono isolati ed eluiti mediante cromatografia su una micro-colonna di poliammide (PA) e identificati mediante HPLC in fase inversa con rivelatore a serie di diodi (RP-HPLC-DAD).

Per eseguire l'analisi correttamente e con risultati validi è necessario, come per l'analisi con la TLC, l'utilizzo solo di reagenti di grado analitico riconosciuto o di purezza equivalente e di acqua demineralizzata, a meno che non sia riportato diversamente.

- Metanolo
- Metanolo, grado HPLC
- Acetone
- Acetonitrile, grado HPLC
- Soluzione di ammoniaca, al 25 %, p/p
- Acido formico, con purezza al 98 % o acido acetico glaciale
- Acido solforico, purezza al 98 %
- Soluzione di idrossido di sodio, 40 g/100 ml
- Diidrogenofosfato di potassio, purezza al 98%
- Idrossido di potassio, 1 mol/l
- Solvente per l'eluizione, in una provetta da 100 ml aggiungere 5 ml di soluzione di ammoniaca e 95 ml di metanolo

La concentrazione degli standard di colorante sintetico, originale, è approssimativamente di 1 mg/ml; ogni soluzione di colorante si prepara con 100 mg di colorante in 100 ml. Per evitare errori nella preparazione di ogni soluzione dopo aver aggiunto circa 80 ml d'acqua si miscela accuratamente fino a completo scioglimento per poi terminare di portare a volume con acqua. Calcolare la concentrazione effettiva in mg per ml di soluzione per ogni colorante in base alla quantità effettivamente pesata di quest'ultimo.

Le soluzioni standard diluite hanno una concentrazione, in massa, approssimativamente di 10 µg/ml. Si trasferisce con una pipetta volumetrica, in vetro, 1 ml di ogni soluzione standard originale in una serie di nove matracci tarati da 100 ml e portati a volume con acqua.

Queste soluzioni servono a definire il tempo di ritenzione standard.

Diluire queste soluzioni a concentrazione approssimativa di 20 µg/ml; rappresentano le soluzioni madri standard.

Trasferire con le pipette volumetriche 1 ml di ciascuna soluzione madre standard in un pallone volumetrico da 50 ml e portare a volume con acqua. Mescolare con cura e calcolare la concentrazione effettiva, in milligrammi per millilitro, per ogni colorante.

Queste soluzioni sono utilizzate per preparare le soluzioni di taratura, coprono l'intervallo di concentrazione 0-20 µg/ml. Se la concentrazione prevista supera questo intervallo è d'obbligo preparare ulteriori soluzioni standard in modo tale che ricadano all'interno della curva di taratura e si è sicuri che non vi siano deviazioni positive/negative della risposta.

L'attrezzatura essenziale per la prova è la seguente:

- Bilancia analitica, approssimazione di 0,0001 g
- Provette da centrifuga, capacità di 25 ml
- Centrifuga, frequenza di rotazione fino a 4000 r/min
- Cartuccia di estrazione in fase solida, riempita con 125 mg di PA
- Pallone a forma di cuore, capacità di 10 ml
- Rotavapor
- Micropipetta, capacità di erogare volumi da 100 µl a 1 ml
- Becher, forma alta, capacità di 25 ml, 100 ml, 500 ml e 1 l
- Pipetta volumetrica in vetro, capacità di 1 ml, 10 ml, 25 ml
- Pipetta Pasteur
- Beuta in vetro, capacità di 1 l
- Matraccio tarato, capacità di 50 ml, 100 ml, 500 ml e 1 l
- Filtro a membrana in PTFE, dimensione dei pori 0,45 µm, diametro 13 mm
- pH-metro ed elettrodo adatto per misure di pH da 0 a 12

- Provette da 100 ml
- Siringa in plastica, in PE o PP, capacità di 10 ml e 2 ml
- Siringa, graduata in microlitri, in grado di erogare volumi fino a 50 μ l
- Bagno termostato
- Cromatografo liquido ad alte prestazioni, con rivelatore a serie di diodi, in grado di misurare l'assorbanza tra 300-700 nm e con pompa per consentire i gradienti di concentrazione
- Comparto della colonna che permette di controllare la temperatura
- Pre-colonna, 10 \times 4,6 mm con la stessa fase della colonna analitica ma con dimensione delle particelle di 4 μ m
- Colonna cromatografica per HPLC, tipo C₁₈
Acciaio inox 150 \times 4,6 mm, riempita con silice sferica di ottadecilsilano, non rivestita, di granulometria 3 μ m e porosità 120 nm, superficie 320 m²/g e con un contenuto di carbonio in frazione di massa del 16%
- Vials alte, capacità di 0,6 ml

La procedura da portare avanti prevede innanzi tutto di pesare 500 mg di zafferano in polvere in una provetta da centrifuga, con l'approssimazione di un milligrammo.

Il passo successivo è l'estrazione dei coloranti artificiali. Aggiungere 25 ml di acqua, riscaldata a 60°C, con una pipetta graduata e mescolare manualmente per 1 min assicurandosi che lo zafferano in polvere non rimanga in sospensione sui lati della provetta. Se rimane parte del campione nel fondo o ai lati della provetta sospendere ancora una volta lo zafferano con l'aiuto di una spatola. Dopo l'agitazione lasciare riposare per 10 minuti lontano dalla luce per poi rimescolare di nuovo vigorosamente.

Centrifugare le provette a 4000 giri/min per 10 minuti per poi trasferire il surnatante in un becher con una pipetta Pasteur e aggiungere 500 μ l di acido formico o 2,5 ml di acido acetico glaciale per portare la soluzione a circa pH 2. Le procedure da seguire nel caso di presenza di pigmenti naturali, per la fase di purificazione, di eluizione e recupero del campione si rimanda al sottoparagrafo relativo al metodo che sfrutta la TLC in quanto si eseguono gli stessi passaggi.

Ottenuti i coloranti a seguito dell'evaporazione del sovente con il Rotavapor a bassa pressione e temperatura non superiore a 40°C si scioglie il residuo in 300 μ l di acqua, con l'aiuto di una micropipetta, e si fa passare la soluzione attraverso un filtro in PTFE prima di iniettare in un sistema HPLC.

L'eluente utilizzato durante la corsa cromatografica è costituito da diverse fasi.

- Fase A: pesare 1,36 g di diidrogenofosfato di potassio, porli in un becher, e aggiungere 900 ml di acqua. Regolare a pH 7 con una soluzione di idrossido di potassio e successivamente spostare la soluzione in un matraccio tarato da 1 l; portare a volume con acqua.
- Fase B: metanolo
- Fase C: acetonitrile

Le condizioni cromatografiche sono:

- Portata: 0,8 ml/min
- Temperatura della colonna: 30°C
- Volume di iniezione: 50 µl
- Gradiente cromatografico (Fig. 2-11)

Utilizzare la procedura cromatografica sempre elencata nella Fig. 2-11.

Iniettare 50 µl dell'estratto del campione nella colonna.

Le soluzioni preparate in precedenza dalle soluzioni madri sono utilizzate per eseguire la calibrazione del sistema e per quantificare i coloranti che eluiscono. Le soluzioni di calibrazione dovrebbero coprire il campo di concentrazione da 0 µg/ml a 20 µg/ml.

Come per le analisi UV-Vis, se le concentrazioni cadono all'esterno del range di calibrazione è indispensabile preparare ulteriori standard così da minimizzare l'errore commesso.

A tal proposito è indispensabile interpretare correttamente i risultati. Per identificare e confermare i coloranti artificiali nell'estratto si utilizza il confronto dei loro tempi di ritenzione e le lunghezze d'onda caratteristiche degli spettri UV-vis, tra 300 nm e 700 nm, con le soluzioni di riferimento.

La quantificazione deve essere effettuata utilizzando le soluzioni di calibrazione.

Individuati i composti si procederà con l'espressione dei risultati.

In Fig.2-12 si riporta un esempio di un cromatogramma ottenuto da una delle analisi prodotte, mentre nella successiva tabella (Tab. 2-5) i coloranti identificati e i relativi tempi di eluizione.

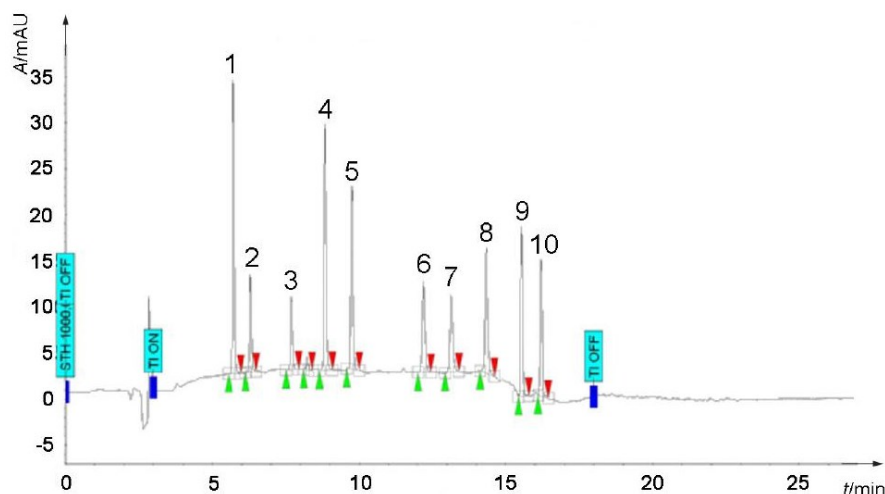


Figura 2-12: Esempio di un cromatogramma riportato nella normativa ISO 3632:2010-2, ottenuto a 440 nm di 1 mg/kg di standard (A =assorbanza; t = tempo di eluizione) (ISO, 2010)

Tabella 2-5: Identificazione dei coloranti sintetici in base ai relativi tempi di eluizione

Colorante sintetico	Tempo (min)
Tartrazina	5,71
Amaranto	6,29
Ponceau 4R	7,69
Giallo tramonto	8,84
Giallo 2G	9,75
Azorubina	12,19
Giallo chinolina (isomero 1)	13,15
Giallo chinolina (isomero 2)	14,33
Arancio II	15,55
Rocellina	16,20

Tra gli autori che hanno lavorato con la tecnica HPLC troviamo (Ordoudi, et al., 2007; Sabatino, et al., 2011; Kiani, et al., 2018; Bosmali, et al., 2017).

Il gruppo di ricerca di Ordoudi ha studiato, oltre al test colorimetrico e le analisi spettrofotometriche UV-Vis, anche un metodo incentrato sull'HPLC. Per i campioni, solventi e reagenti utilizzati si rimanda all'elenco presente nel sottoparagrafo 2.4.1.3 e alla tabella 2-2.

Prima di poter iniettare i campioni è stato necessario estrarre i sucrosteri della crocettina e la picrocrocina, estrazione ad opera di una soluzione costituita da metanolo e acqua in rapporto 1:1 v/v. Gli estratti derivano da stimmi di zafferano macinati o la polvere stessa della spezia, 0,1 g, (preparati secondo il metodo ISO 3632-2:2010) miscelati con la soluzione acquosa alcolica in un matraccio volumetrico di 200 ml e lasciati in agitazione magnetica a 1000 rpm per 1 ora, a temperatura ambiente (25°C) e lontano dalla luce solare diretta.

È stata prelevata un'aliquota dell'estratto e diluita 1:10 con metanolo/acqua (1:1 v/v) e filtrata attraverso un filtro RC-55 (13 mm i.d., 0,45 mm diametro dei pori).

Pretrattato, il campione è pronto per la determinazione della picrocrocina e dei sucresteri della crocetina attraverso l'HPLC.

Il sistema HPLC è costituito da:

Pompa, modello P4000 (Thermo Separation Products, S. Josè, CA, USA)

Autocampionatore Midas (Spark, Emmen, Paesi Bassi)

DAD UV 6000 LP (Thermo Separation Products, S. Josè, CA, USA)

Colonna cromatografica LiChroCART Superspher 100 C₁₈, 125 mm x 4 mm i.d., 4 µm (Merck, Darmstradt, Germania)

Il sistema di eluizione prevede:

miscela di acqua/acido acetico 1% v/v (A) e acetonitrile (B)

gradiente lineare: 20, in 20 minuti B =100%

flusso: 0,5 ml/min

volume iniettato: 20 µm

L'elaborazione dei dati cromatografici è condotta dal software Chrom Quest versione 3.0 (Thermo Separation Products, S. Josè, CA, USA).

Il range delle lunghezze d'onda studiate ricade nell'intervallo 200–550 nm e la quantificazione si basa sull'integrazione dell'area dei picchi; 250 nm è la λ_{\max} della picrocrocina mentre 440 nm per i sucresteri della crocetina. Le molecole rilevate sono la picrocrocina e il *trans*-4-GG-estere della crocetina. L'identificazione prevede che siano analizzati i tempi di ritenzione e gli spettri UV-Vis per poi confrontarli con quelli ottenuti dagli standard e quelli presenti in letteratura.

La quantificazione dei sucresteri della crocetina e la picrocrocina sono calcolati come rapporto percentuale del peso rispetto al peso secco.

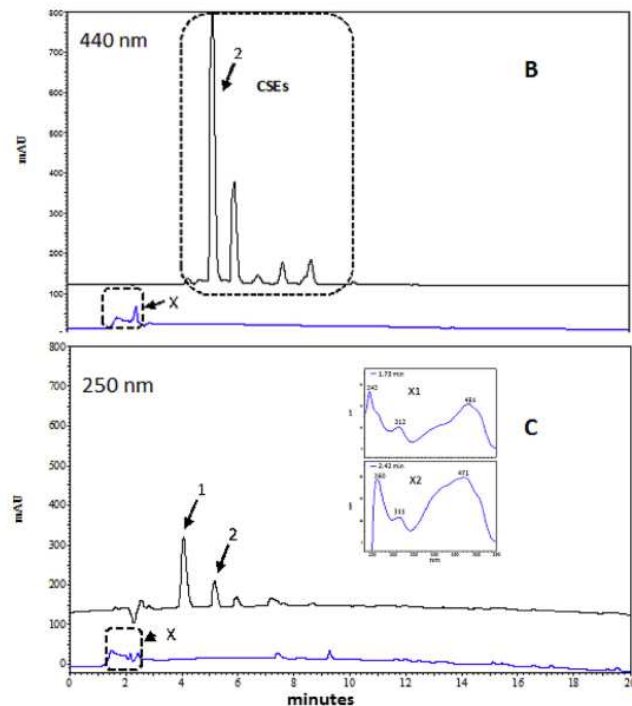


Figura 2-13: Profili cromatografici (HPLC-DAD) a 440 nm e 550 nm. I picchi cromatografici 1 e 2 corrispondono, rispettivamente, alla picrocrocina e al trans-4-GG estere della crocetina. In nero il profilo cromatografico dello zafferano autentico, mentre in blu il profilo ottenuto dal campione commerciale (Ordoudi, et al., 2007)

Dalla figura 2-13 B si nota che non è presente nessun sucrestere della crocetina nel prodotto commerciale a 440 nm, mentre in C è assente la picrocrocina; principale composto amaro della spezia. Al contrario vi è la presenza di alcuni costituenti sconosciuti (picchi X1 e X2) eluiti molto prima della picrocrocina. Tutto ciò, considerando anche gli spettri UV-Vis, ha permesso al gruppo di assumere che questi picchi potrebbero essere dovuti a coloranti esogeni dalla tonalità giallo-arancio le cui λ_{max} sono a 471 nm e 481 nm; esito che supporta l'ipotesi che il prodotto commercializzato etichettato come zafferano sia in realtà una vera e propria sostituzione totale della spezia con coloranti sintetici che mimano aspetto, qualità e caratteristiche.

Nel sottoparagrafo relativo alle analisi spettrofotometriche si è parlato del lavoro conseguito da (Sabatino, et al., 2011) per definire l'affidabilità del metodo ISO; affidabilità che a seguito del confronto con la tecnica HPLC/PDA/ESI-MS è risultata insoddisfacente. Una volta ottenuti i risultati dall'analisi UV-Vis hanno prima effettuato una definizione preventiva, separatamente, delle *fingerprint* degli estratti, in metanolo/acqua, di zafferano, cartamo, curcuma e calendula poi, hanno analizzato le miscele di zafferano con gli adulteranti

nell'intervallo di concentrazione 2-20%, p/p, e per ogni adulterante sono scelte delle molecole marker, molecole identificabili inconfondibilmente, così da stabilire che non ci sia influenza per effetto miscela con lo zafferano. Le molecole scelte si rifanno a quelle definite dal Laboratorio di Catania dell'ICQRF in campioni di zafferano raccolti in mercati italiani nell'ambito delle attività di controllo qualità del MIPAAF.

Tabella 2-6: Marcatori identificati dall'ICQRF delle diverse specie vegetali utilizzate comunemente come adulteranti dello zafferano

Molecola marker	m/z	Adulterante
<i>Isorhamnetina-3-O-neoesperidoside</i>	623	Calendula
<i>Cartamina</i>	909	Cartamo
<i>Giallo anidro zafferano</i>	1044	Cartamo
<i>Demetossicurcumina</i>		Curcuma
<i>Bidemetossicurcumina</i>		Curcuma
<i>Curcumina</i>		Curcuma

Tabella 2-7: Elenco dei prodotti utilizzati per l'analisi HPLC/PDA/ESI-MS

Solventi e materiali	Venditore dei prodotti chimici/ strumentazione
<i>Acetonitrile di grado analitico</i>	Romil (Milano, Italia)
<i>Acido formico di grado analitico</i>	Romil (Milano, Italia)
<i>Metanolo di grado analitico</i>	Romil (Milano, Italia)
<i>Acqua distillata purificata a MΩ con sistema di purificazione MilliQ ULTRA</i>	Millipore (Vimondrome, Milano, Italia)
<i>Filtri PTFE 0,45 μm</i>	LabService Analytica, Bologna, Italia

Ogni campione, 20±2 mg, è estratto con 2 ml di soluzione metanolica acquosa (50% in volume) contenente 0,1% di acido formico a temperatura ambiente in un bagno ad ultrasuoni per 30 min. Successivamente si centrifuga a 3000 rpm per 5 minuti; in tal modo si separerà il surnatante necessario per le analisi cromatografiche; solo dopo che si è provveduto a filtrare con filtro in PTFE 0,45 μm.

Le caratteristiche tecniche della strumentazione HPLC sono le seguenti:

Rilevatore Finnigan Surveyor MS-Pump

Autocampionatore

PDA + detector a trappola ionica Finnifan LCQ DECA XP MAX (Thermo Fisher Scientific); operante in modalità ionica negativa

Colonna analitica Gemini C₁₈ 150x2,1 mm i.d. 3 μm (Phenomenex)

Le caratteristiche di eluizione prevedono:

- Portata: 200 μ l/min
- Temperatura colonna: 30°C
- Volume iniettato: 10 μ l
- Gradiente con due solventi: (A) 0,3% acido formico in acqua; (B) 0,3 acido formico in acetonitrile

Il gradiente di concentrazione della fase mobile è programmato secondo quanto segue:

0 min = 5% B

50min = 28% B

60 min = 43% B

60-65 min =43% B

70-80 min = 5% B

- Range λ esaminate da PDA: 200-700 nm
- Range λ scansionate da MS: 100-1600 m/z
- Interfaccia HPLC-MS: ESI
- Tensione dell'ago di ionizzazione elettrospray:3,5 kV
- Tensione del capillare: 18 V
- Portata del gas di guaina: 36 unità arbitrarie
- Portata del gas ausiliario: 14 unità arbitrarie

I principali composti, dei prodotti vegetali, analizzati sono caratterizzati in funzione del tempo di ritenzione, λ_{max} e i dati derivanti dalla massa.

Le molecole relative alla calendula e al cartamo sono rilevabili fino alla concentrazione, in peso, del 5%, mentre le tre molecole rappresentano la caratteristica tripletta dei curcuminoidi della curcuma la cui identificazione è possibile fino al 2% nella miscela di zafferano.

Hanno lavorato su diversi campioni di zafferano, curcuma, calendula e cartamo, già descritti nella parte relativa alle analisi UV-Vis.

La review prodotta da (Kiani, et al., 2018) affronta le diverse tecniche per la valutazione della qualità dello zafferano. Tra queste, esamina l'analisi HPLC-DAD, eseguita da un altro gruppo di ricerca, per definire se la tecnica sia capace di rivelare la frode prodotta a discapito dello zafferano con diversi adulteranti. I preparati utilizzati sono costituiti da una miscela di zafferano e diversi adulteranti: zafferone, cartamo, robbia e barbabetola rossa; tutti questi vegetali restituiscono una colorazione gialla. Ottenuti gli spettri hanno poi applicato l'analisi bidirezionale della varianza (ANOVA) ai dati. L'analisi risulta essere in grado di rilevare con

successo la presenza di stili colorati con colorante di zafferano (>14,3%), robbia (9,1%) e barbabietola rossa (>14,3%).

In un altro lavoro, presente sempre nella review, affrontano il tema dell'affidabilità del metodo. Gli estratti acquosi sono prodotti secondo la normativa ISO 3632. In totale sono esaminati 50 campioni provenienti da diverse aree geografiche: Iran, Italia, Grecia e Spagna. Per la convalida del metodo sono utilizzati picrocrocina, safranale con purezza all'88%, standard di *trans*-crocetina; di-(β -D-gentiobiosil) estere (*trans*-4-GG); (β -D-glucosil)-(β -D-gentiobiosil) estere (*trans*-3-GG); standards con purezza pari al 99%. I risultati sono soddisfacenti perché è risulta in termini di linearità, sensibilità, selettività e precisione in grado di determinare i tre principali composti che definiscono la qualità di *C. sativus*.

Quindi, l'HPLC risulta essere una tecnica utilizzata non solo per il rilevamento di campioni adulterati ma anche utile per l'identificazione e la quantificazione delle principali molecole chimiche: crocine, picrocrocine, safranale e flavonoidi.

A questo proposito si riporta anche il lavoro svolto da (Carmona, et al., 2006) il cui obiettivo è stabilire quali esteri della crocetina sono presenti nello zafferano e nella gardenia, rilevarli, definirli e se possibile identificare l'aroma prodotto dai precursori del glicoside presenti in entrambe le specie durante la stessa corsa cromatografica.

Hanno lavorato con:

- 4 campioni di zafferano raccolto, estratti gli stimmi ed essiccato a Motilla del Palancar (Cuenca, Spagna) seguendo i procedimenti tradizionali conformi alla norma commerciale di denominazione di origine protetta (DOP) "Azafrán de la Mancha". Hanno analizzato due campioni del raccolto 2003 e due campioni del 2004.
- 2 campioni di *Gardenia jasminoides* Ellis; uno è uno standard commerciale fornito da Chromadex (Santa Ana, CA, USA) e l'altro è un estratto prodotto da un estratto fornito da Verdu'-Canto' Zafferano Spagna (Novelda, Alicante, Spagna).

La procedura affinché si possano ottenere dei risultati attendibili prevede che 20 mg di campione sia macerato per un'ora in 8 ml di acqua milliQ, acqua purificata con il sistema ULTRA, in cui precedentemente è fatto gorgogliare elio, a temperatura ambiente e in condizioni di buio. 20 μ l di estratto sono filtrati con un filtro PVDF da 0,45 μ m (Millipore) prima di essere iniettati in un cromatografo HPLC Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) dotato di una colonna C₁₈ Phenomenex Luna da 150x4,6 mm i.d, 5 μ m, termostata a 30°C.

Si impiegano due diversi sistemi di eluizione, con l'unica differenza a livello della soluzione acquosa, una delle due è acidificata. L'acidificazione facilita la ionizzazione, ma

non migliora di molto la sensibilità, però permette di produrre picchi più ampi in alcuni casi e un diverso comportamento cromatografico nel caso di *trans*-crocetina (β -D-gentibiosil) estere (*trans*-2-G) poiché è eluito con un tempo di ritenzione inferiore a causa della protonazione del gruppo acido terminale rendendo l'identificazione dei precedenti isomeri *cis* difficili. Per ovviare al problema insorto hanno deciso di adottare entrambe le modalità di eluizione. I solventi utilizzati sono: (A) acqua o acqua e acido formico allo 0,25% e (B) acetonitrile.

L'analisi prevede un gradiente di eluizione: 0-5 minuti (A) è pari all'80% per poi passare al 20% in 15 minuti. La portata è di 0,8 ml/min. L'azoto, utilizzato come gas ausiliario e di guaina, ha una portata di 12 l/min e la temperatura del gas di essiccazione è impostata a 350°C con la pressione di nebulizzazione di 30 psi.

La doppia rilevazione simultanea è ad opera di uno spettrofotometro a serie di diodi (DAD) e da uno spettrometro di massa a quadrupolo con ionizzazione elettrospray (ESI). La sonda dello spettrometro di massa è collegata all'uscita della cella UV.

- Rivelatore DAD impostato a 250; 330; 440 nm
- Tensione capillare: 2500 V
- Temperatura capillare: 195°C

Gli spettri sono registrati in modalità ionica positiva e negativa tra m/z 100-1500 e l'identificazione è effettuata con il software Agilent Chemstation.

Nella figura 2-14 si mostrano due cromatogrammi; in alto il cromatogramma relativo a *C. sativus* ed in basso quello di *G. jasminoides*.

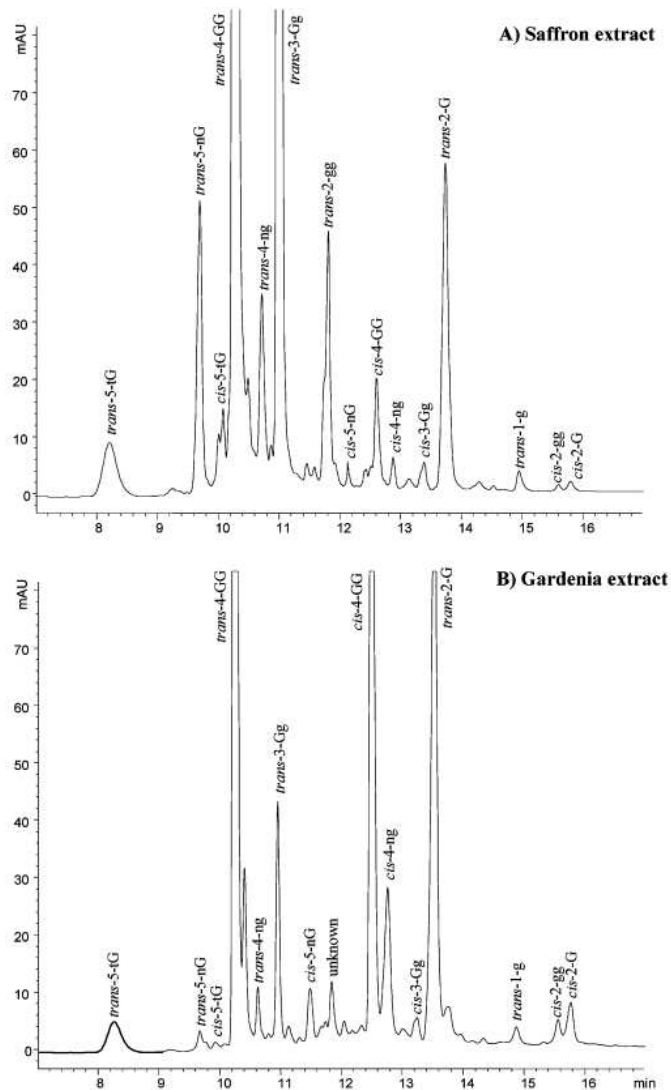


Figura 2-14: Cromatogrammi ottenuti dall'iniezione di estratti di zafferano (in alto) e gardenia (in basso). Sono evidenziati gli esteri della crocetina (Carmona, et al., 2006)

Dei quindici esteri di crocetina, identificati nello studio, sono provvisoriamente ritrovati cinque nuovi composti (si rimanda al lavoro per i dettagli delle molecole identificate) e trovate delle differenze tra le quali, le più rilevanti tra le due specie vegetali, sono il basso contenuto di $(\beta$ -D-glucosil)- $(\beta$ -D-gentibiosil) estere *trans*-crocetina; l'assenza di di- $(\beta$ -D-glucosil) estere *trans*-crocetina nella gardenia, il suo maggiore contenuto di $(\beta$ -gentibiosil) estere *trans*-crocetina e di di- $(\beta$ -D-gentibiosil) estere *cis*-crocetina. Con lo stesso metodo cromatografico hanno identificato, in un'unica analisi, dieci composti glicosidici negli estratti di zafferano con un *pattern* UV/Vis simile a quello della picrocrocina; tra questi: 5-idrossi-7,7-dimetil-4,5,6,7-tetraidro-3-isobenzofuranone; 5-O- β -D-gentibioside; 4-idrossimetil-3,5,5-trimetil-cicloesen-2-one; 4-O- β -D-gentibioside sono stati provvisoriamente identificati per la prima volta nello zafferano. Di questi dieci glicosidi, solo l'estere di-2-metil-6-oxo-2,4-epta-2,4-dienoico-O- β -

D-gentibiosilico è stato ritrovato in campioni di gardenia, ma hanno anche identificato il glicoside iridoide, il geniposide.

La definizione delle molecole appartenenti ad una o ad entrambe le specie botaniche come anche avere un metodo in grado di determinarle è importante in quanto ultimamente nei prodotti commerciali provenienti dall'estero è rinvenuta sempre più frequentemente l'adulterazione dello zafferano con questo fiore, adulterazione che può essere pericolosa per il consumatore in quanto vi è una specifica molecola, genipina aglicone, con azione genotossica.

2.4.2 Spettroscopia infrarossa (IR)

La spettroscopia infrarossa insieme alla spettrofotometria UV-Vis risultano essere dei metodi di valutazione della qualità economici e veloci rispetto, ad esempio, all'NMR (Kiani, et al., 2018).

Recentemente, nel 2020, (Shawky, et al., 2020) ha pubblicato un articolo riguardo l'utilizzo della spettroscopia nel vicino-infrarosso (NIR). Ad oggi, la NIR risulta essere ancora poco applicata al controllo qualitativo degli alimenti in generale. Trova soprattutto impiego per la determinazione della zona geografica d'origine del prodotto e per la definizione della composizione chimica.

In realtà, spesso, i dati ottenuti dalla spettroscopia NIR sono corretti con la trasformata di Fourier (FT-NIR). In questo caso viene utilizzata insieme alla micro-spettroscopia ad immagini per la determinazione del cartamo.

Gli esperimenti condotti hanno lo scopo di capire se è possibile utilizzare la spettroscopia NIR che ha come pregi la rapidità e la precisione d'analisi, associata all'analisi statistica multivariata, per autenticazione dello zafferano, identificazione e determinazione qualitativa degli adulteranti.

Il lavoro in questione è approfondito utilizzando:

- 50 stimmi di zafferano
- 30 campioni per ogni adulterante (8) (Tab. 2-8)

Gli stimmi, acquistati e di comprovata autenticità, sono bolliti a 100°C in acqua per 1 ora con lo scopo di estrarre le sostanze d'interesse e separarle da eventuali interferenti; separazione ottenuta per decantazione. Il passaggio successivo prevede l'essiccamento all'aria a 30°C fino a quando non si registra un peso costante. Per i vegetali adulteranti una volta acquistati nei negozi locali ne è confermata l'autenticità.

Tabella 2-8: Elenco degli adulteranti e delle porzioni utilizzate durante le analisi NIR

Adulterante	Porzione del vegetale
<i>Curcuma</i>	Rizoma
<i>Ibisco</i>	Fiore
<i>Paprika</i>	Frutto
<i>Zafferano</i>	Stami, stimmi estratti esausti
<i>Calendula</i>	Fiore
<i>Melograno</i>	Buccia
<i>Cartamo</i>	Fiore

Tutte le matrici vegetali, zafferano e adulteranti, sono polverizzate, separatamente, e poi setacciate con un setaccio dal diametro di 2 mm per dare uniformità ai campioni. Sono tenute in essiccatore fino al momento dell'utilizzo, per evitare l'assorbimento dell'umidità.

In totale, considerando tutte le possibili combinazioni (8 adulteranti x 30 campioni) e i 50 campioni autentici di zafferano, le analisi sono condotte su 290 campioni.

I campioni casualmente sono suddivisi in set di calibrazione e set di prova. I primi, i set di calibrazione, sono 190 campioni (30 campioni di zafferano e 8x20 gli adulteranti), mentre i set di prova sono 100 campioni (20 campioni di zafferano e 8x10 gli adulteranti).

Hanno dovuto anche provvedere a preparare le miscele di adulteranti; queste risultano essere 720; derivano da 15 campioni casuali di zafferano con ognuno degli 8 adulteranti. Le concentrazioni utilizzate nelle miscele adulterate sono: 10; 20; 50; 100; 200; 400 mg/g di ogni adulterante tritato. Per le pesate hanno utilizzato una bilancia analitica. Per raggiungere il peso finale di 2 g hanno aggiunto la polvere, derivante dagli stimmi, di zafferano.

Ogni singolo adulterante è preparato mescolando 20 campioni nel caso in cui si trattasse di un set di calibrazione e 5 nel caso si trattassero di campioni necessari per costruire i modelli di regressione quantitativa. Ciò, porta ad avere 720 campioni suddivisi in set di calibrazione e set di prova. 720 campioni derivano da: 480 campioni dei set di calibrazione (8x10x6) e 240 (8x5x6) campioni dei test di prova (8 sono il numero di adulteranti, 10 rappresentano i 10 campioni rappresentativi dello zafferano che sono mescolati con ogni singolo adulterante e 6 sono le diverse quantità di adulterante aggiunte, mentre 5 sono i campioni di zafferano dei set di prova).

Hanno utilizzato uno spettrofotometro FT-NIR (Bruker Optics GmbH Rudolp Plank, Ettlingen, Germania) con un rilevatore InGaAs. I numeri d'onda integrati sono compresi nel

range di 12000-35000 cm^{-1} e le acquisizioni degli spettri sono a carico del software OPUS spectral acquisition con risoluzione di 16 cm^{-1} e una media di 64 scansioni per spettro.

Lo spettro NIR è ottenuto in modalità di riflettanza diffusa; la radiazione arriva direttamente al campione, nessun pretrattamento, a temperatura ambiente. Tutti gli spettri sono ottenuti utilizzando la scala d'assorbanza. In Fig. 2-15 si riporta lo spettro acquisito con la sovrapposizione dei diversi campioni analizzati.

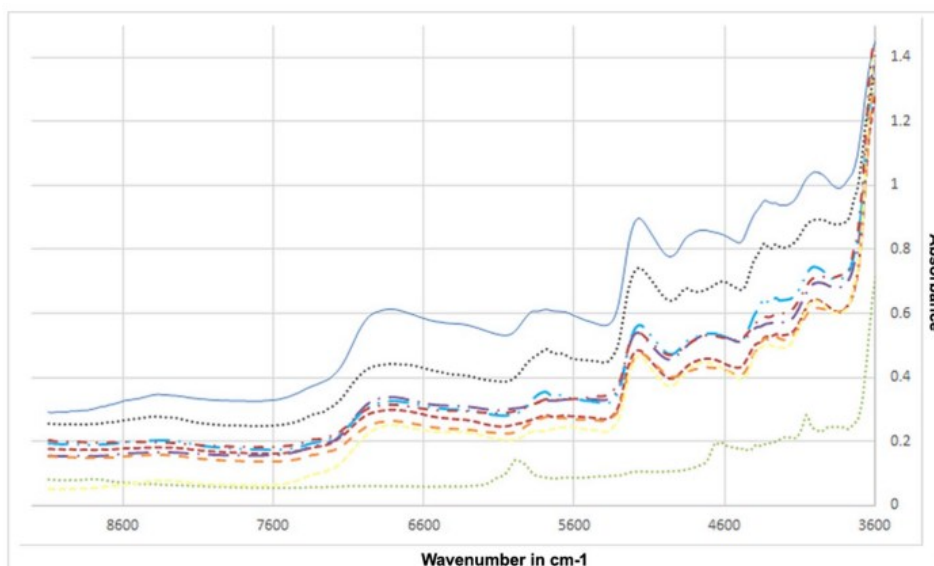


Figura 2-15: Spettri NIR grezzi, intervallo 9000-4000 cm^{-1} , di campioni rappresentativi di zafferano (linea continua blu); cartamo (linea quadrata rossa); stami di zafferano (rotonda a punti verde); buccia di melograno (linea tratteggiata lunga viola); paprika (linea tratteggiata lunga celeste); calendula (linea tratteggiata arancione); curcuma (linea quadrata gialla); ibisco (linea rosso mattone); estratto di zafferano esausto (linea tratteggiata tonda grigia) (Shawky, et al., 2020)

Solo dal confronto degli spettri tal quali si notano delle similarità; ad eccezione dell'estratto di zafferano esausto ottenuto dagli stimmi. La differenza ha suggerito al gruppo di ricerca l'ipotesi che possa essere dovuta alla bassa concentrazione di composti attivi nell'estratto.

Le bande caratteristiche nella regione del NIR sono nella regione 9000-4000 cm^{-1} , bande ben distinte ai numeri d'onda 5300-4900 e 400-6.300 cm^{-1} , e sarà proprio questa regione ad essere utilizzata per un'ulteriore preelaborazione con il fine di stabilire dei modelli di previsione, mentre nell'intervallo 1000-9.000 cm^{-1} vi sono poche informazioni e molto rumore di fondo.

Le bande nella regione 6000-5500 cm^{-1} spesso sono attribuite ai sovrattoni dello *stretching* C-H; 7000-6000 cm^{-1} a sovrattoni dello *stretching* di O-H e N-H; 4100-4000 cm^{-1} sono invece i sovrattoni dello *stretching* dei legami C-C; C-H e C-O.

Una volta che la spettroscopia è terminata, i dati risultanti sono analizzati con l'ausilio dell'analisi multivariata sostenuta dal software SIMCA-P+14 (Umemetrics AB, Umea, Svezia) con il fine di eliminare gli eventuali artefatti creati negli spettri NIR e correggere i comportamenti non lineari (è utilizzata la deviazione standard normale e la derivata prima).

I metodi di classificazione multivariati scelti sono: SIMCA e PLS-DA. L'analisi SIMCA è eseguita dopo che è stato costruito un modello PCA, utile per stimare le somiglianze tra i campioni, mentre il modello per la classificazione lineare (PLS-DA) è utile per verificare la presenza di adulterazione e discriminare i campioni adulterati dai non adulterati. L'analisi di regressione PLS è tentata per quantificare la quantità di ogni singolo adulterante nei campioni di stimmi di zafferano. Hanno utilizzato 15 campioni di zafferano intenzionalmente adulterati con ciascuno degli 8 adulteranti con un livello di concentrazione compreso nell'intervallo 10-400 mg.

Dall'approccio impiegato risulta che le tecniche di analisi multivariata dei dati vedono più somiglianze che differenze, tra i campioni. La capacità di autenticare lo zafferano è risultata buona, tutti i campioni sono correttamente identificati.

Nelle Fig. 2-16, 2-17 si può vedere l'applicazione del modello SIMCA, nella prima, e il modello PLS-DA, nella seconda.

Il modello SIMCA è applicato a tutti i campioni di zafferano e adulteranti; i risultati evidenziano la capacità di rifiutare gli adulteranti in base alla loro distanza dallo spazio della classe dello zafferano e che tutti i campioni di zafferano autentico sono correttamente accettati. La sensibilità risulta essere del 100% come anche la specificità per tutte le classi nella regione 9000-4000 cm^{-1} ; tutti i campioni non appartenenti alla classe target sono respinti.

Dalla seconda figura (Fig. 2-17) in cui si considerano gli adulteranti e le miscele oltre che allo zafferano puro si nota che anche qui la sensibilità è pari al 100%, non sono presenti falsi positivi. La specificità rilevata risulta del 100% per tutte le classi e la sensibilità superiore al 97%. La specificità delle miscele in quest'ultimo modello è del 99%.

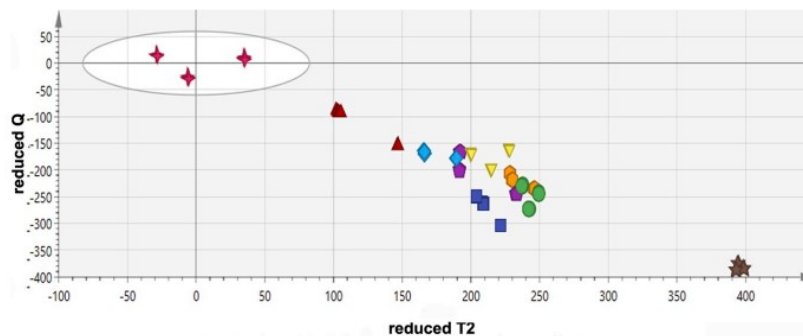


Figura 2-16: Modelli SIMCA di zafferano (non adulterato); la linea nera rappresenta la soglia di accettazione del modello della classe di interesse (zafferano). Il modello è applicato a tutti gli adulteranti nel set di prova. Calendula (cerchi verdi); curcuma (quadrati blu); stami di zafferano (triangoli rossi); ibisco (triangolo giallo rovesciato); paprika (rombo celeste); melograno (pentagono viola); cartamo (esagono arancione); estratto esausto di zafferano (stelle marroni) oltre ai campioni di zafferano (stelle rosse) (Shawky, et al., 2020)

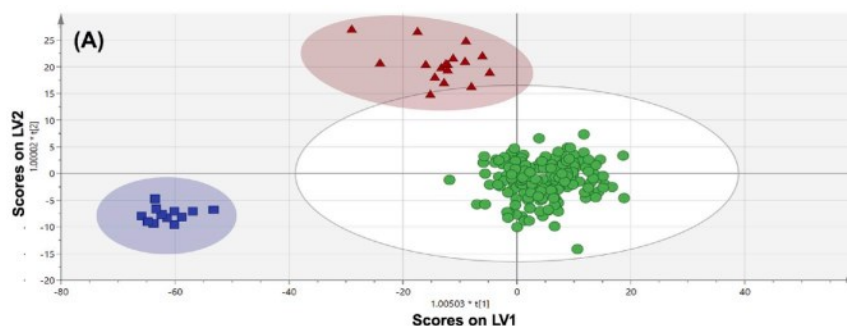


Figura 2-17: Modello PLS-DA applicato allo zafferano (non adulterato, quadrati blu); agli otto adulteranti (triangoli rossi) e alle miscele di adulterazione (adulterati, cerchi verdi) (Shawky, et al., 2020)

I modelli di quantificazione PLSR sono costruiti per i diversi adulteranti vegetali nei campioni miscelati con lo zafferano. Nella zona utile per gli altri modelli, $9000-4000\text{ cm}^{-1}$, se non si effettua un pretrattamento i risultati sono insoddisfacenti ed è per questo che è necessario, per migliorare i risultati, effettuare diversi pretrattamenti del segnale così da omettere la variabilità spettrale fuorviante e che non fornisce informazioni. Per un approfondimento si rimanda a (Shawky, et al., 2020).

In conclusione, il lavoro ha prodotto dei risultati interessanti. La tecnica di modellazione SIMCA si applica con successo all'autenticazione dello zafferano. L'analisi PLS-DA potrebbe essere in grado di discriminare efficacemente campioni puri e autentici da quelli intenzionalmente adulterati fino alla concentrazione del 10 mg/g di adulteranti, compresi gli stami e gli stimmi estratti esausti di zafferano.

I modelli costruiti risultano essere affidabili, ne è stata confermata l'affidabilità con metodi di valutazione interna ed esterna. Ciò porta a dire che l'analisi multivariata ha un grande potenziale se associata al NIR perché quest'ultima è una tecnica non distruttiva ed ecosostenibile sia per la capacità di autenticare in modo preciso gli stimmi sia per la rapidità nell'individuazione di prodotti contraffatti.

Anche (Ordoudi, et al., 2007) affronta la tecnica FT-IR. Per l'elenco dei campioni si rimanda al sottoparagrafo 2.4.1.3 relativo alle analisi spettrofotometriche UV-Vis.

Ogni campione è mescolato con bromuro di potassio in rapporto 1:180 (p/p) ed omogenizzato. La miscela, 0,181 g, è compressa a circa 200 MPa per 1 minuto; in questo modo si forma una compressa spessa. Per ogni campione si producono tre copie.

Hanno lavorato con uno Shimadzu IR Affinity-1 (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germania) per ottenere gli spettri FT-IR. Lo spettrometro opera nella regione 4000-400 cm^{-1} in assorbanza e a temperatura ambiente, 25°C. Per ogni spettro la risoluzione è pari a 4 cm^{-1} ed effettua 64 scansioni.

Il disco di KBr, senza campione, è utilizzato come "bianco" per le analisi; lo spettro che produrrà sarà sottratto alla pastiglia contenente il campione.

Gli spettri sono registrati con il software IR solution versione 1.50, fornito dallo stesso produttore.

Conseguiti i diversi spettri sono confrontati con quelli contenuti nel *database* fornito da LFCT FT-IR, sviluppato in ambito dell'azione COST FA 1101 e continuamente aggiornato, per la caratterizzazione e identificazione delle campioni. La raccolta dati contiene gli spettri (Tab. 2-9) dello zafferano autentico appartenente alle diverse categorie ISO, 16 coloranti sintetici e 4 specie vegetali spesso utilizzate come substrato per i coloranti artificiali e come sostituti dello zafferano.

Tabella 2-9: Spettri presenti nel database del LFCT FT-IR

Zafferano	Coloranti sintetici	Specie vegetali
Categorie ISO 3632:2011	Acido carminico	<i>Buddleja officinalis</i> Maxim
	Amaranto	<i>Calendula officinalis</i>
	Arancio II	<i>Carthamus tinctorius</i>
	Azorubina	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis
	Eritrosina	
	Giallo chinolina	
	Giallo di nitrantrene 2G	
	Giallo tramonto	
	Ponceau 4R	
	Rocellina	
	Rosso Allura AC	
	Sudan I-IV	
	Tartrazina	

Un altro gruppo di ricerca, (Bosmali, et al., 2017), affronta un caso studio relativo alla rilevazione di adulterazione ad opera della curcuma in campioni di zafferano. Nella curcuma ci sono un gruppo di molecole, i curcuminoidi, bioattive presenti negli estratti polari della spezia menzionata. Hanno provato ad utilizzare il metodo RP-HPLC-FLD per vedere se sia adatto o meno. In genere come si è visto in (Ordoudi, et al., 2007) l'HPLC è utile per separare i sucresteri della crocetina, i principali pigmenti nello zafferano. La scelta di utilizzare il detector a fluorescenza deriva dalla capacità di quest'ultimo di avere una maggiore selettività e sensibilità verso i curcuminoidi nelle miscele di campioni, molecole che hanno una risposta fluorescente derivante dalla propria struttura chimica.

I campioni utilizzati nel presente lavoro, anche per le analisi molecolari (sottoparagrafo 2.4.7), sono conservati a temperatura di -80°C fino al momento dell'estrazione del DNA, presenti nella Fig. 2-18.

Il singolo campione di zafferano utilizzato come base alle aggiunte di curcuma per l'analisi HPLC è fornito da un singolo produttore di Kozani (Grecia, 2004), campione che appartiene alla cat. I secondo la norma ISO 3632.

Oltre ai campioni vegetali lavorano anche con:

- *trans*-digentiobioside-crocetina (*trans*-crocetina 1); preparato dal laboratorio
- curcumina; miscela di curcumina, desmetossicurcumina, bisdesmetossicurcumina, purezza >95,0%, prodotto di Fluka-Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Sono prodotte 7 diverse miscele di *C. sativus* e *C. longa*. Le concentrazioni, espresse in p/p, sono: 0,5%; 1,0%; 2,0%; 10,0%; 15,0%; 25,0%; 50,0%.

Species	Material	No. of accessions/ samples	Locations/source ^a
<i>C. sativus</i> L.	Leaves	80 ^b	L1–L4
	Petals	4	L1–L4
	Stigmas	5	L1–L4
Other <i>Crocus</i> spp.			
<i>C. alarus</i>	Leaves	1	Athens, Greece (National and Kapodistrian University of Athens)
<i>C. laevigatus</i>		1	
<i>C. robertianus</i>		1	
<i>C. cansellatus</i> subsp. <i>mazziricus</i>		1	
<i>C. niveus</i>		1	
<i>C. nivalis</i>		1	
<i>C. olivieri</i>		1	
<i>C. pallasii</i> subsp. <i>pallasii</i>		1	
<i>C. borgi</i>		1	
<i>C. chrysanthus</i>		1	
<i>C. speciosus</i> subsp. <i>speciosus</i>	1		
<i>C. biflorus</i> subsp. <i>stridii</i>	1		
<i>C. tournefortii</i>	1		
<i>C. orphe</i>	1		
<i>C. goulimyi</i>	1		
<i>C. fleischeri</i>	1		
<i>C. biflorus</i> s.l	1		
<i>C. pulchellus</i>	1		
<i>C. hadriaticus</i>	1		
<i>C. cartwrightianus</i>	1		
<i>C. vehilius</i>	1		
<i>C. glivili</i> subsp. <i>balansae</i>	1		
<i>C. biflorus</i> subsp. <i>Melanthius</i>	1		
Other plant species			
<i>Curcuma longa</i> L.	Roots powder	1	Thessaloniki, Greece (Retail store)
<i>Calendula officinalis</i>	Leaves	1	US. Department of Agriculture
<i>Carthamus tinctorius</i> L.		1	
<i>Zea mays</i>		1	
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	Fruits powder	1	Zurich, Switzerland (Pharmacy store)

Figura 2-18: Elenco dei prodotti vegetali utilizzati. L1: campioni 1-20, L2: campioni 21-40, L3: campioni 41-60, L4 campioni 61-80; reperiti in diverse località a Kozani, Grecia (Bosmali, et al., 2017)

I cromatogrammi della figura 2-19 evidenziano chiaramente come il detector a fluorescenza, rispetto al DAD, sia in grado di rilevare a 426 nm (lunghezza d'onda in eccitazione, λ_{ecc}) e a 540 nm (lunghezza d'onda in emissione, λ_{em}) le molecole appartenenti ai curcuminoidi rispetto a quelle della crocetina; ciò apre le porte alla possibilità di utilizzo del FLD per riconoscere le adulterazioni dello zafferano con la curcuma.

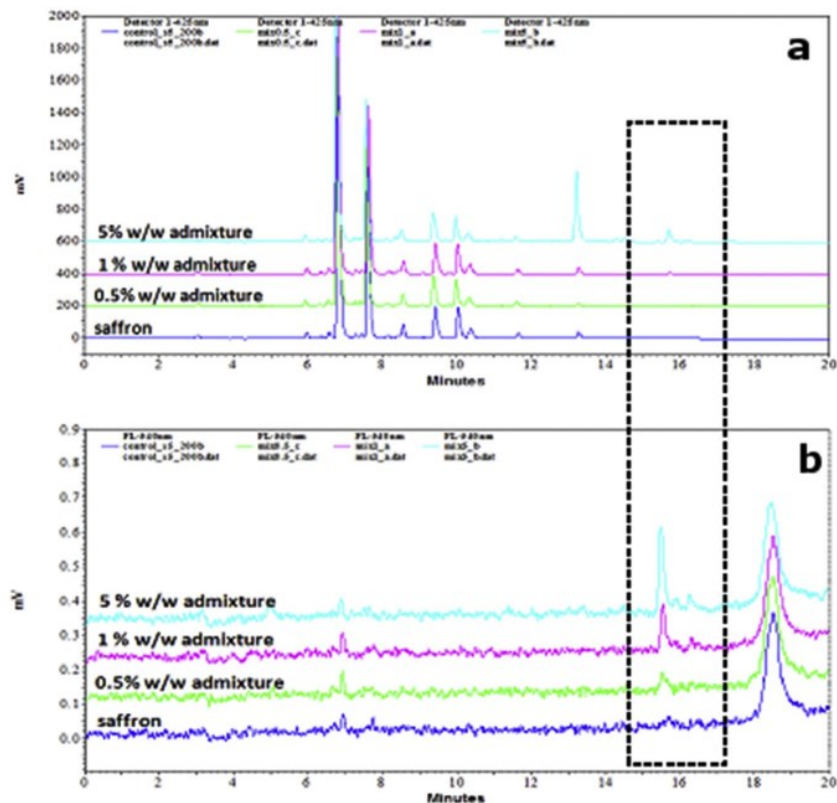


Figura 2-19: Cromatogrammi HPLC di estratti di acqua-metanolo dello zafferano con la curcuma a tre diverse concentrazioni (0,5; 1,0; 5,0% p/p) e con le miscele di adulteranti utilizzando (a) DAD a 425 nm e (b) FLD a 426 nm (λ_{ecc}), 540 nm (λ_{em}) (Bosmali, et al., 2017)

Lo standard di curcumina, disponibile in commercio, è risultato contenente tutti e tre i curcuminoidi che sono riportati in etichetta. La linearità della risposta per i curcuminoidi totali e della curcumina è testata con il detector a serie di diodi e a fluorescenza.

Il campione di curcuma polverizzato, utilizzato come adulterante, è risultato contenere $23,4 \pm 4,4$ mg di curcuminoidi totali per grammo di prodotto.

L'analisi di un estratto di zafferano autentico ha dato un falso positivo per i curcuminoidi, ipotesi di presenza di altri pigmenti endogeni dello zafferano; effetto matrice.

Sempre guardando la figura 2-19, nessuno dei 2 detector, DAD e FLD, è in grado di identificare la presenza dell'adulterante alla concentrazione di 0,5%, l'FLD ha facilmente rilevato concentrazioni dell'1% in peso di adulterante nelle miscele, mentre il DAD è riuscito a rilevare chiaramente la curcuma solo in campioni con una percentuale di adulteranti pari al 5%.

I curcuminoidi totali negli estratti contenenti l'1,0% e il 5,0% di curcuma risultano essere $0,76 \pm 0,04$ e $1,18 \pm 0,02$ mg/g di zafferano, rispettivamente. Tenendo conto dell'effettiva

concentrazione, circa 2% p/p, della curcuma nel campione i valori suggeriscono che la determinazione quantitativa dei composti caratteristici della curcuma nello zafferano adulterato è più accurata tanto più la concentrazione si distanzia dall'1% rispetto allo zafferano.

Sono in grado di dire che, a seguito dei risultati ottenuti, la determinazione di curcuminoidi nello zafferano adulterato con concentrazioni molto basse di curcuma è molto difficile. Il protocollo HPLC proposto può essere applicato con successo per identificare i curcuminoidi con concentrazioni superiori all'1%, espresso in peso. Per la determinazione accurata, la curcuma dovrebbe superare i 3 mg/g di zafferano. Ciò è realistico visto che le quantità degli adulteranti devono essere relativamente elevate per essere redditizie nelle frodi.

2.4.3 Gas cromatografia (GC)

La gas cromatografia è utile per valutare l'identità dei composti volatili nello zafferano di differenti origini per mezzo di *marker* che ne permettono la differenziazione geografica (Kiani, et al., 2018).

Nel 2019 la gas cromatografia è stata applicata per definire l'autenticità dello zafferano. (Morozzi, et al., 2019) ha portato avanti lo studio utilizzando la gas cromatografia dello spazio di testa (HS-GC). Il suo obiettivo è definire i profili cromatografici per ottenere delle *fingerprint* chimiche che caratterizzino le spezie aromatiche, come lo zafferano e i suoi adulteranti. I composti volatili sono una variabile molto importante nella valutazione dell'autenticità di *C. sativus*.

L'opera scientifica vede l'applicazione combinata della gas cromatografia flash dello spazio di testa con rilevazione a ionizzazione di fiamma (HS-GC-FID), utilizzando un Heracle II (Alpha Mos, Tolosa Francia) perché in grado di dare cromatogrammi rapidamente e senza la necessità di pretrattare il campione, associato alle tecniche chemiometriche. Le *fingerprint* cromatografiche sono utilizzate per modellarle chemiometricamente così da poter rilevare l'eventuale adulterazione della spezia.

Sono utilizzati come adulteranti la calendula e la curcuma.

Campioni:

- 3 "campioni di prova": zafferano puro, calendula e curcuma

Non esistono standard certificati ad eccezione dei pistilli di zafferano, per cui i campioni dei set di prova sono acquistati in negozi alimentari. L'affidabilità di poter essere considerati standard deriva dall'applicazione di metodi chemiometrici. Tutti i campioni sono prelevati nello stesso periodo, aprile 2017, in supermercati, erboristerie e orti botanici in Emilia-Romagna, Italia. Altra cosa di cui tengono

conto è l'arrivo dei prodotti ai centri di vendita; fanno attenzione che i prodotti acquistati non siano arrivati prima di un mese dall'acquisto.

Lo zafferano puro è acquistato dal supermercato e risulta essere certificato dall'autorità di certificazione SGS. Perciò non sono necessarie ulteriori analisi descritte nell'ISO 3632 perché i campioni sono controllati prima della commercializzazione e vendita.

La curcuma pura deriva dall'acquisto diretto dal produttore "Filiera Agricola di Santerno" (Imola, Bologna, Italia), mentre la calendula è raccolta dal "Giardino delle Erbe di Caola Valsenio" (Ravenna, Italia).

- 61 "campioni di calibrazione": 28 di zafferano, 19 di calendula e 14 di curcuma
Sono acquistati dai laboratori di Coop Italia, catena di supermercati in Italia che dispone di laboratori interni di controllo qualità alimentare.

Tutti i campioni, campioni di prova e di calibrazione, sono tenuti al buio e a bassa temperatura fino al momento delle analisi.

Non sono necessari pretrattamenti per lo zafferano e la curcuma dei campioni di calibrazione, mentre i campioni di fiori di calendula sono sottoposti a macinazione con l'Ultra Turrax tube Driver (IKA, Staufen im Breisgau, Germania) insieme a 10 sfere di acciaio inossidabile, diametro di 5 mm nella provetta in plastica, con tappo, da 20 ml. La polverizzazione è a 6000 rpm per 5 minuti.

I 3 campioni di prova individuati come pure_SF, zafferano; pure_TR, curcuma; pure_MR, calendula, sono utilizzati per creare 8 miscele artificiali a diverse concentrazioni, in modo da simulare adulterazioni parziali dello zafferano. In figura 2-20 si riportano le concentrazioni utilizzate e i relativi codici.

Test Samples	% _{w/w} of Saffron Adulteration	Code
Pure Saffron	-	pure_SF
Pure Turmeric	-	pure_TR
Pure Marigold	-	pure_MR
saffron + turmeric	5	SFTR_5
	10	SFTR_10
	15	SFTR_15
	20	SFTR_20
saffron + marigold	5	SFMR_5
	10	SFMR_10
	15	SFMR_15
	20	SFMR_20

Figura 2-20: Elenco dei campioni utilizzati come standard esterni (Morozzi, et al., 2019)

I campioni puri e le miscele sono utilizzati per la LDA e PLS-DA.

La procedura di analisi prevede che da tutti i campioni, i set di calibrazione ed i set di prova, sia prelevata un'aliquota di 30 ± 3 mg e posta in una vial di vetro da 20 ml e sigillata con un tappo magnetico.

Ogni campione è preparato in quadruplica copia cosicché si possa valutare la ripetibilità e la riproducibilità del metodo oltre che per aumentare i gradi di libertà nell'analisi statistica.

Le corse cromatografiche sono eseguite presso i laboratori di Coop Italia con l'Heracles II. È un gas cromatografo dotato di:

- 2 colonne cromatografiche capillari, lavorano in parallelo; 1 colonna non polare (MXT5: 5% difenile e 95% metilpolisilossano, lunghezza di 10 m e diametro di $180 \mu\text{m}$) e 1 colonna leggermente polare (MXT1701: 14% cianofenilpropile e 86% metilpolisilossano, lunghezza 10 m e diametro di $180 \mu\text{m}$)
- 2 FID alla fine di ogni colonna
- Autocampionatore HS 1000 (CTC Analytics AG Zwingen, Svizzera) gestito dal software Alphasoftware v12.4 (AlphaMos, Tolosa, Francia). È in grado di gestire con lo stesso programma fino a 96 campioni
- Trappola adsorbente solida Tenax (Tenax, SPA, Verona, Italia), posta prima delle colonne cromatografiche. Mantenuta a 40°C per 65 secondi mentre il gas carrier (H_2) eluisce per poi essere riscaldata a 240°C e a 60KPa così da assorbire le molecole volatili nella trappola e concentrare gli analiti per rimozione di aria ed umidità in eccesso.
- Valvola rotatoria che permette l'introduzione del campione in colonna

Il gas carrier è prodotto da un generatore di idrogeno ad alta purezza, Alliance (F-dgsi, Evry, Francia).

Le vials di campione sono poste in un forno dotato di agitazione a 50°C e 500 rpm per 20 secondi in modo che le sostanze volatili volatilizzino nello spazio di testa del contenitore e grazie all'azione dell'autocampionatore si preleverà un'aliquota di 5000 μl forando il setto di silicone della vial.

I parametri dell'analisi cromatografica sono scelti dopo una fase di ottimizzazione, in questo modo si evitano problemi di bassa sensibilità, bassa risoluzione dei picchi e rumore di fondo elevato.

I suddetti parametri sono:

- Velocità iniezione: 100 μ l/s
- Temperatura iniettore: 200°C
- Temperatura di iniziale della colonna: 40°C mantenuta per 2 secondi ed incrementata alla temperatura finale, 270°C, a 3°C/s
- Temperatura finale della colonna: 270°C mantenuta per 21 secondi
- Tempo totale di acquisizione: 100 secondi
- Tempo di digitalizzazione del segnale: ogni 0,01 secondi

Per ottimizzare il tempo di analisi, mentre un campione è iniettato gli altri sono posti in agitazione e riscaldati, tutto il sistema è automatizzato, non vi è la necessità del personale. Lo stesso programma riesce a supportare 96 campioni permettendo anche di ridurre i tempi complessivi di analisi.

Nelle figure 2-4 si riportano come esempio dei cromatogrammi di zafferano, curcuma e calendula, ottenuti con le due diverse colonne cromatografiche.

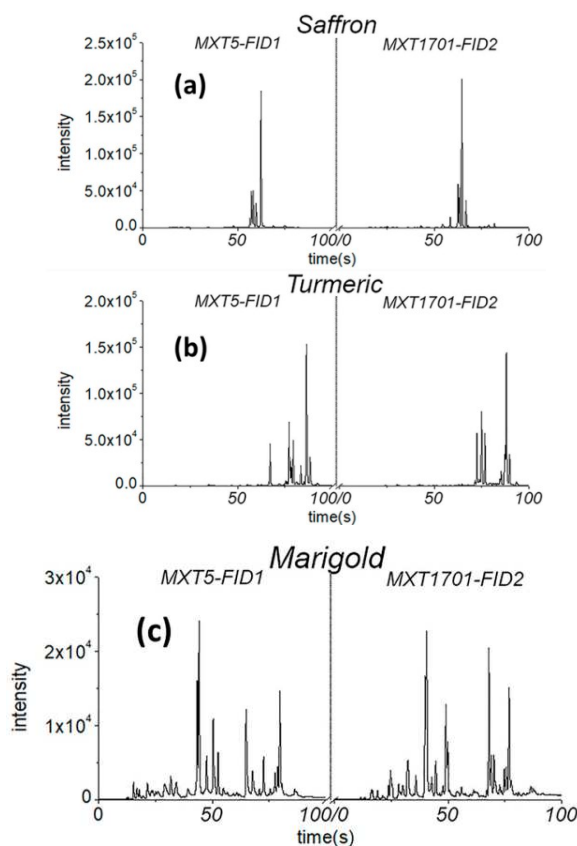


Figure 2-4: Profili gas cromatografici rappresentativi dello zafferano (a), della curcuma (b) e della calendula (c) ottenuti con lo strumento Eracle II. I cromatogrammi della colonna MXT5 (parte sinistra della figura), mentre i cromatogrammi della colonna MXT1701 (parte destra) (Morozzi, et al., 2019)

Una volta acquisiti i dati e classificati secondo l'identità dei campioni sono sviluppati dei set di dati per intensità, corrispondenti ai cromatogrammi completi, e dati di area, corrispondenti all'area di picco, grazie al software Alphasoft v12.4. Questi valori sono importanti per le analisi chemiometriche basate su modelli LDA e PLS-DA, aree di picco e intensità, rispettivamente. La metodica prevede che siano eliminati i valori anomali, mediante analisi PCA, con un livello di confidenza del 95% per poi solo i dati statisticamente significativi sono sottoposti a LDA e PLS-DA. Entrambi i modelli sono confermati con la convalida incrociata interna. Gli 11 campioni di prova non sono utilizzati per la creazione dei modelli.

Le conclusioni tirate dal gruppo di ricerca vedono la strategia non mirata, cioè una strategia in cui non è d'interesse associare i picchi cromatografici rilevati ai relativi VOC, basata sull'applicazione combinata di flash HS-GC-FID con la chemiometria nello zafferano, risulta essere un metodo di *screening* rapido, meno di 20 minuti per singolo campione e i 96 campioni possono essere inseriti contemporaneamente nell'autocampionatore, e a basso costo.

I benefici appurati sono differenti: non è necessario pretrattare il campione se non con una rapida macinazione, si riduce la probabilità di contaminazione del campione prima dell'analisi GC e l'analisi è completamente automatizzata. I modelli chemiometrici utilizzati hanno una buona capacità di calibrazione, possibile grazie alla validazione incrociata, e la buona capacità di previsione grazie alla precedente progettazione basata su campioni di prova esterni che simulano il prodotto adulterato con i due vegetali, curcuma e calendula. È in grado di rilevare concentrazioni di adulteranti persino a valori sotto al 3%, in peso, ciò è al di fuori dei limiti di rilevazione del metodo normato basato sulla spettrofotometria UV-Vis, e importantissimo è che l'approccio chemiometrico non necessita dell'identificazione dei composti volatili per creare un modello necessario per l'individuazione di zafferano adulterato.

Se si confrontano i modelli PLS-DA e LDA, entrambi hanno dà buoni risultati sia per le prestazioni che nella determinazione delle adulterazioni dello zafferano simulate con i campioni di prova. In realtà, il modello PLS-DA mostra alcune incertezze e sovrapposizioni tra zafferano e calendula, mentre pure_MR e pure_SF sono classificati correttamente. Al contrario, l'LDA non mostra sovrapposizioni delle classi ed è migliore, rispetto altro modello, nell'identificazione dei campioni di prova puri. Entrambi, inoltre, hanno una buona capacità di discriminazione della classe "curcuma".

I due modelli si comportano similmente per le miscele create artificialmente, mostrano delle incertezze per le classi zafferano/calendula.

2.4.4 Cromatografia liquida (LC)

Il lavoro di (Guijarro-Díez, et al., 2017), riportato come esempio anche nell'articolo di (Kiani, et al., 2018), adoperano come adulterante la gardenia e come indicatore di adulterazione il geniposide, molecola appartenente al gruppo dei glicosidi iridoidi di cui fanno parte anche il gardenoside, gardoside e scandoside metil estere, che risulta avere concentrazioni nei prodotti commerciali pari al 35,9% (Carmona, et al., 2006). Dall'analisi risulta che il metodo è in grado di separare contemporaneamente i kaempferoli glicosilati e il geniposide, con un minimo di adulterazione rilevabile pari allo 0,2%, perciò adatto al controllo qualità.

I metodi descritti nella normativa ISO 3632:2011 come anche l'uso di marcatori del DNA negli studi metabolomici non mirati (metodi approfonditi nel sottoparagrafo 2.4.7) non consentono l'identificazione dell'adulterazione a carico degli estratti di *Gardenia jasminoides* Ellis L., come riporta (Guijarro-Díez, et al., 2017). L'adulterazione in cui vi è l'utilizzo della gardenia è nuova e più sofisticata; per di più è difficile da determinare perché condivide con lo zafferano un gran numero di crocine e flavonoidi, molecole responsabili del colore giallo. Da alcuni studi emerge che il geniposide a seguito di idrolizzazione produce genipina aglicone, molecola che possiede genotossicità; ed è per questo che c'è l'esigenza di rivalutare la sicurezza della gardenia stessa. Tra le molecole rintracciate sono nella gardenia si hanno ad esempio il linalolo e il borneolo, precursori dell'aroma, sono diversi da quelli rinvenuti nello zafferano (Schumacher, et al., 2016). L'adulterazione è a carico dello zafferano in polvere, struttura che ne facilita l'impiego di altre sostanze estranee. Insieme all'analisi LC per la determinazione della gardenia come adulterante (Guijarro-Díez, et al., 2017; Carmona, et al., 2006) si sta iniziando a utilizzare l'NMR (Soffritti, et al., 2016) e l'analisi molecolare (Bosmali, et al., 2017), metodi che saranno approfonditi nelle prossime sezioni.

La gardenia presenta diversi costituenti, tra i principali, i glicosidi iridoidi. Gruppo di molecole dove il geniposide è considerato il principale, ma è seguito da: gardenoside, genipina-1- β -gentiobioside, acido geniposidico, acetilgeniposide e gardoside. Il geniposide è individuato come molecola *marker* data l'assenza in *C. sativus*, permette se sovrapposti i cromatogrammi di riconoscere campioni adulterati con l'estratto di gardenia, più economico. In realtà, per la determinazione di questo composto, presente nei frutti della gardenia, si stanno sviluppando delle metodiche che utilizzano l'HPLC e l'elettroforesi capillare (CE); metodiche ancora non applicate alla spezia, ma nel futuro potrebbero consentirne il riconoscimento.

L'obiettivo principale di (Guijarro-Díez, et al., 2017) consiste nello sviluppare una metodologia LC-MS sensibile alla determinazione del geniposide, nell'estratto di *Gardenia*

jasminoides Ellis, come *marker* di adulterazione in *C. sativus* cosicché possa essere uno strumento della AQ da adottare nelle analisi di routine. Inoltre, come già detto, la difficoltà maggiore di riconoscere la presenza dell'estratto di gardenia è dovuta proprio alle numerose molecole che condivide con la spezia (Petraakis, et al., 2015).

Il gruppo utilizza diversi campioni e prodotti chimici; quest'ultimi riportati nella tabella 2-10 sottostante.

Nello specifico i campioni sono:

- 8 campioni tra stimmi e polvere di zafferano autentico, provengono dall'Iran e dalla Spagna, forniti da "Carmencita" (Alicante, Spagna)

Controllati secondo la norma ISO 3632 per definirne la categoria commerciale d'appartenenza, sono risultati essere di cat. I

Il numero di campioni è relativamente basso perché ne è stata garantita l'autenticità e l'origine.

- 1 estratto di gardenia in polvere in cui si stima che il contenuto in geniposide sia di circa 37,5 mg/g di estratto
- 10 campioni, tra stimmi e polvere, di zafferano sospetto di adulterazione per il loro basso costo e/o discutibile origine. Sempre forniti dalla società "Carmencita"

Tabella 2-10: Elenco dei prodotti chimici adoperati nel corso delle analisi

Prodotti chimici	Venditore dei prodotti chimici/ strumentazione
<i>Acetonitrile di grado analitico</i>	Sharlab (Barcellona, Spagna)
<i>Acido formico di grado analitico</i>	Sharlab (Barcellona, Spagna)
<i>Etanolo di grado analitico</i>	Sharlab (Barcellona, Spagna)
<i>Acqua distillata purificata con sistema di purificazione MilliQ ULTRA</i>	Millipore (Bedford, MA, USA)
<i>Standard di geniposide, purezza 88%</i>	Sigma (St. Louis, MO, USA)
<i>Formiato d'ammonio</i>	Sigma (St. Louis, MO, USA)
<i>Acetato d'ammonio</i>	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Lo standard di geniposide è solubilizzato in acetonitrile fino a concentrazione finale di 1 mg/ml. Si conserva a 4°C e sono ricavate diverse aliquote diluite con acqua distillata purificata con lo scopo di ottenere diverse soluzioni a concentrazioni differenti dell'analita.

Gli stimmi di zafferano sono finemente macinati in un mortaio con delle sfere di acciaio inox con l'Ultra Turrax (IKA, Staufen, Germania) per 2 minuti. Un'aliquota, 0,3 g, macinata o in polvere di zafferano e l'estratto di gardenia sono estratti, in condizioni ottimizzate, con 25

ml si etanolo/tampone borato (50:50 %v/v) a pH 9. L'estrazione è facilitata dall'utilizzo di ultrasuoni per 15 minuti a temperatura ambiente.

Il passo successivo prevede la centrifugazione per 15 minuti a 25°C e a 4000 rpm in modo tale da suddividere il surnatante dalla frazione solida e poterlo diluire, 1/50, con acqua distillata purificata. La soluzione è ultrafiltrata con filtro *cut-off* da 3 KDa (American Ultra Filtrrs, Merck, Darmatardt, Germania), così da rimuovere carboidrati e proteine.

Le soluzioni così preparate sono conservate a 4°C e riscaldate a temperatura ambiente prima del loro utilizzo.

Le analisi LC utilizzano:

- sistema LC serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) accoppiato a uno spettrometro di massa tramite sorgente di ionizzazione elettrospray, ortogonale ESI-MS, con tecnologia di focalizzazione termica Jet Stream
- detector a quadrupolo a tempo di volo (QTOF) (serie 6530 Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) per il rilevamento dei frammenti
- il controllo della massa, dell'acquisizione dei dati e dell'analisi dei dati è a carico del software Agilent Mass Hunter B.070.00

Il cromatografo ha 2 colonne: Anstentis Express Fused-core C₁₈ e l'altra Cyano, fornite da Sigma (St. Louis, MO, USA). Entrambe da 100x2,1 mm con un nucleo fuso e un guscio poroso da 0,5 mm di spessore, le particelle che le compongono sono da 2,7 mm. Prima delle colonne stesse sono presenti le pre-colonne (Ascentis Express, Sigma) C₁₈ e Cyano, rispettivamente, con dimensioni di 5x2,1 mm.

Sia se le corse vengano prodotte in condizioni isocratiche che in gradiente di concentrazione:

- portata: 0,4 ml/min
- volume di iniezione: 5 ml
- temperatura di 40°C
- fase mobile costituita da: (A) acqua e acido formico allo 0,1% e (B) acetonitrile e acido formico allo 0,1% nel caso si tratti di un'eluizione con gradiente di concentrazione (da 5 al 17,5 % di B in 10 minuti) o nel caso di eluizione isocratica acqua/acetonitrile (85:15, %v/v) contenente lo 0,1% di acido formico. In figura 2-21 si mostrano le due tipologie di eluizione.

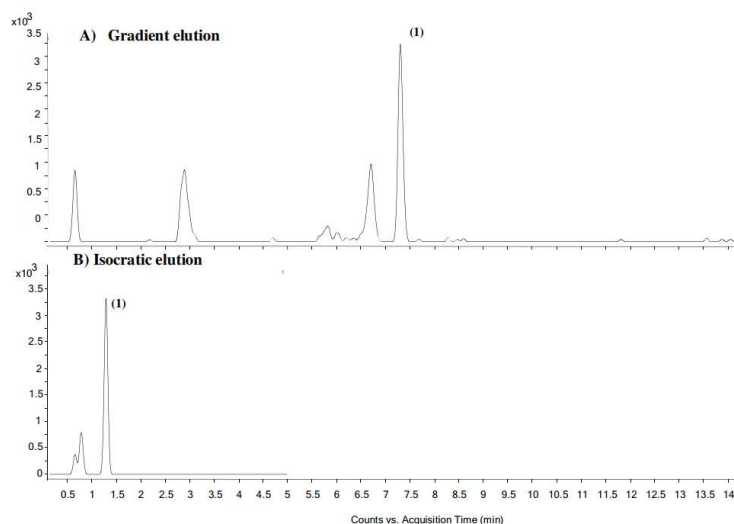


Figura 2-21: Confronto del profilo LC-MS ottenuto per il cromatogramma dell'estratto di geniposide da un campione di zafferano autentico adulterato con 10 ng/ml di geniposide standard in una colonna C_{18} con eluizione a gradiente (A) ed eluizione isocratica (B) (Guijarro-Díez, et al., 2017)

Hanno optato per condurre le analisi l'eluizione isocratica perché permette di ridurre i tempi di analisi da 7,2 minuti a 1,4 minuti senza una significativa perdita del segnale di geniposide (acqua/acetonitrile 85:15 v/v + 0,1% acido formico alla portata di 0,4 ml/min).

L'analisi MS è eseguita in modalità ESI positiva o negativa. Con un range m/z di 100–1700, in modalità di scansione completa con una velocità di acquisizione di 2 spettri al secondo. La risoluzione massima superiore è di 5000 sui frammenti con rapporto massa/carica di 118 e di 10000 per i frammenti con 1152 m/z; sono in accordo con le specifiche strumentali.

Le condizioni dello spettrometro di massa, in uno studio preliminare prevede:

- tensione capillare: 3000 V
- tensione dell'ugello: 0 V
- condizioni del gas di essiccazione: 10 l/min a 300°C
- pressione del nebulizzatore: 1,7 bar
- condizioni del gas di guaina: 6,5 l/min a 300°C
- frammentatore: 150V
- separatore: 60V
- tensione dell'ottapolo: 750V

Una volta scelta la polarità ESI e ottimizzati i parametri della massa le condizioni scelte sono:

- modalità ESI negativa
- tensione capillare: 3500 V

- tensione dell'ugello: 500 V
- condizioni del gas di essiccazione: 10 l/min a 350°C
- pressione del nebulizzatore: 1,7 bar
- condizioni del gas di guaina: 7,5 l/min a 350°C
- frammentatore: 150V
- separatore: 60V
- tensione dell'ottapolo: 750V

La scelta di utilizzare la modalità negativa per rilevare il geniposide deriva da uno studio che ha prodotto risultati quali l'assenza di frammentazione e un rapporto S/N quattro volte maggiore rispetto alla controparte positiva.

Per riuscire a far sì che la massa riconoscesse giustamente i frammenti, che si sarebbero prodotti, è attuata una taratura esterna TOF-MS utilizzando una miscela commerciale fornita da Agilent Technologies con valori di m/z compresi tra 112, 985587 e 1633, 949786 oltre ai rapporti massa carica per l'ESI positivo di m/z: 121,0508 (C₅H₄N₄) e 922,0097 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄); per l'ESI negativo rapporti di 112 ,9856 (C₂O₂F₃(NH₄)) e 966,0007 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄ + formiato). Le masse di riferimento della miscela sono analizzate durante tutta l'analisi in modo che ci sia sempre la corretta correzione delle masse, permettendo così di ottenere delle masse precise.

La metodologia LC-MS sviluppata è validata in termini di linearità, limite di rilevamento (LOD), limite di quantificazione (LOQ), accuratezza e precisione. La linearità è valutata utilizzando il metodo di calibrazione dello standard esterno: utilizzate 5 concentrazioni differenti per la calibrazione, da 0,8 a 8 mg/ml dello standard del geniposide commerciale. I dati ottenuti sono soddisfacenti perché il coefficiente di correlazione è maggiore di 0,99 e l'intervallo di confidenza è uguale a 0,95. Inoltre, il test ANOVA permette il confronto dei dati sperimentali. La calibrazione è portata avanti con il metodo delle aggiunte standard, effettuata utilizzando due tipi di campioni: zafferano autentico e zafferano autentico con il 50% di estratto di gardenia; entrambi sono analizzati inserendo i campioni contenente geniposide nell'intervallo di concentrazione 0-6 mg/ml e ogni campione è iniettato in duplicato. I valori di LOD e LOQ sono determinati come concentrazione di geniposide e rispettivamente assumono i valori nel rapporto S/N di 3 e 10. Il LOD del geniposide è pari a 10 ng/ml mentre il LOQ è di 30 ng/ml. L'accuratezza del metodo analitico è verificata valutando il recupero ottenuto per il geniposide quando il campione di zafferano autentico è addizionato con lo standard del geniposide pari a 1 mg/ml. La precisione è valutata considerando la ripetibilità strumentale e la precisione intermedia. La ripetibilità strumentale è determinata con tre

iniezioni consecutive di soluzioni standard di geniposide, a due differenti concentrazioni: 0,8 e 1,8 mg/ml, e il campione di zafferano autentico adulterato al 10% e al 90% con l'estratto di gardenia. La precisione intermedia è ottenuta iniettando tre repliche per due giorni consecutivi dei campioni utilizzati anche per la ripetibilità strumentale. Le deviazioni standard relative (RSD), riferite alla ripetibilità strumentale, sono inferiori a 1,5% rispetto alle aree del picco, mentre le RSD, riferite alla precisione, sono inferiori all'1,8% per le soluzioni standard e 2,9% per i campioni di zafferano. Per migliorare ulteriormente il rapporto S/N sono ottimizzati i parametri ESI, parametri che dipendono dalla portata della fase mobile, dalla stabilità termica dell'analita, dalla composizione del campione e dalle caratteristiche dell'analita stesso. L'ottimizzazione è prodotta utilizzando un campione di zafferano adulterato con il 5% di estratto di gardenia. Però, a concentrazioni fino a 73 mg/ml di estratto di gardenia si ha la saturazione del segnale MS e ciò comporta che anche il protocollo di estrazione richiede l'ottimizzazione: si utilizza come solvente di diluizione 25 ml, invece di 6 ml, di etanolo: tampone borato (50:50 v/v) a pH 9.

Le soluzioni sono diluite di 5; 10; 50 volte. Le soluzioni ottenute sono testate sulla frazione surnatante dopo che è stata eseguita l'estrazione e la centrifugazione sia per i campioni di zafferano e che per gli estratti di gardenia. Le soluzioni diluite 50 volte permettono alla massa di non saturarsi con il geniposide, anche con gli estratti di gardenia, e di avere comunque un'intensità del segnale con una sensibilità sufficiente a determinare il geniposide.

Una volta definita la polarità e i parametri dell'ESI, la composizione della fase mobile e il protocollo di estrazione i risultati ottenuti con la colonna C₁₈ sono confrontati con la Cyano.

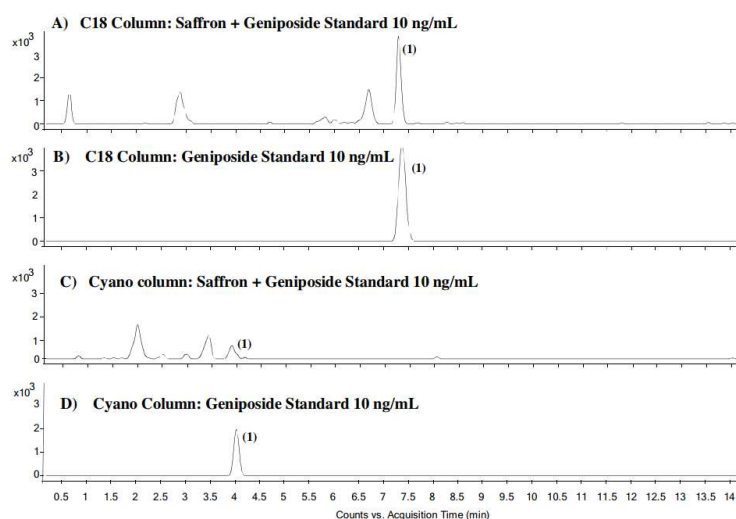


Figura 2-22: Confronto delle corse cromatografiche utilizzando le due colonne C₁₈ (A e B) e Cyano (C e D) per i campioni miscelati, zafferano + standard e il singolo standard, geniposide (Guijarro-Díez, et al., 2017)

Dal confronto dei diversi cromatogrammi in Fig. 2-22 si nota che la colonna C₁₈ presenta una migliore ionizzazione del geniposide, forse dovuto a una maggiore tempo di ritenzione. Si verifica una significativa perdita di segnale del geniposide quando un campione di zafferano autentico, estratto utilizzando le stesse condizioni per la polvere di gardenia, contenente 10 ng/ml di geniposide è stato analizzato con la colonna Cyano, forse dovuto proprio all'effetto matrice. A seguito di questo risultato hanno optato per la colonna C₁₈ per ulteriori studi.

Ottimizzato il metodo hanno analizzato 18 campioni reali di zafferano:

- 8 campioni di zafferano autentico
- 10 campioni di zafferano con sospetto di adulterazione

Tutti questi campioni sono estratti secondo il protocollo visto in precedenza. I risultati sono soddisfacenti. In nessuno dei campioni di zafferano autentico analizzato è ritrovato il geniposide, mentre situazione differente per gli altri 10 campioni. In 7 dei 10 campioni analizzati non è rilevata la presenza del *marker*, negli altri 3 le concentrazioni di geniposide sono di 5,90±0,01; 13,2±0,2; 15,30±0,01 mg/g di campione; sono campioni in polvere e questo, dimostra come l'adulterazione avviene principalmente quando lo zafferano si trova in questa forma proprio perché l'estratto di gardenia è difficilmente percepibile.

2.4.5 Naso elettronico, mucosa elettronica e lingua elettronica

Il sistema *e-nose* è uno strumento progettato per rilevare e discriminare gli odori complessi utilizzando una serie di sensori che mimano la risposta olfattiva dei mammiferi agli aromi (Heidarbeigi, et al., 2015; Kiani, et al., 2018). Il primo lavoro di simulazione è del 1982. È costituito da 3 elementi principali:

- sistema di manipolazione del campione
- sistema di rilevamento o *array* di sensori
- modelli di elaborazione dei dati per la classificazione e la previsione

Gli *array* di sensori sono sensori aspecifici, di solito costituiti da ossidi metallici trattati con diverse sostanze chimiche, che a seguito dell'esposizione alle molecole volatili e a prodotti chimici generano una *fingerprint* specifica olfattiva. Ogni *fingerprint*, corrisponde ad un profilo di aromi noti e permette di costruire una banca dati tale utile per la classificazione e identificazione degli aromi sconosciuti (Kiani, et al., 2018). Nella figura 2-23 si riporta lo schema sintetico del sistema.

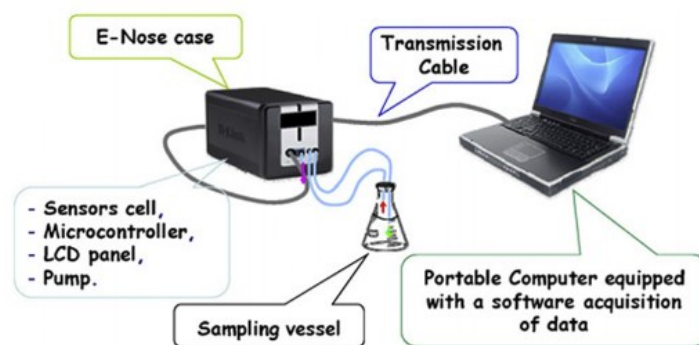


Figura 2-23: Schema sintetico del sistema "naso elettronico" (Kiani, et al., 2018)

Tra i diversi utilizzi riportati da (Kiani, et al., 2018), ad esempio, si impiega nella valutazione dell'identità dello zafferano, per chiarire le origini di coltivazione, ma non ancora per definire un'eventuale adulterazione (Heidarbeigi, et al., 2015); il sistema si basa su sensori di ossidi. I dati sono analizzati con la PCA. Oppure, lo stesso autore scrive che per discriminare lo zafferano puro da campioni adulterati dato che si producono delle *fingerprint* dell'aroma specifiche è possibile discriminare lo zafferano da cartamo, zafferano con stili gialli e stigmidi di mais colorati; metodo che riesce a definire la presenza di adulterazione per valori di concentrazione superiori al 10% con successo. In un lavoro dell'anno precedente a questa pubblicazione, un nuovo studio affronta il sistema portatile *e-nose* per determinare la forza dell'aroma dello zafferano alla lunghezza d'onda di 330 nm, lunghezza specifica del safranale. Il lavoro del 2018 utilizza 33 campioni di zafferano la cui intensità dell'aroma è definita secondo la ISO 3632, ma applica anche la PCA per selezionare le caratteristiche dell'aroma e avere una previsione di $A_{1cm}^{1\%}$ (330 nm) utilizzando dei modelli di rete neurale come: Multilayer Perception (MLP), Radial Basis Function (RBF). Fa uso sia delle risposte dei sensori del naso elettronico e dei dati spettrali. Quindi, la valutazione della forza dell'aroma dello zafferano, in conclusione risulta essere una tecnica veloce, non distruttiva ed *on-line* (Kiani, et al., 2018).

I vantaggi notevoli permettono l'impiego dell'*e-nose* nelle analisi di routine delle industrie alimentari per la sua precisione, rapidità, riconoscimento rapido dei microrganismi indesiderati, determinazione della *shelf-life* e identificazione rapida del decadimento del prodotto; diversi studiosi hanno applicato la tecnica a prodotti come olio di girasole, di mais, di sesamo, tè e caffè. Se si pensa allo zafferano, l'aroma è rilasciato durante la lavorazione e la conservazione a seguito di processi metabolici; in questo modo è possibile determinare se la spezia, sottoposta a controllo, sia autentica o meno dallo spazio di testa in cui sono presenti i composti volatili, composti che per loro definizione hanno un'elevata volatilità (Heidarbeigi, et al., 2015).

Lo studio condotto dai ricercatori del gruppo di (Heidarbeigi, et al., 2015) hanno portato avanti un progetto incentrato sul controllo qualità dello zafferano proprio con il naso elettronico. Testano l'efficacia del sistema facendogli analizzare lo zafferano puro e lo zafferano miscelato con cartamo, stili di zafferano, stigmi di zafferano con stimmi di mais, detti anche seta, e con un colorante naturale cioè la barbabietola da zucchero.

I campioni con i quali hanno lavorato sono:

- 2 lotti di zafferano; un lotto con gli stili rossi e l'altro con gli stili gialli (in Fig. 2-24) l'immagine che descrive le diverse parti degli stimmi di zafferano. Sono forniti da una coltivazione nella Contea di Qaen (Sud Khorasan, Iran)
- cartamo, stimmi di mais e barbabietola; acquistati al mercato locale della città di Karaj (Alborz, Iran)

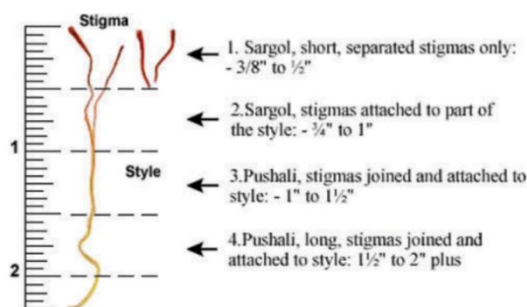


Figura 2-24: Rappresentazione delle dimensioni e delle diverse parti che compongono gli stimmi di zafferano. Si mette in evidenza uno stigma con stile giallo (Heidarbeigi, et al., 2015)

I campioni fino al momento dell'analisi sono a temperatura ambiente e lontano da fonti di luce.

Le proporzioni adottate per l'adulterazione dello zafferano, espresse come percentuale sul peso, con il cartamo sono comprese nell'intervallo di concentrazione 10-50%, mentre per la seta di mais colorata con la barbabietola prevede concentrazioni 25-50% con lo zafferano puro. Per il gruppo adulterato con il cartamo il naso elettronico prevede che le rilevazioni prodotte siano eseguite per 15 volte, mentre per l'altro gruppo, gli stigmi di mais, i campioni sono rilevati 5 volte. A seguito della rilevazione si ottengono delle impronte aromatiche sia per lo zafferano puro che per quello adulterato. Se nel lavoro di Kiani si riporta a grandi linee il sistema *e-nose*, Heidarbeigi ne definisce le caratteristiche specifiche.

Il sistema è composto da (Fig. 2-25):

- sensori di metalli semiconduttori (MOS)
- sensori
- contenitore del campione
- 3 valvole elettroniche
- pompa
- contenitore dell'ossigeno

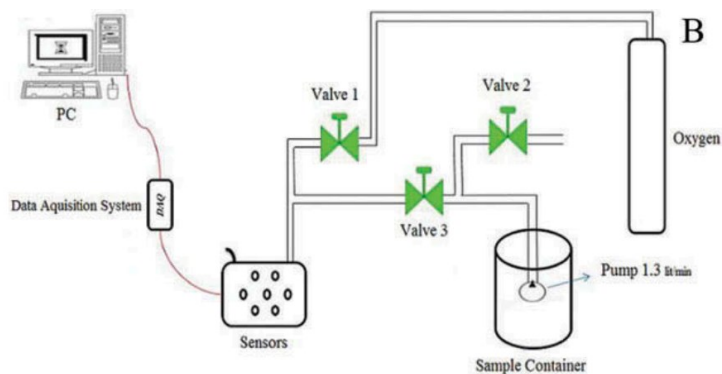


Figura 2-25: Schema del sistema e-nose (Heidarbeigi, et al., 2015)

La pompa (ACO-5501, Hailea Society, Cina) ha una velocità di 1,3 l/min ed è posta all'interno del contenitore del campione, mentre i sensori MOS sono una serie di 6 semiconduttori di tipo MQ (HANWEI Electronics Co., Ltd., Henan, Cina) che producono delle risposte per la presenza di una scheda di acquisizione dati (NI USB-6009, National Instrument) la cui sensibilità è di 0,305 mV; collegata ad un PC con software Lab View Software 2012.

L'analisi dati è di tipo statistico ed è svolta sullo spazio di testa; il motivo per il quale scelgono di lavorare con lo spazio di testa è dovuto al fatto che il metodo è il comune ed è a basso costo. Una volta che il contenitore del campione si satura con i VOC è trasferito nella camera con i sensori. All'inizio i sensori rispondono in modo particolarmente elevato a causa del gas saturo con vapore; per far in modo che rilevino solo i VOC lo spazio di testa è rimosso dalla camera e sostituito con aria pulita; in questo modo la risposta del sensore è pari a zero e quindi la risposta ritorna alla linea di base. Per evitare questo inconveniente e avere la possibilità di poter ripetere un'altra analisi il sistema *e-nose* prevede 3 fasi: la correzione della linea di base, l'iniezione degli aromi del campione e sostituzione dell'aria con l'ossigeno. In Fig. 2-26 le risposte ai campioni di zafferano puro, cartamo e mais oltre al grafico che ridà queste 3 fasi.

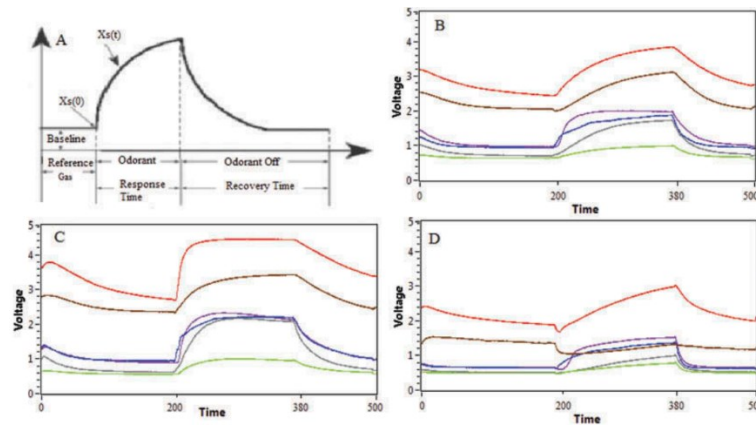


Figura 2-26: Risposta del sensore del naso elettronico ad un odore generico(A); risposta tipica del naso elettronico ai campioni di zafferano (B); cartamo (C); mais (D) (Heidarbeigi, et al., 2015)

La procedura di analisi prevede che il primo campione si trovi all'interno della camera chiusa affinché quest'ultima si saturi di odori; il tempo di attesa è pari a 3600 secondi. Si aspetta questo intervallo di tempo prima di avviare l'esperimento proprio perché il materiale con il quale si sta lavorando è un vegetale vivo, quindi, respira e produce oltre all'anidride carbonica anche vapore acqueo. Poi, l'ossigeno è fatto passare attraverso i sensori della camera per un tempo pari a 200 secondi; tempo che permette ai sensori stessi di ritornare alla linea di base. Durante la fase di iniezione la pompa è accesa, gli odori passano attraverso i sensori per 80 secondi provocando una variazione di tensione all'uscita di ogni sensore, la tensione cambia in funzione al tipo e alla sensibilità del gas. L'ultima fase, necessaria per pulire i sensori, prevede che l'ossigeno venga fatto passare sopra ogni sensore e in tal modo gli odori all'interno della camera sono rimossi dalla pompa; questa fase dura 120 secondi. Le risposte, nei 500 secondi, sono raccolte da un sistema di acquisizione dati e successivamente si provvederà alla preelaborazione dei segnali in modo tale da migliorare la qualità delle informazioni disponibili e ottimizzare l'uscita della serie di sensori prima che possa passare al riconoscimento del tracciato.

Questo studio utilizza il metodo frazionario per normalizzare i dati, il valore che si ottiene è adimensionale; consiste nella differenza della risposta del sensore alla risposta della linea di base rapportata alla risposta della linea di base stessa. I dati poi saranno utilizzati per la tecnica di analisi multivariata che si basa sui metodi statistici PCA e ANN. L'elaborazione dei dati è prodotta in Matlab (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA), Microsoft Excel, Neuralsolution 5 e The Unscrambler 10.2 (CAMO ASA, Norway).

L'analisi del componente principale è utilizzata per discriminare lo zafferano puro dall'adulterato. I risultati mostrano chiaramente è in grado di discriminare correttamente lo zafferano mescolato con gli adulteranti (Fig. 2-27).

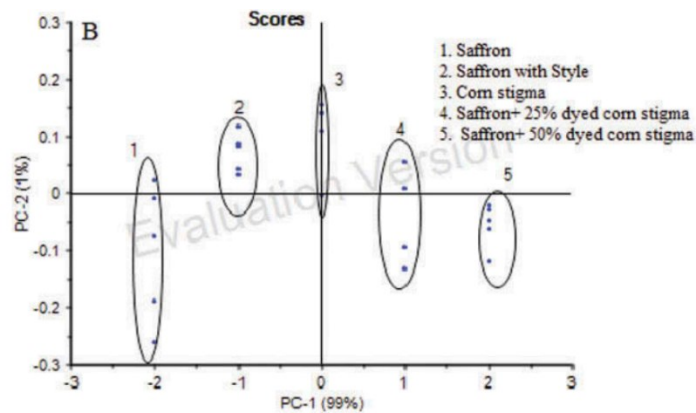


Figura 2-27: Grafico prodotto da PCA. I differenti campioni sono correttamente distinti ed in modo facile. PC1 e PC2 rappresentano la varianza totale tra le differenti misure (Heidarbeigi, et al., 2015)

I risultati ANN, ricavati da un particolare algoritmo, consentono di classificare e rilevare lo zafferano e gli adulteranti con alto grado di accuratezza nella classificazione. Ciò ci fa dire che è un metodo promettente per classificare le frodi a discapito dello zafferano.

L'autore oltre a dimostrare che il naso elettronico è in grado di definire se un prodotto è adulterato incentiva anche a promuovere ulteriori ricerche su prodotti differenti da *C. sativus*.

Se Heidarbeigi mostra l'affidabilità dell'utilizzo dell'*e-nose*, (Kiani, et al., 2018) descrive un'ulteriore tecnica che compensa degli svantaggi proprio della tecnica sopracitata con un nuovo naso elettronico che prende il nome di *e-mucosa*. Gli svantaggi di cui parla quest'ultimo autore riguardano la deriva del segnale derivante dall'umidità, temperatura, rumore e "avvelenamento" dei sensori che ne limita l'utilizzo in tempo reale per il monitoraggio di alcuni prodotti alimentari speciali. La mucosa elettronica ha anche il vantaggio di fornire informazioni più utili rispetto al naso elettronico riguardo l'aroma. La tecnica si basa su un biosensore, dispositivo analitico, il cui sistema di riconoscimento si fonda su un meccanismo biochimico; sono utilizzate diverse tipologie di sensori quali: enzimatici, i più utilizzati, microbici, quelli basati sulle cellule, tessuti, organelli, ma esistono anche i biosensori a DNA e gli immunosensori.

L'*e-tongue* è uno strumento che misura e permette di confrontare sapori simili, come quando si assaggia e i recettori del gusto inviano l'informazione al cervello a seguito dei composti chimici che si legano ai recettori stessi. La lingua elettronica ha una serie di sensori,

che funzionano da recettori, dove ognuno di essi costruisce uno spettro differente dagli altri. Per i risultati è necessario elaborare i dati con le analisi chemiometriche, soprattutto se i campioni sono complessi. Le informazioni fornite da ogni sensore sono complementari alle altre, degli altri sensori, e dall'insieme di tutte le informazioni si ottiene una *fingerprint* unica. Affinché una molecola possa essere percepita è indispensabile che sia ad una concentrazione tale da arrivare come minimo alla soglia di rilevamento; risulta che i sensori abbiano questa soglia simile se non addirittura minore di quella dei recettori umani.

Come per il naso elettronico è costituita da 3 elementi, necessari per il funzionamento, qui chiamati livelli:

- livello del recettore: sono dei sensori metallici che simulano le papille gustative dell'uomo
- livello del circuito: sono dei trasduttori. Nell'uomo è a carico della trasmissione neurale
- livello della percezione: è dove avviene l'analisi statistica dei dati ad opera del software. Nell'uomo la sede è il talamo

In figura 2-28 una rappresentazione schematica del sistema.

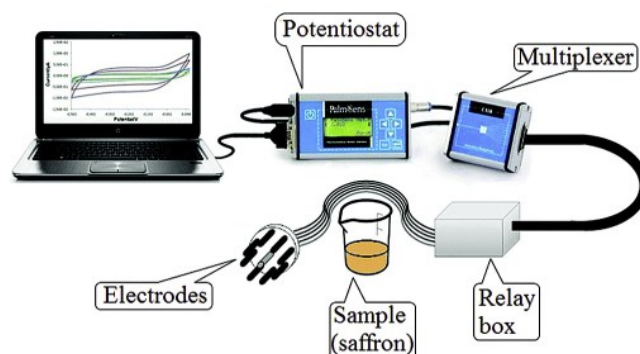


Figura 2-28: Sistema schematizzato dell'e-tongue (Kiani, et al., 2018)

Dallo studio si apprende che per lo zafferano sono disponibili in letteratura solo 2 studi, riportati sempre dallo stesso autore. Il sistema è costituito da una serie di sensori voltammetrici basati su elettrodi serigrafati che permettono di valutare le caratteristiche del sapore di campioni di zafferano.

L'analisi prevede che gli elettrodi vengono immersi in infusione affinché si producano delle curve voltammetriche o segnali elettrochimici caratteristici per ogni campione di zafferano. L'analisi mostra che si possono ricavare risultati simili a quelli prodotti dalle analisi chimiche tradizionali, specialmente per il kaempeferolo. L'analisi statistica per questa tecnica, che sfrutta il modello dell'analisi discriminante, si basa su elettrodi voltammetrici e permette di discriminare campioni di zafferano di differente qualità. Per avere un confronto dei risultati

sono anche eseguiti metodi analitici tradizionali quali GC-MS o spettrofotometria UV-Vis. Risulta che la lingua elettronica basata su sensori voltammetrici combinati con l'analisi chemiometrica ha un alto potenziale, è soddisfacente nella correlazione con i metodi analitici tradizionali per la valutazione della qualità dello zafferano, inoltre, permette di ottenere una rapida risposta e il processo di preparazione del campione è semplice. Gli elettrodi voltammetrici utilizzati sono costituiti da:

- elettrodo di riferimento di Ag/Cl o Ag
- contro-elettrodo di Pt
- elettrodo di lavoro, in base all'applicazione, è di: rame, argento, platino, oro, palladio, nichel, carbonio cristallino o carbonio modificato

Un ulteriore passo avanti della lingua elettronica è la lingua elettronica a base biologica o anche detta lingua bioelettronica. È utilizzata in diverse aree quali: qualità alimentare, autenticità, trasformazione alimentare e monitoraggio degli alimenti. Però, non sono presenti ancora degli studi specifici sullo zafferano.

2.4.6 Risonanza magnetica nucleare protonica ($^1\text{H NMR}$)

La risonanza magnetica è una tecnica ampiamente utilizzata per la sua rapidità, robustezza, alta risoluzione, riproducibilità e la necessità di minimi trattamenti dei campioni da sottoporre ad analisi; si applica a matrici alimentari solide, liquide e semisolide. Le diverse metodiche permettono di caratterizzare i prodotti sia in termini di autenticità che qualità e inoltre permette di individuare l'eventuale adulterazione. L'individuazione e la determinazione di probabili adulterazioni sono ipotizzabili se si utilizzano specifici metaboliti, detti *marker*, o studiando l'intero metaboloma che costituisce la *fingerprint* univoca del prodotto. Molto spesso questa tecnica è utilizzata in diversi prodotti alimentari quali caffè, miele... e più recentemente si sta utilizzando il metaboloma, rispetto ai singoli *marker*, proprio a causa della complessità della materia prima che implica una difficoltà nelle analisi. A riguardo dello zafferano l'approccio metabolomico è utilizzato, per esempio, per discriminare lo zafferano iraniano autentico da campioni commerciali coltivati in altre aree geografiche perché, come appreso dai diversi studi riportati in questa tesi, le molecole e le relative concentrazioni subiscono modifiche in funzione a diversi fattori tra cui l'area geografica. Le molecole che risentono principalmente di questo fattore sono la picrocrocina e la somma dei diversi glicosidi della crocetina.

Una volta che la spettroscopia ha prodotto dei risultati, i dati ottenuti necessitano dell'analisi statistica multivariata e successiva interpretazione dei risultati sperimentali; spesso si utilizza la PCA per definire se vi siano degli *outliers* e dei raggruppamenti naturali dei dati, mentre la PLS-DA è importante per creare una classificazione e produrre dei modelli predittivi (Sobolev, et al., 2019; Petrakis, et al., 2015).

Tra gli autori presi in considerazione per la spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ ci sono (Ordoudi, et al., 2007; Petrakis, et al., 2015; Schumacher, et al., 2016).

Ordoudi affronta nel suo lavoro diverse tecniche (presenti in diversi sottoparagrafi di questo elaborato) tra cui anche la spettroscopia NMR.

Per i campioni utilizzati si rimanda al sottoparagrafo relativo alla spettrofotometria UV-Vis. Per la prova utilizza 10 mg di zafferano macinato al quale sono aggiunti 600 μl di dimetildolfossido deuterato (DMSO-d_6). La miscela formata viene mescolata per 3 minuti, a temperatura ambiente, e centrifugata a 12100 rpm per 10 minuti. Da questa soluzione si preleva un'aliquota del surnatante pari a 500 μl per essere trasferita in un capillare NMR da 5 mm. Si utilizzano le stesse quantità anche per gli estratti di zafferano solubilizzati in cloroformio deuterato (CDCl_3). Nelle figure 2-5 e figura 2-29 si riporta, a titolo esemplificativo, uno spettro ottenuto dai campioni di zafferano autentico e dal campione di zafferano commerciale adulterato in DMSO e $\text{CHCl}_3 \text{d}_3$.

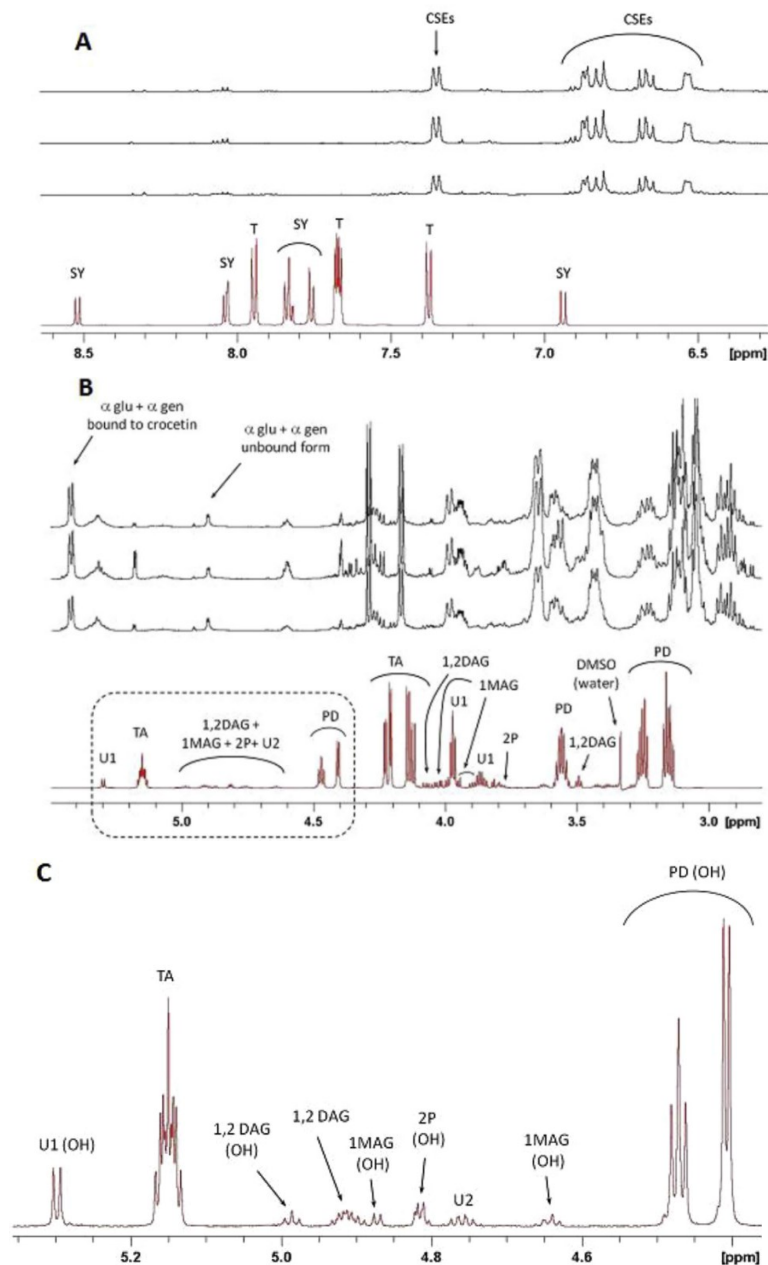


Figure 2-5: (A) Regione aromatica e (B) alifatica degli estratti di zafferano commerciale (in rosso); dall'alto verso il basso (in nero) i campioni di zafferano autentico dalla Grecia, Spagna e Italia analizzati con ¹H-NMR DMSO. (C) è un ingrandimento di una porzione dello spettro (B). Legenda delle abbreviazioni presenti nelle figure: sucresteri di crocetina (CSE); tartrazina (T); giallo tramonto (SY); propan-1,2-diolo (PD); 1,2 DAG (diacilglicerolo; propan-2-olo (2P); monoacilglicerolo (1MAG); triacetina (TA); U e U1 (composti sconosciuti); glu e gen per α-glucosio e α-gentiobiosio rispettivamente (Ordoudi, et al., 2007)

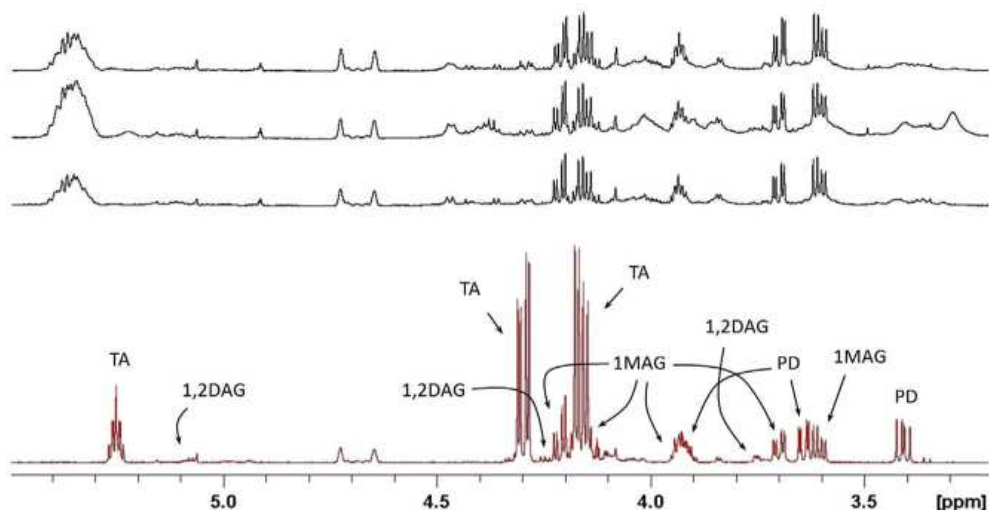


Figura 2-29: Regione alifatica dell'estratto del prodotto commerciale (linea rossa) e dei 3 campioni DOP greco, spagnolo e italiano (linee nere) con $^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 . Per la legenda vedere le figure sopra (Ordoudi, et al., 2007)

Gli spettri sono registrati con uno spettrometro Bruker AV600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Karlsruhe, Germania) operante a 14,09 T ed equipaggiato con una sonda inversa da 5 mm con gradiente z, acquisiti a 300 K con una larghezza spettrale di 10000 Hz e processati utilizzando il software TOPSPIN (Bruker Biospin GmbH v.3.5, Rheinstetten, Karlsruhe, Germania).

Gli estratti sono in due solventi deuterati, DMSO e CHCl_3 , quando è richiesta la soppressione del solvente residuo, acqua, si applica lo schema di presaturazione con irradiazione a bassa potenza di radiofrequenza per 1,2 secondi.

Gli spettri si riferiscono al corrispondente segnale del solvente; a 2,5 ppm e 7,26 ppm per il dimetilsolfossido e il cloroformio deuterato, rispettivamente.

Dal confronto dei diversi spettri, l'estratto del campione commerciale nel DMSO non assomiglia affatto allo spettro estratto dallo zafferano autentico; si nota una totale assenza di CSE, picrocrocina e le frazioni saccaridiche, ciò permette di confermare la completa assenza di zafferano nel prodotto commerciale. Inoltre, nella regione aromatica si conferma la presenza di tartrazina e giallo tramonto oltre alla presenza di piccole quantità di acidi grassi saturi e altre molecole tra cui 2 sconosciute; l'autore pondera l'idea che siano dei derivati dei polioli (Fig.2-29).

Presso l'ISMAC, in cui è presente il database NMR, si è avuta la conferma dell'assenza di cartamo, estratti del frutto di *Gardenia jasminoides*, curcuma e stami di *Crocus sativus*. L'analisi dello spettro $^1\text{H-NMR}$ CDCl_3 permette di indicare l'assenza delle risonanze dovute alla presenza di coloranti Sudan I-IV nella regione aromatica del prodotto commerciale.

Dal confronto della composizione lipidica dello zafferano autentico con quella ricavata dall'analisi degli spettri risulta la presenza di propan-1,2-diolo e triacetina, molecole assenti nel prodotto puro e inoltre è noto che propan-1,2-diolo è un additivo chimico (E1520) utilizzato come idratante nei prodotti cosmetici, disperdente in fragranze o come solvente in prodotti farmaceutici; quindi, molto probabilmente è utilizzato per disperdere meglio i coloranti idrofili, tartrazina e giallo tramonto e i derivati dell'acilglicerolo. Sono rinvenute anche catene laterali di soli acidi grassi saturi; nello zafferano autentico come anche negli altri estratti vegetali si ha la presenza concomitante sia degli acidi grassi saturi che insaturi; da entrambi gli spettri, ottenuti con entrambi i solventi, risulta la completa mancanza di acidi grassi insaturi. L'ipotesi a questo punto, è che l'origine dei composti aggiunti siano di origine non vegetale proprio per le frazioni alcoliche rintracciate. Sicuramente ciò conferma la falsificazione del prodotto commerciale.

La risonanza magnetica protonica è alla base dello studio affrontato anche da (Petrakis, et al., 2015) il cui obiettivo è descrivere lo studio preliminare per individuare lo zafferano adulterato e l'adulterante stesso. Associa la risonanza magnetica nucleare protonica con la chemiometria. Il metodo sviluppato può essere valido per affrontare le frodi nelle quali la percentuale di adulterante sia minimo del 20%, espressa in peso, rispetto allo spezia. I loro sforzi sono concentrati su tre diverse piante utilizzate come agenti di carica: *Curcuma longa*, *Carthamus tinctorius* e *Gardenia jasminoides* e gli stami di *Crocus sativus*.

lavorano con:

- 10 campioni di stimmi essiccati di *Crocus sativus* greco, raccolti nel 2012 e forniti dalla Cooperativa dei produttori di zafferano di Kozani (Cooperativa De Safranal); di cui 6 campioni biologici e 4 prodotti in modo convenzionale. La scelta di servirsi delle due tipologie di prodotto permette di poter fare delle considerazioni a riguardo un'eventuale variabilità di prodotto.

Prima dell'analisi sono controllati secondo i parametri dell'ISO 3632 e con le analisi HPLC presso il laboratorio chimico dell'università di agraria di Atene. Tutti i campioni appartengono alla categoria commerciale I.

- Estratto del frutto di *Gardenia jasminoides* (marchio "single herb extract, Zhi Zi"), acquistato da Plum Flower Brand (Anguo, Cina)
- Campioni di curcuma (con il marchio "Like safran")
- Cartamo (con il marchio "Safran")
- Stami di *C. sativus* (con il marchio "Safran")

Gli adulteranti sono acquistati sui mercati locali.

Sia lo zafferano che gli adulteranti sono finemente macinati in un mortaio e per simulare i campioni commerciali hanno preparato delle miscele artificiali contraffatte contenenti zafferano e il 20% di adulterate vegetale. Complessivamente sono utilizzate 10 miscele per ogni adulterante e da queste definite 5 classi, compresi i campioni di zafferano autentico.

Quindi, 50 campioni, ognuno da 10 mg, insieme agli adulteranti vegetali puri; quest'ultimi utilizzati come riferimento. Sono estratti con 600 μ l di DMSO- d_6 vortexandoli per 3 minuti a temperatura ambiente. Dopo 10 minuti di centrifugazione a 12100 rcf per 10 minuti si prelevano delle aliquote di surnatante, 500 μ l e trasferite in una provetta da NMR da 5 mm per l'analisi.

La scelta del solvente ricade sul DMSO per la sua capacità di sciogliere i composti sia idrofobici che idrofilici; caratteristica che permette al segnale NMR di essere una linea retta.

Gli spettri sono registrati con la stessa strumentazione e condizioni adottate da (Ordoudi, et al., 2007) con l'unica eccezione qui riportata di applicare una funzione esponenziale per il miglioramento della risoluzione prima di applicare la trasformata di Fourier.

Gli spettri sono allineati secondo i segnali del solvente residuo a 2,50 ppm. Lo studio di questi prevede che le regioni integrate siano nell'intervallo 0,40-10,50 ppm; sono escluse le regioni del solvente e dell'acqua, intervallo di 2,47-2,52 ppm e 3,31-3,34 ppm. Le regioni integrate sono ridimensionate in funzione all'intensità totale dello spettro, ma si tiene conto della diversa composizione del campione (ACD/NMR v.11.0, ACD Labs, Toronto, Canada) e l'analisi multivariata dei dati utilizza il software SIMCA-P+13 Umetrics, Umea, Svezia). La capacità predittiva dei modelli deriva dallo studio degli estratti dei 50 campioni; i modelli contengono quattro classi di zafferano adulterato con prodotti vegetali e una classe di zafferano puro. 7 dei 10 campioni, per ogni classe selezionata casualmente, costituiscono il *training set* mentre i restanti tre sono utilizzati per il set di prova. In totale, si ha la formazione di un *set di training* con consistenza di 35 campioni e un set di prova che consta di 15 campioni.

Dall'analisi degli spettri risulta che l'adulterazione dello zafferano è facilmente valutata per ogni adulterante vegetale se confrontati gli spettri della risonanza magnetica protonica dello zafferano puro con i picchi di questo; inoltre, i segnali tipici dei diversi vegetali utilizzati come adulteranti sono presenti per tutta la regione dello spettro. In figura 2-30 si riportano le regioni aromatiche e caratteristiche riscontrate negli spettri degli adulteranti puri e con il corrispondente picco dello zafferano; in tal modo la lettura risulta più chiara.

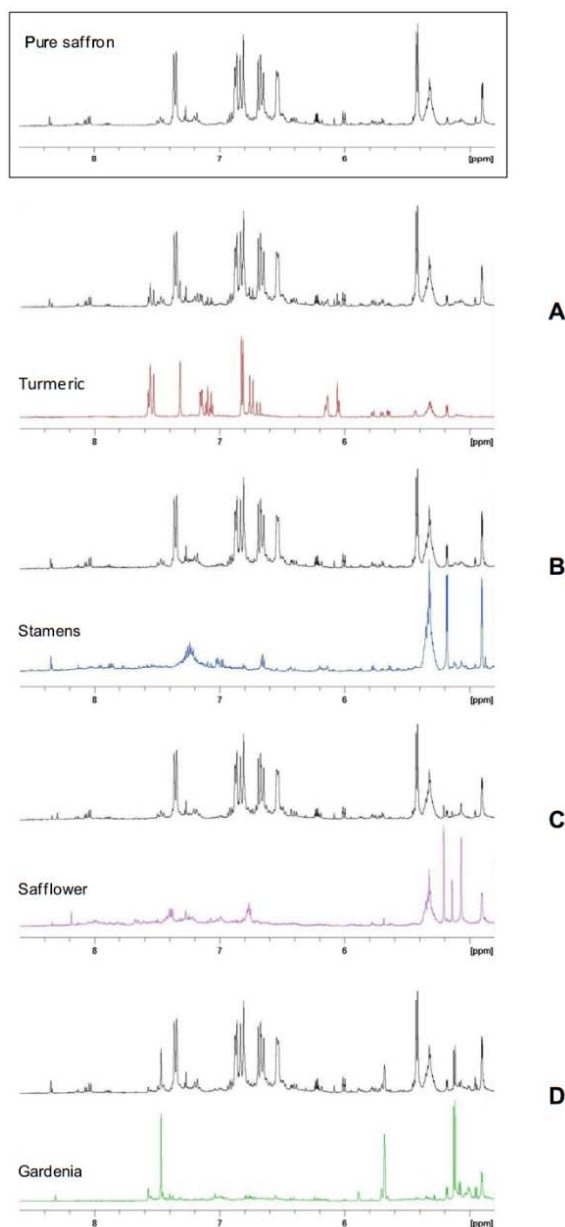


Figura 2-30: Regioni selezionate di spettri $^1\text{H-NMR}$ acquisiti da estratti in DMSO-d_6 . Lo spettro incorniciato e nero rappresenta lo zafferano puro. Si osservano gli spettri dei diversi agenti di carica puri: (A) Curcuma; (B) stami di *C. sativus*; (C) Cartamo; (D) estratto di *Gardenia jasminoides* (Petrakis, et al., 2015)

L'estratto di curcuma evidenzia i segnali tipici nella regione dei curcuminoidi a 7,541 ppm e 6,751 ppm; ne permette la facile individuazione in campioni di zafferano contraffatto anche per altri segnali che rappresentano i protoni aromatici, singoli e $-\text{H}_4$, mentre dallo spettro relativo agli stami risulta un doppietto a 5,181 ppm molto probabilmente dovuto alla frazione saccaridica, presente in gran parte negli stami come anche nello spettro della gardenia in cui si ritrova un doppietto a 5,121 ppm e un segnale ampio a 5,679 ppm; dovuti proprio alla

frazione saccaridica. Altri segnali di doppietti nella regione a 7,569 ppm e 7,466 ppm. Negli spettri di cartamo si ha un aumento del segnale a 5,205 ppm, 5,138 ppm e 5,066 ppm.

Per l'analisi statistica si utilizzano gli spettri ^1H NMR completi. Dalla PCA risulta che solo i campioni di zafferano adulterato con concentrazioni maggiori del 20%, in peso, con gardenia sono sufficientemente separati, seguiti poi da quelli con la curcuma (Fig. 2-31). Per migliorare la differenziazione dei campioni si sono avvalsi di un approccio a 2 fasi con un modello di classificazione controllato in cui si valuta prima lo zafferano puro e lo zafferano adulterato e poi le miscele artificiali contenenti il 20%, p/p, di adulterante.

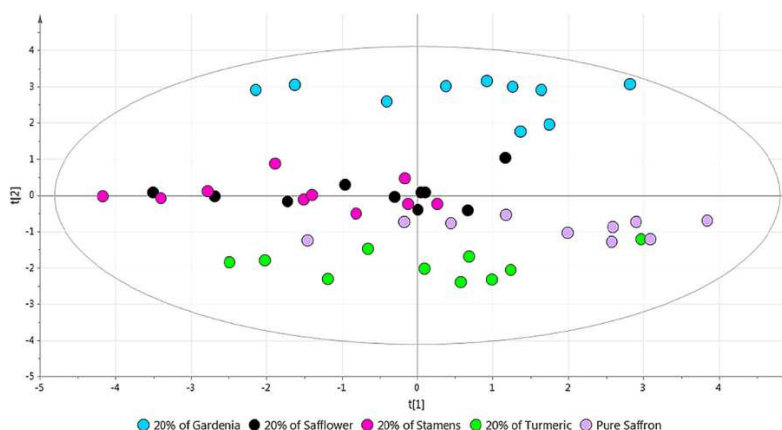


Figura 2-31: PCA eseguita considerando 10 campioni di zafferano greco puro (cerchi viola) e gli stessi campioni adulterati al 20% (p/p) con estratto del frutto di *G. jasminoides* (cerchi azzurri); *C. tinctorius* (cerchi neri); stami di *C. sativus* (cerchi rosa) (Petraakis, et al., 2015)

Il modello PLS-DA considera 2 classi: la classe dello zafferano autentico greco e quella dell'adulterato; il modello permette di discriminare chiaramente le 2 classi di campioni. Dimostra anche un maggiore contenuto di picrocrocina, crocine nello zafferano greco autentico mentre nei campioni adulterati si ha un maggiore contenuto di acidi grassi e segnali caratteristici della specie adulterante. Difatti, anche in letteratura, la picrocrocina e gli esteri glicosidici della crocetina sono utilizzati come *marker* per distinguere lo zafferano commercializzato con parti originarie di altre piante da quello autentico.

Altra scoperta riguarda l'assenza di differenze significative tra i metaboliti del prodotto biologico da quello coltivato in maniera convenzionale; permette di dire che c'è un'uniformità nello zafferano greco. Una volta analizzato lo zafferano sottopongono alle analisi le miscele con concentrazione del 20% di adulterante e dimostrano che il metodo è affidabile e capace di classificare i campioni di zafferano sconosciuti come puri o adulterati. Tutti i campioni sono correttamente classificati, si osservino questi risultati nelle figure 2-6.

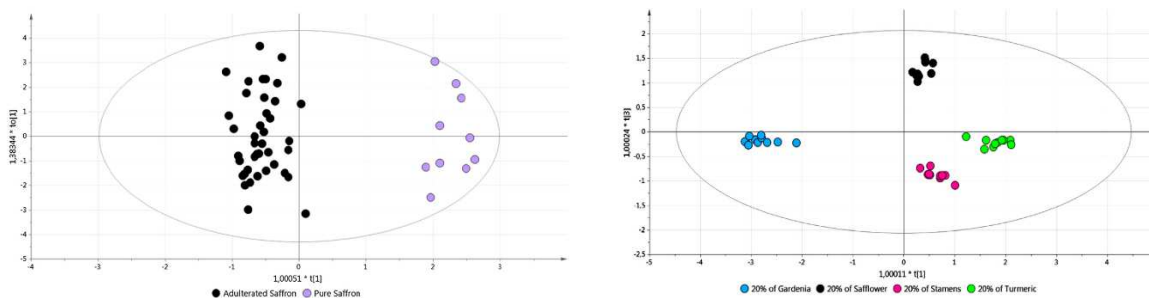


Figure 2-6: (a sinistra) L'analisi PLS-DA analizza i campioni di zafferano puro (cerchi viola) e zafferano adulterato (cerchi neri). (a destra) L'analisi dei campioni adulterati con le diverse specie vegetali alla concertazione del 20% di adulterante, p/p. Gardenia (cerchi blu); cartamo (cerchi neri); stami di *C. sativus* (cerchi rosa); curcuma (cerchi verdi) (Petraakis, et al., 2015)

Con il metodo sviluppato da (Petraakis, et al., 2015) per la prima volta si valuta la capacità di distinguere lo zafferano autentico da quello adulterato con prodotti vegetali facendo uso di un'analisi che sfrutta le *fingerprint* NMR non mirate associate alla chemiometria. La rilevazione dell'adulterazione dello zafferano greco puro con i 4 adulteranti comunemente utilizzati è possibile con solo 2 passaggi.

Nel 2016 (Schumacher, et al., 2016) rende noto, durante la XIII Conferenza Internazionale sulle applicazioni della risonanza magnetica nella scienza dell'alimentazione, che l'approccio non mirato dello studio della *fingerprint* è particolarmente vantaggioso per individuare le frodi alimentari con adulteranti inaspettati ed è per questo che è altamente consigliata l'applicazione allo zafferano (Tab. 1-3; 1-4).

Le analisi sfruttano uno spettrometro $^1\text{H-NMR}$ Bruker Ascend 400 dotato di sonda di osservazione a banda larga da 5 mm e con grado z. Le analisi sono svolte utilizzando 10 g di zafferano mescolati con 1 ml di metanolo deuterato ($\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) e mescolati per 8 minuti a 300 U/min per poi essere filtrati e aggiunti a 600 μl nel tubo NMR. La stessa procedura si applica agli standard di crocina e safranale. Si utilizza un metodo spettroscopico a 400 MHz, basato sull'integrazione di multipletti i quali si confrontano con gli standard di calibrazione esterni oltre anche all'utilizzo dell'analisi multivariata PCA; eseguita utilizzando il software Unscrambler X (CAMO Software AS, Oslo, Norvegia). L'analisi dei dati degli spettri è compiuta con l'Amix 3.9.14 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germania); per ulteriori dettagli consultare la presente pubblicazione.

I campioni di zafferano utilizzati sono:

- 13 campioni comprati in internet; sono identificati dall'Agenzia di investigazione chimica e veterinaria di Karlsruhe, Germania
- 2 campioni consegnati da un privato dopo l'acquisto in un bazar in Egitto

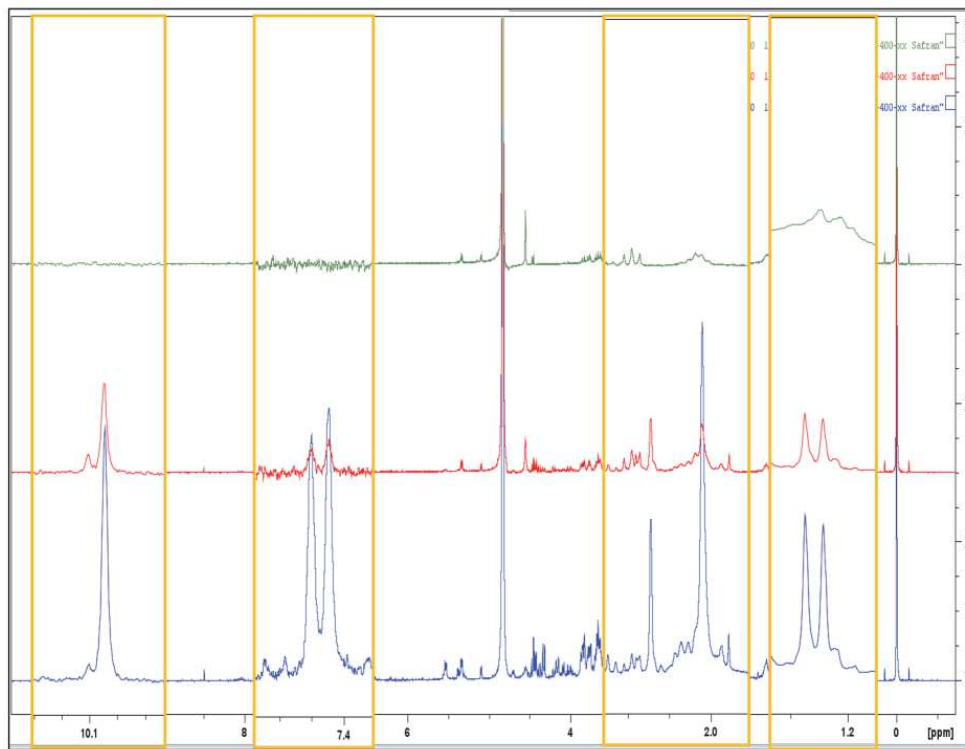


Figura 2-32: Spettro completo ^1H NMR con ingrandimento di segnali specifici dello zafferano in diversi campioni: (linea blu) campione zafferano autentico; (linea rossa) campione adulterato con una bassa percentuale di composti adulteranti; (linea verde) campione completamente fraudolento. In quest'ultimo campione non si rileva nessun segnale dello zafferano (Schumacher, et al., 2016)

I segnali presenti nello zafferano autentico hanno un *chemical shift* uguale a:

- 10,09 ppm
- 7,44 ppm
- 2,14 ppm
- 2,02 ppm
- 1,23 ppm
- altri picchi che rappresentano gli zuccheri e gli acidi grassi

Dall'analisi risulta che dei 15 campioni di zafferano 13 sono autentici, si ha anche la conferma dalle analisi microscopiche, ma in uno di questi è stata aggiunta illegalmente

tartrazina (E102), risultato confermato con l'analisi HPLC e TLC. Gli altri 2 campioni, quelli acquistati in Egitto, risultano un prodotto completamente differente, una frode vera e propria, perché è carta colorata. Non mostra nessun segnale dello zafferano. Dall'analisi HPLC emerge che è carta colorata con tartrazina, crocetina brillante e Ponceau 4R.

Se si considera l'etichettatura 8 sono risultati non conformi perché non rispettano le regole definite dal regolamento 1169:2011.

Anche eseguendo la PCA si ha la conferma della valutazione espressa con gli spettri, i due campioni adulterati sono facilmente distinguibili dai restanti, mentre il campione colorato con tartrazina è molto vicino al raggruppamento del prodotto vero.

2.4.7 Metodi molecolari

Nel 2012 si inizia a prendere in considerazione altre tecniche, oltre a quelle sopra descritte, come l'utilizzo di saggi biomolecolari data la loro economicità che permettono, utilizzando il DNA, di avere dei costi di esercizio simili a quelli della spettrofotometria UV-Vis. Esistono differenti metodi basati sulla PCR utilizzati per identificare ed autenticare una vasta gamma di prodotti fra cui anche lo zafferano: la PCR allele specifica (ASPCR), l'analisi della sequenza del DNA, l'utilizzo dei marcatori SCAR derivati dai RAPD o anche l'uso della tecnica di amplificazione isoterma "loop mediated" (LAMP); adatta a differenziare la spezia da altre specie vegetali, ma anche la PCR applicata in combinazione con la fusione ad alta risoluzione (HMR) per distinguere le differenti specie di *Crocus* (Jiang, et al., 2014; Marieschi, et al., 2012; Bosmali, et al., 2017). Tutti gli studi evidenziano una bassa o limitata variazione del DNA dello zafferano; conseguenza della sterilità della pianta che non ne permette la variazione genetica (Bosmali, et al., 2017). Nel lavoro di (Marieschi, et al., 2012) fanno uso dei RAPD, marcatori del DNA polimorfico con amplificazione casuale, tipo di PCR in cui i segmenti di DNA amplificati sono scelti a caso. Sono considerati un buon punto di partenza per le analisi molecolari perché affidabili, permettono la distinzione delle diverse specie botaniche e i costi operativi sono relativamente bassi, consentono di ottenere dei risultati in breve tempo con buoni livelli di prestazione, a condizione che la concentrazione del DNA sia bassa e che sia parzialmente degradato, sono indipendenti dall'ambiente di crescita, stato di sviluppo e di differenziazione della pianta però, si porta dietro diversi difetti fra cui la difficile riproducibilità dovuta all'elevata sensibilità alle condizioni di reazione (Jiang, et al., 2014). Per ovviare a questo inconveniente qualsiasi polimorfismo stabilito si rende robusto convertendo i suddetti marcatori in *marker* più specifici ed affidabili: SCAR, sequenza caratteristica di una regione amplificata. I saggi biomolecolari vedono una possibilità di utilizzo nelle analisi di *routine* del controllo qualità, soprattutto se confrontata con le tecniche tradizionali, perché si risparmia tempo, l'interpretazione dei risultati è oggettiva e non necessita di personale formato. Non bisogna però dimenticare che questo approccio, se utilizzato nel controllo qualità, non riesce ad individuare l'eventuale presenza di coloranti sintetici come tartrazina e rosso cocciniglia (Torelli, et al., 2014). Prima della pubblicazione di (Jiang, et al., 2014), l'autore afferma che nonostante il potenziale delle analisi genetiche applicate al controllo qualità sono ancora molto limitate; in altri articoli scientifici si riporta solo la rilevazione di cartamo e le specie di *Hemerocallis*.

2.4.7.1 Impiego dei marcatori SCAR a partire dai marcatori RAPD per identificare l'utilizzo di adulteranti vegetali

A seguito di queste considerazioni l'obiettivo fissato dal gruppo di ricerca è quello di sviluppare dei marker SCAR robusti per 7 dei più comuni adulteranti di *C. sativus*. Si otterrebbe così uno strumento diagnostico che permetta di rifiutare subito i campioni sospetti e velocizzare le successive analisi farmacognostiche, si eseguono su un numero inferiore di campioni, e che sia in grado di fornire ulteriori informazioni utili per altre analisi molecolari. Tutto ciò è possibile se si testano miscele create artificialmente di zafferano adulterato con diverse concentrazioni di prodotti vegetali di diversa origine in modo tale da valutare la sensibilità e l'accuratezza del metodo.

Il materiale con il quale hanno lavorato è elencato nella tabella sottostante.

Tabella 2-11: Campioni utilizzati e la loro rispettiva provenienza

Zafferano	Provenienza	Adulteranti	Provenienza
<i>Bulbi</i>	dall'Orto Botanico di Cagliari	<i>C. officinalis</i>	raccolta sul campo
<i>6 campioni commerciali essiccati e stimmi interi di diversa provenienza</i>		<i>A. montana</i>	raccolta sul campo
- 2	Marocco	<i>C. vernus</i>	Orto Botanico di Parma
- 2	Spagna	<i>Hemerocallis</i> spp.	Orto Botanico di Parma
- 1	Italia	<i>C. tinctorius</i>	Giardino delle Erbe Officinali Casola Valsenio, Ravenna, Italia
- 1	Afghanistan	<i>B. orellana</i> <i>C. longa</i>	Fundaction Chankuap Machas Fundaction Chankuap Machas

I bulbi, forniti dall'Orto Botanico di Cagliari, sono coltivati in vaso con il fine di ottenere le foglie fresche per l'estrazione del DNA, mentre i 6 campioni commerciali, essiccati e con stimmi interi, di diversa provenienza sono acquistati ed utilizzati come controllo dopo che l'analisi microscopica ha confermato l'appartenenza alla specie.

Il materiale fresco raccolto è subito liofilizzato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi molecolare. Invece i campioni, di ogni specie, sottoposti ad essiccazione prevedono una temperatura di 40°C per una settimana.

Per l'isolamento del DNA genomico vegetale dal materiale fresco o essiccato è necessario che si programmi un'incubazione iniziale, nel tampone CTAB, a 65 °C per 30 minuti invece

di una notte a temperatura ambiente. La concentrazione e la purezza del DNA si valutano tramite analisi spettrofotometrica a specifiche assorbanze, $A_{260/280}$ e $A_{230/260}$, e l' idoneità del DNA, cioè l'integrità, per le analisi RAPD si verifica anche attraverso il gel di agarosio con il tampone di bromuro di etidio/TAE. Il DNA nel gel di agarosio si analizza con una macchina fotografica, Kodak DC40 (Kodak), utilizzando un software di analisi delle immagini digitali ad una dimensione (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA).

Prima di portare avanti la reazione di PCR i campioni di DNA sono corretti ad una concentrazione approssimativamente di 20 μ l.

I *marker* RAPD si sviluppano a seguito dal confronto dei 7 adulteranti con i 7 diversi campioni di zafferano fresco ed essiccato.

La PCR è condotta su circa 20 ng di DNA del campione, contenuto in una soluzione di 25 μ l costituita da:

- 67 mM di Tris-HCl; tampone di pH 8,8
- 16,6 mM di solfato d'ammonio
- 0.01% Tween 20; detergente non ionico
- 2 mM di cloruro di magnesio
- 1 U Sub Therm Taq DNA polimerasi (Fisher Molecular Biology, Trevose, PA, USA)
- 25 pmol per ogni primer

Per evitare la co-precipitazione dei metaboliti secondari del DNA l'amplificazione è migliorata aggiungendo 0,4% di BSA e il 5% di Tween 20.

La reazione PCR si esegue secondo le seguenti combinazioni tempo-temperatura: 94°C per 5 minuti; 40 cicli a 94°C per 40 secondi; 36°C per 40 secondi; 72°C per due minuti e un ciclo di 72°C per 10 minuti.

Mentre i primer casuali per le analisi RAPD sono 19: OPA01, OPA03, OPA04, OPA05, OPA07, OPA09, OPA10, o OPA11, OPA12, OPA16, OPA20, OPB02, OPB08, OPB10, OPB12, OPB13, OPB16, OPB20, OPP10.

I modelli RAPD sono confrontati con gli ampliconi selezionati presenti negli adulteranti e assenti nei profili RAPD dello zafferano. Tra i primer casuali risultano essere adatti, per la produzione di bande dei *marker*, gli OPA10, OPA11, OPB08 e OPB10. Per i dettagli si rimanda all'articolo di (Marieschi, et al., 2012).

Una volta selezionate le bande marker sono asportate dal gel di agarosio al 2% e purificate con il kit di estrazione Jet-Sorb Gel Extraction kit (Genomed, Löhne, Germania) e clonate in p GEM-T Easy Vector (Promega Corp., Madison, WI, USA). La trasformazione delle colonie batteriche è vagliata attraverso la PCR della colonia e i cloni che trasportano la modifica

inserita correttamente sono sequenziati con i primer “M13 *forward*” and “M13 *reverse*”. Il sequenziamento dei cloni positivi si effettua secondo il protocollo CEQ 2000 dye terminator cycle sequencing (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), mediante il sequenziatore automatico CEQ 2000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) e ricercate nella banca dati le sequenze omologhe; si utilizzano differenti programmi una volta impostati i parametri standard.

I dati del sequenziamento sono importanti perché permettono di progettare i marcatori SCAR ed effettuare le ricerche di omologia nel programma BLAST, uno dei diversi utilizzati.

BLAST, lo ritroveremo in diversi lavori di questo elaborato, permette di identificare le somiglianze fra le regioni e tra le sequenze omologhe di diverse specie e di calcolarne la significatività statistica in funzione alle corrispondenze (Bosmali, et al., 2017).

I primers SCAR a 20-22 nucleotidi sono progettati con temperature di *annealing* di circa 60°C, ad eccezione del *reverse primer* ScCv304 che non si sovrappone alla sequenza del primer RAPD originale. La temperatura di *annealing* si calcola come 4 volte il numero di guanina/citosina più 2 volte il numero di timina/adenina; ogni coppia di primers è testata fino a 2°C in più e meno rispetto alla temperatura di *annealing* così da ottenere la temperatura ottimale.

Le condizioni ottimali della PCR e le combinazioni di tempo-temperatura per le amplificazioni sono sopra riportare con l'unica differenza che si utilizzano 12,5 pmol dei primer specifici e potenziati sempre con 0,4% di BSA e 0,5% di Tween 20. Una volta ottenuta l'amplificazione, un'aliquota di 10 µl del prodotto di amplificazione è risolta tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% e rilevata mediante colorazione con bromuro di etidio.

Il passaggio successivo dello studio prevede la validazione dei marcatori SCAR. Validazione che consiste nell'analizzare i campioni di DNA dei 7 contaminanti analizzati con delle specifiche coppie di primer definite per ogni specie e per ogni campione di *Crocus sativus*, sia fresco che essiccato. Ciò permette di poter escludere possibili reazioni incrociate che porterebbero a un'interpretazione errata dei risultati. La specificità dei primer si conferma con l'analisi SCAR condotta a livello del DNA genomico estratto dalle miscele degli stimmi essiccati di zafferano; miscele contenenti l'1%, 2%, 5% di adulterante, aggiunto come essiccato. Per gli adulteranti si rimanda alla tabella 2-11. Importante, poi, oltre all'integrità è anche la disponibilità del DNA dei campioni commerciali essiccati per l'analisi SCAR. Si controlla producendo un'amplificazione con una coppia di primer, coppia costruita su un amplicone RAPD (OPA11Cs₇₉₁), ottenibile con il primer OPA011 su DNA di *C. sativus* e

assente in tutti i profili dei contaminanti. Per il controllo positivo delle reazioni PCR si adotta un amplicone di 263 bp ottenuto dai primer SCAR *forward* e *reverse* ScCs263.

Prima di tutto si analizzano 180 profili RAPD ottenuti dall'amplificazione con 20 primers di DNA estratto da 2 campioni di *C. sativus*: 1 campione di foglie fresche e 1 di stigmi essiccati, precedentemente controllati al microscopio, e i 7 campioni di adulteranti. Dei 20 primer testati 13 forniscono prodotti chiari e identificabili dall'amplificazione per lo zafferano, sono presi in considerazione per selezionare le bande dei profili RAPD per ogni contaminante. Le bande polimorfiche da clonare sono scelte in base alla riproducibilità, alla concentrazione del DNA ottenuto da ogni singola reazione e dall'assenza di altre bande presenti nelle loro prossimità cosicché si eviti un'eventuale contaminazione.

I 7 frammenti specifici RAPD per ogni contaminante utilizzato nello studio, e non presenti in quelli dello zafferano, sono: OPA11Am748, OPB10Bo483, OPB10Co590, OPB08Ct780, OPA10Cv397, OPB10Cl412 e OPB10Hsp392; si ottengono dall'amplificazione dei primers: OPA10, OPA11, OPB08 e OPB10 (Fig. 2-33). Clonati gli ampliconi RAPD le sequenze sono depositate nel Gene Bank.

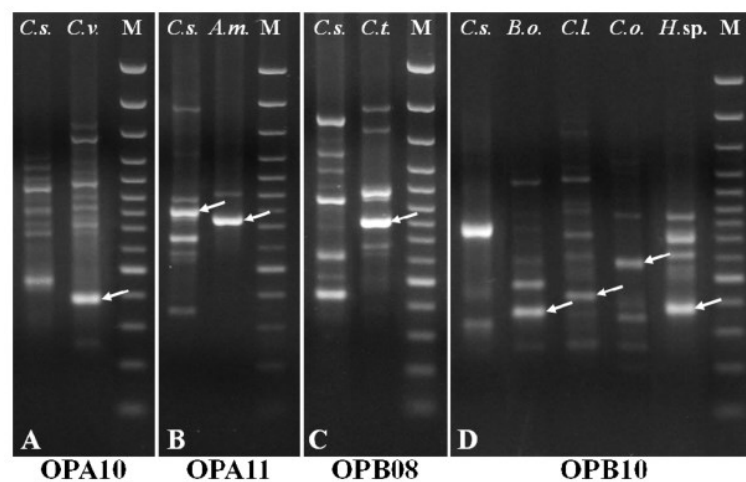


Figura 2-33: Analisi RAPD del DNA genomico di *C. sativus* e delle 7 specie contaminanti; scala del DNA 100 bp. In (A) i profili di amplificazione ottenuti con il primer OPA10; (B) con il primer OPA11; (C) con il primer OPB08 e (D) con il primer OPB10.

C.s.: DNA dagli stigmi essiccati di *C. sativus*; *C.v.:* DNA dalle foglie fresche di *C. vernus*; *A.m.:* DNA dai fiori essiccati di *A. montana*; *C.t.:* DNA dai fiori secchi di *C. tinctorius*; *B.o.:* DNA dai semi essiccati di *B. orellana*; *C.l.:* DNA dai rizomi di *C. longa*; *C.o.:* DNA dai fiori secchi di *C. officinalis*; *H.sp.:* DNA dai tepali essiccati di *Hemerocallis sp.*

Le frecce bianche indicano le posizioni degli ampliconi RAPD specie-specifici selezionati per essere convertiti in marcatori SCAR (Marieschi, et al., 2012)

Sono inoltre utilizzati come *marker* SCAR le sequenze nucleotidiche non omologhe con nessuna sequenza che codifichi per geni strutturali. Una ulteriore accortezza prevede che i primer SCAR siano progettati internamente alla sequenza degli ampliconi originali che non contengono le sequenze dei primer RAPD originali; ad eccezione per il *reverse* primer e ScCv304; messa in atto affinché si aumenti la specificità di amplificazione. Si origina così una amplificazione di prodotti più corti rispetto ai *marker* RAPD. Si è voluta una dimensione ridotta della lunghezza dei target di amplificazione poiché porta con sé un ulteriore vantaggio: questi *marker*, SCAR, sono più adatti all'analisi del DNA parzialmente degradato, questo evento è particolarmente frequente nel materiale vegetale essiccato e conservato a temperatura ambiente e per tempi piuttosto lunghi; si pensi che questa è una condizione normale per le specie. In Fig. 2-34 si riporta la tabella presente nel lavoro di Marieschi relativa ai dettagli dei primer e dei *marker* SCAR.

species	original RAPD amplicon	GenBank accession no.	SCAR marker	SCAR primer sequence (5'→3')	annealing temperature (°C)		amplicon length (bp)	
					calculated	working		
<i>Crocus sativus</i>	OPA11Cs ₇₉₁	JQ952665	ScC ₅₂₆₃	forward	AATAGCCTTGCATGAAGATCC	60	60	263
				reverse	CGATGGTTTTGCTTGAGTGG	60		
<i>Arnica montana</i>	OPA11Am ₇₄₈	JX239751	ScAm ₁₉₀	forward	GATTAGCAGCAGCCATCTCG	62	60	190
				reverse	GATGAAGAAACGGGCACTCC	62		
<i>Bixa orellana</i>	OPB10Bo ₄₈₃	JQ952666	ScBo ₂₆₇	forward	ACTTTCAAAGCCGACACGC	60	60	267
				reverse	ATCTGGACAATAGCTTTAACGC	62		
<i>Calendula officinalis</i>	OPB10Co ₅₉₀	JX239749	ScCo ₃₉₀	forward	TCGACGTTGATTCTTGGACC	60	60	390
				reverse	GACGATACAGATCGAAGAGG	60		
<i>Carthamus tinctorius</i>	OPB08Ct ₇₈₀	JQ952667	ScCt ₁₃₁	forward	ACAACCATTGGAGATTCCGG	60	60	131
				reverse	AGTGAGCACTCTTAGTTAACC	60		
<i>Crocus vernus</i>	OPA10Cv ₃₉₇	JQ952668	ScCv ₃₀₄	forward	AAATTCATCAAACCCGTGCC	58	60	304
				reverse	CAGCTGAAGAAGAGTTACCC	60		
<i>Curcuma longa</i>	OPB10Cl ₄₁₂	JQ952669	ScCl ₂₈₉	forward	AACCTGAAGTGGGAGCTAGC	60	58	289
				reverse	CATCTGGTAAAGTCTCCTCC	60		
<i>Hemerocallis</i> sp.	OPB10Hsp ₃₉₂	JX239750	ScHsp ₃₅₄	forward	GACAAGGGCTAAAATCACTTG	60	60	354
				reverse	AGACTTTGTGCAGTTTACC	60		

Figura 2-34: Elenco e dettagli di ogni primer utilizzato, RAPD e SCAR, per ogni specie (Marieschi, et al., 2012)

Per poter allargare le analisi ai campioni commerciali è necessario validare i *marker* selezionati, secondo la specificità. Si testano ogni coppia di primer per l'amplificazione del DNA da *C. sativus*, sia fresco che essiccato, e da ogni adulterante da cui è scelta una distinta coppia. Risulta che nessuna coppia di primer testata fornisce un'amplificazione se non per quel prodotto vegetale da cui deriva, anche quando si producono delle reazioni di amplificazione incrociate.

Il controllo positivo, necessario per le analisi del prodotto commerciale, si basa sul DNA estratto da *C. vernus*, dalle foglie di *C. sativus* e da 6 campioni di stigmi essiccati provenienti da diverse aree geografiche; la sicurezza che i campioni utilizzati siano autentici si deve al controllo eseguito con le analisi al microscopico. Il controllo negativo corrisponde all'amplificazione senza DNA (Fig. 2-35).

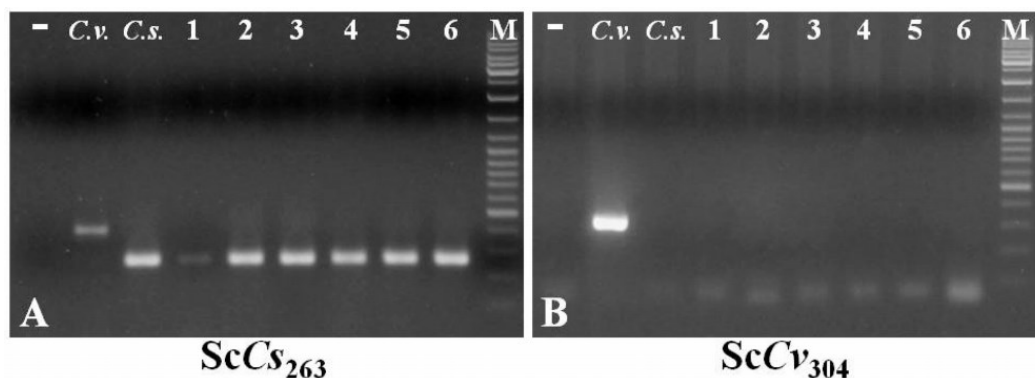


Figura 2-35: Validazione del marcatore SCAR ScCs263 e ScCv304 su campioni di stigma essiccati commerciali di zafferano di diverse origini geografiche.

(A) PCR eseguita con la coppia di primer ScCs263 specifici per *Crocus sativus*; (B) reazione eseguita con la coppia di primer ScCv304 specifici per *Crocus vernus*. C.s.: DNA da foglie fresche di *C. sativus*; C.v.: DNA da foglie fresche di *C. vernus*; 1-6: DNA da campioni di stigma essiccati commerciali di zafferano di diverse provenienze geografiche; M: scala di DNA pari a 100 bp (Marieschi, et al., 2012)

Dai risultati della PCR si osserva che il marker ScCs263 è presente in tutti i campioni di *C. sativus*, genera un amplicone facilmente distinguibile lungo quasi più di 100 bp rispetto a *vernus*; aspetto importante perché permette di distinguere facilmente le due specie nelle analisi di routine di prodotti commerciali in polvere ed inoltre, di definire che l'intera procedura è accurata. Può essere considerato un controllo positivo perché evita l'errata interpretazione e quindi di falsi negativi dovuti alla bassa qualità del DNA. Dalla Fig. 2-35 A si nota una differente luminosità delle corse; in particolare del campione 1, gli autori ipotizzano che sia dovuta ad un campione più vecchio che ha portato ad una maggiore degradazione del DNA. Con la stessa reazione si riesce a distinguere le due specie di *Crocus* ma la banda a 263 bp di *sativus* può mascherare la potenziale adulterazione con *vernus* perché la concentrazione dell'amplicone di quest'ultimo è relativamente bassa. Mentre da (B) si può affermare che non c'è contaminazione con *vernus* in quanto dalle reazioni non risultano ampliconi derivanti dall'amplificazione del DNA di *C. vernus*.

Il gruppo di ricerca utilizza il campione 3, campione proveniente dal Marocco, per la preparazione delle miscele artificiali per la definizione della sensibilità (Fig.2-36) ed inoltre come ulteriore prova di studio per i primer RAPD e i più specifici SCAR vengono testati campioni di zafferano autentico con il fine di capire se c'è uniformità nei prodotti derivanti da territori differenti (Marocco, Spagna, Iran, Italia, Afghanistan e Grecia).

Le miscele create per assomigliare ai prodotti commerciali fraudolenti si compongono di stighi di zafferano mescolati con le diverse porzioni dei diversi adulteranti, a concentrazioni

eterogenee: i fiori per *Arnica montana*, *Calendula officinalis* e *Carthamus tinctorius*, i semi per *Bixa orrellana*, gli stimmi per *Crocus vernus*, il rizoma per *Curcuma longa* e i tepali per *Hemerocallis sp.* Le concentrazioni di adulteranti sono pari a 1%, 2% o 5% rispetto al peso di *C. sativus*.

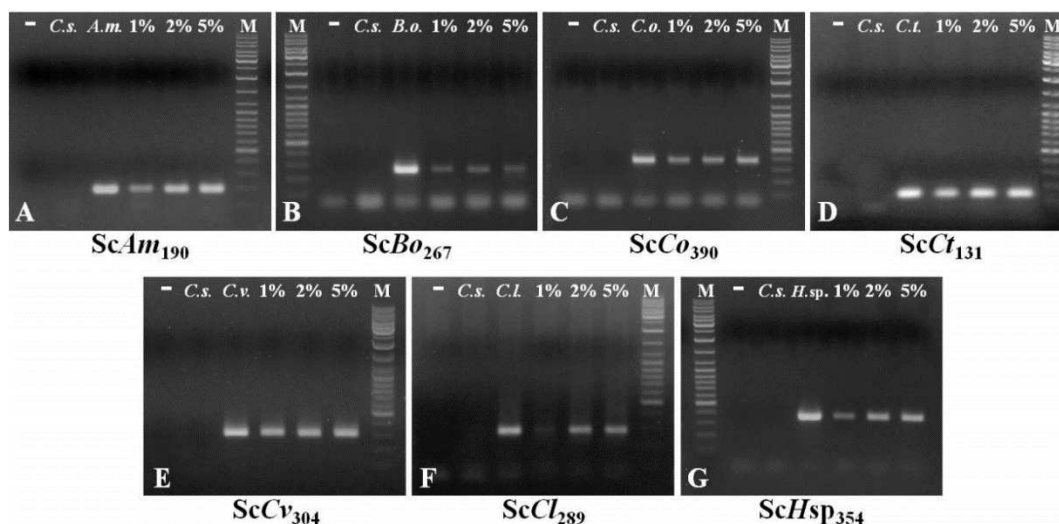


Figura 2-36: Test della sensibilità del marcatore SCAR: (A) PCR eseguita con la coppia di primer ScAm190 specifica per *Arnica montana*; (B) con la coppia di primer ScBo267 specifica per *Bixa orellana*; (C) con la coppia di primer ScCo390 specifica per *Calendula officinalis*; (D) con la coppia di primer ScCt131 specifica per *Carthamus tinctorius*; (E) con la coppia di primer ScCv304 specifica per *Crocus vernus*; (F) con la coppia di primer ScCl289 specifica per *Curcuma longa*; (G) con la coppia di primer ScHsp354 specifica per *Hemerocallis sp.* Il controllo negativo, -, è l'amplificazione senza il DNA modello e come ulteriore controllo negativo si utilizza C.s.: DNA da stimmi essiccati di *C. sativus*. M: scala di DNA da 100 bp. Come controllo positivo si utilizza A.m.: DNA dai fiori essiccati di *A. montana*; B.o., DNA dai semi essiccati di *B. orellana*; C.o., DNA dai fiori essiccati di *C. officinalis*; C.t., DNA dai fiori essiccati di *C. tinctorius*; C.v., DNA dagli stimmi essiccati di *C. vernus*; C.l., DNA dai rizomi essiccati di *C. longa*; H.sp., DNA dai tepali essiccati di *Hemerocallis sp.* (Marieschi, et al., 2012)

I marcatori SCAR selezionati permettono facilmente di rilevare fino all'1% di ogni adulterante nelle miscele con *C. sativus*.

Anche (Torelli, et al., 2014) nel suo lavoro indica le diverse problematiche dei metodi attualmente utilizzati e quali vantaggi si porti dietro la possibilità di poter rilevare la *fingerprint* del DNA delle matrici analizzate. Tra i diversi vantaggi menziona la possibilità di determinare l'autenticità degli alimenti e la possibilità di poterla utilizzare per il controllo qualità di *routine* perché consente di identificare il singolo prodotto vegetale nelle matrici grezze e in quelle trasformate; tutto ciò però, è possibile solo se si effettua l'estrazione e l'amplificazione del DNA con metodi adeguati. Se questi sono i vantaggi c'è anche il rovescio della medaglia: è necessario che siano disponibili marcatori unici, affidabili e riproducibili oltre anche alla possibilità che nel prodotto ci siano degli interferenti, soprattutto negli alimenti complessi. Per interferenti non si pensi solo a particolari molecole; sono interferenti anche i comuni zuccheri vegetali, polifenoli, lipidi sia di natura vegetale che animale; anche il DNA stesso degradato per il processo di conservazione, trasformazione o cottura, sono degli ostacoli (Soffritti, et al., 2016; Torelli, et al., 2014). Tutte queste limitazioni possono essere superate applicando un metodo adeguato di estrazione e l'utilizzo di *marker* SCAR; l'applicazione di questi, associati ad un buon metodo di estrazione, hanno il vantaggio di avere un'alta produttività, tempi ridotti di preparazione del campione, una buona replicabilità inter-laboratoriale, ridotti costi operativi e una univoca identificazione dei contaminati.

Come Marieschi, sopracitato, anche il suo gruppo di ricerca ha come obiettivo valutare le prestazioni dei *marker* SCAR, sviluppati per i 7 adulteranti più comuni nello zafferano macinato (vedere la tabella 2-11 per l'elenco degli adulteranti), in diversi prodotti commerciali; in tal modo si ha una panoramica effettiva del grado di adulterazione degli alimenti venduti al dettaglio in Italia e Spagna. La scelta di queste 2 nazioni proviene dal loro utilizzo consolidato nel tempo della spezia nelle preparazioni tradizionali.

Il materiale con cui affrontano la ricerca si compone di:

- Preparazioni di riso essiccato
- Miscele di condimenti
- Spezie
- Zafferano macinato

Si riporta in Fig. 2-37 la tabella che schematizza i campioni utilizzati, la provenienza, gli eventuali ingredienti e i possibili interferenti che possono provocare dei problemi nel momento in cui si utilizza un unico metodo di estrazione. Si ricorda che anche la cottura, frittura e salatura provocano una degradazione del DNA. Acquisiti i campioni sono resi anonimi e

conservati a temperatura ambiente nelle loro confezioni fino al momento delle analisi, analisi condotte comunque entro la data di scadenza.

Sample	Origin	Description	Declared ingredient list	Major components that could interfere with DNA isolation and downstream amplification
1	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
2	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
3	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
4	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
5	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
6	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
7	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
8	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
9	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
10	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
11	Spain	Raw saffron	Ground saffron	
12	Spain	Raw saffron	Ground saffron	
13	Spain	Raw saffron	Ground saffron	
14	Spain	Raw saffron	Ground saffron	
15	Spain	Raw saffron	Ground saffron	
16	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
17	Italy	Raw saffron	Ground saffron	
18	Italy	Herbal tea	Green tea (99%), saffron (1%)	Polyphenols
19	Spain	Seasoning for paella valenciana	Garlic, salt (25%), paprika, corn flour, E102, pepper, cloves and saffron (2.5%)	Polyphenols
20	Spain	Seasoning for paella valenciana	Turmeric, paprika, garlic, bay, allspice, coriander, saffron (1%), cloves, pepper	Polyphenols
21	Italy	Ready-made, lyophilized "Paella valenciana" with fish and vegetables	Rice, dehydrated vegetables (13.6%): bell peppers, peas, onions, courgettes; prawns (2.7%), lactose, squids (1.6%), dehydrated clams (1.6%), fish stock, salt, yeast extract, garlic, saffron, glucose syrup, white wine, vegetable broth concentrate, dehydrated fish, spices	Sugars, polyphenols, degraded proteins and fats
22	Italy	Ready-made "Risotto alla milanese"	Parboiled rice (85%), rice flour, flavorings, salt, olive oil, onion (0.8%), paprika, powdered whole milk, garlic, saffron (0.024%). It may contain traces of shellfish, eggs, soya and celery	Sugars, polyphenols, degraded proteins and fats
23	Italy	Ready-made "Risotto alla milanese"	Parboiled rice (88%), wheat flour, salt, vegetable oil, lactose, onion, yeast extract, cheese, sugar, olive oil, saffron (0.05%), milk protein, turmeric. It may contain traces of shellfish, eggs, soya and celery	Sugars, polyphenols, degraded proteins and fats
24	Italy	Ready-made "Risotto alla milanese"	Parboiled rice, vegetable oil, rice flour, lactose, corn starch, salt, dehydrated onion (1%), yeast extract, sugar, white wine, saffron (0.05%), glucose syrup, milk protein, spices	Sugars, polyphenols, degraded proteins and fats

Figura 2-37: Elenco dei prodotti alimentari e le relative informazioni sui singoli campioni. Sono riportati anche gli interferenti che causano problemi quando si utilizza un unico metodo di estrazione. I polifenoli come anche i grassi e gli zuccheri legano il DNA, gli oli essenziali presenti nelle altre spezie determinano interferenze durante le fasi di estrazione, amplificazione e trattamento del DNA (Torelli, et al., 2014)

Prima di tutto si deve estrarre il DNA genomico compatibile per la PCR e amplificabile. La fase prevede che il DNA sia isolato da campione in polvere, da 50 a 100 mg; le modalità di estrazione sono le stesse di (Marieschi, et al., 2012) solo che apportano delle piccole modifiche a riguardo della quantità di DNA, utilizzano circa 40 ng dell'acido desossiribonucleico, aggiungono alla soluzione di 25 ml 0,2 mM di dNTP in rapporto equimolare e modificano le combinazioni di tempo-temperatura applicate alla reazione di amplificazione: 94°C per 5 minuti, 35 cicli a 94°C per 40 secondi, 60°C per 40 secondi, 72°C per 40 secondi e un ciclo a 72°C per 10 minuti. Amplificato il DNA, l'aliquota di 10 ml è ulteriormente analizzata con l'elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% e i frammenti si rilevano con la colorazione di bromuro di etidio. Si producono campioni in triplice copia; dal confronto di ogni riproduzione non si osserva nessuna variazione.

L'utilizzo di questo metodo permette di ottenere DNA utilizzabile; è presente nelle reazioni PCR e risulta che è adatto alla valutazione sia dello zafferano autentico macinato che

per gli alimenti elaborati in cui la spezia è presente come ingrediente. Come si può vedere dalla figura 2-38 risulta che il contenuto di DNA dei prodotti trasformati subisce una diminuzione, per degradazione ad opera dei processi tecnologici ai quali sono sottoposti, ma è comunque rintracciabile.

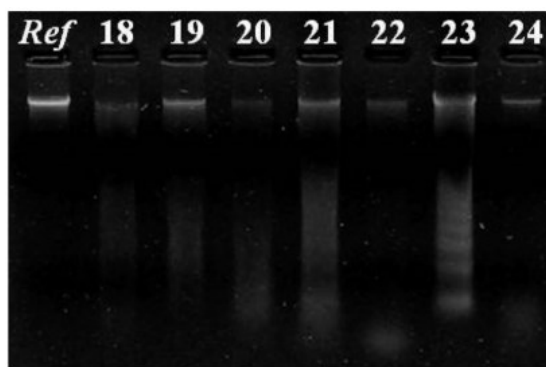


Figura 2-38: Corsa elettroforetica di alcuni prodotti alimentari contenenti zafferano come ingrediente dichiarato (righe 18-24). Ref: standard di DNA. La corsa elettroforetica è in gel di agarosio 1,5% e il DNA è colorato con bromuro di etidio. La degradazione si nota dagli strisci in quasi tutti i campioni (Torelli, et al., 2014)

Nel campione 18, in cui sono presenti i polifenoli, e nei campioni 21 e 24, gli oli essenziali e zuccheri, la purezza del DNA estratto è molto bassa; il rapporto $A_{260/280}$ varia nel range 1,16-1,54 comunque, la qualità di amplificazione dei primer SCAR, primer specifici con basso numero di coppie di basi, è accettabile; perciò, sono adoperati per l'identificazione del DNA anche se parzialmente degradato.

Come nell'altro lavoro, il primer SCAR ScCs263 è utilizzato come controllo positivo dato che si amplifica in tutti i campioni testati e nelle miscele complesse contenenti concentrazioni di zafferano differenti, ad eccezione del campione 19 (Fig. 2-39, pannello A). Nella stessa figura, si riportano le analisi dei marcatori SCAR di 17 campioni commerciali di zafferano macinato e 7 prodotti alimentari contenenti zafferano come ingrediente dichiarato (per l'identificazione dei campioni si rimanda alla Fig. 2-37). Nel pannello D in cui si utilizza il marker ScC1289, campione 20, si rileva la curcuma, ingrediente presente nella lista degli ingredienti.

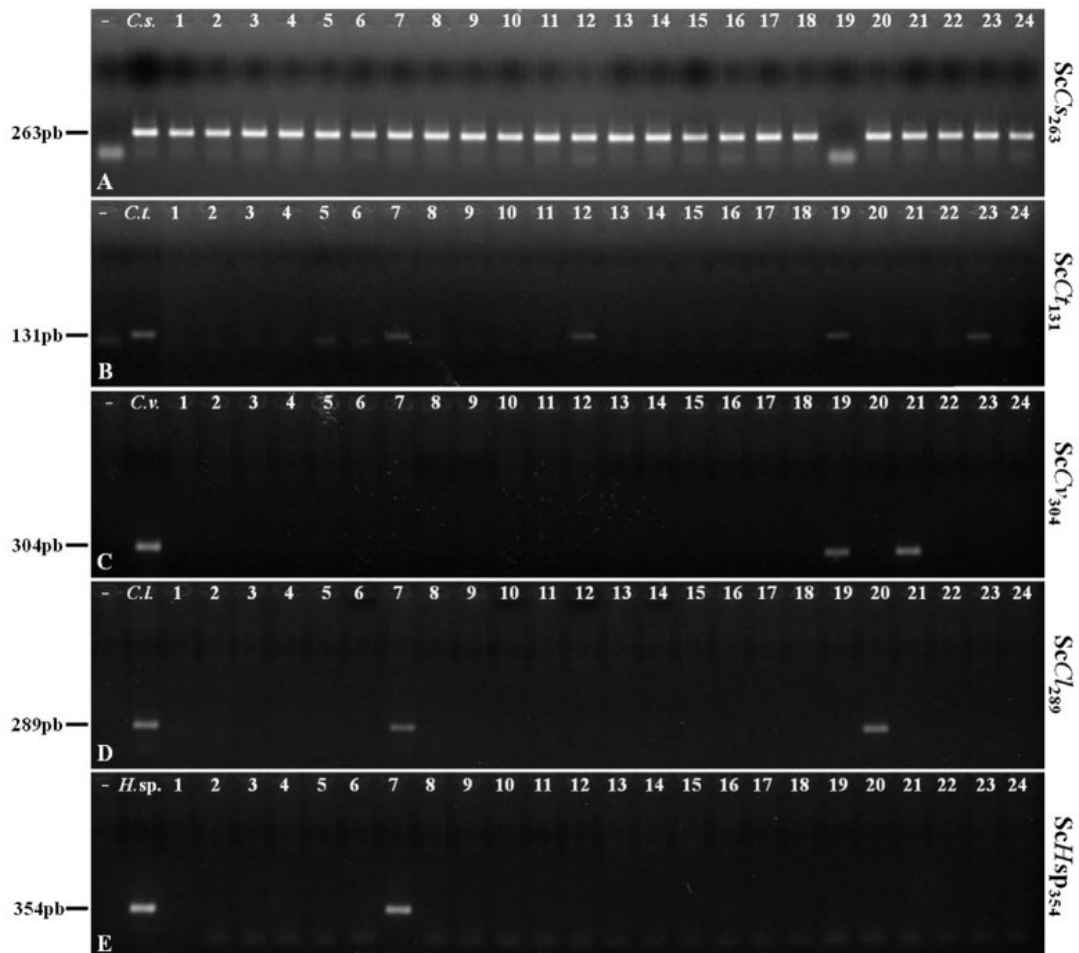


Figura 2-39: Analisi del marcatore SCAR di 17 campioni commerciali di zafferano macinato (righe 1-17) e 7 prodotti alimentari contenenti zafferano come ingrediente dichiarato (righe 18-24). (A) PCR eseguita con la coppia di primer ScCs263 specifica per *Crocus sativus*; (B) PCR eseguita con la coppia di primer ScCt131 specifica per *Carthamus tinctorius*; (C) PCR eseguita con la coppia di primer specifici ScCv304 per *Crocus vernus*; (D) PCR eseguita con la coppia di primer ScCl289 specifica per *Curcuma longa*; (E) PCR eseguita con la coppia di primer ScHsp354 specifica per *Hemerocallis sp.*; -: controllo negativo; C.s.: DNA da stigmi essiccati di *C. sativus*; C.t.: DNA da fiori essiccati di *C. tinctorius*; C.v.: DNA da foglie fresche di *C. vernus*; C.l.: DNA da rizomi essiccati di *C. longa*; H.sp.: DNA da tepali essiccati di *Hemerocallis sp.* (Torelli, et al., 2014)

Dal confronto dei risultati ottenuti con ciò che è descritto in etichetta risulta che l'adulterazione non è così comune, ma è un fattore da non trascurare in quanto il 21% dei campioni totali, 5, risulta adulterato; di cui 2 di essi, il 7 e 19, è falsificato con più di un adulterante: *C. tinctorius* + *C. longa* + *Hemerocallis* nel campione 7 e *C. tinctorius* + *C. vernus* nell'altro. L'aggiunta di più di un adulterante può risultare non rilevabile da alcune tecniche

perché le concentrazioni aggiunte possono essere al di sotto del limite di rilevabilità. Altro punto a favore per i metodi biomolecolari è la loro capacità di rilevare anche la presenza di più adulteranti insieme anche se questi fossero a basse concentrazioni. Dall'osservazione degli altri campioni si può dire che la maggior parte di questi contiene cartamo (B corsa 7,12,19,23), mentre nella corsa 7 del pannello D ed E, relativo alla curcuma, si ha curcuma non dichiarata in etichetta come anche *Hemerocallis*. Il campione 19 conferma che non si hanno problemi con l'amplificazione: nelle corse in cui si utilizzano gli SCAR specifici per il cartamo e *C. vernus* questa accade; ciò, indica che non si ha la disponibilità di DNA per il *marker* SCAR per *C. sativus*. Nell'etichetta del campione 23 tra gli ingredienti c'è la curcuma, ma non è rintracciata. Gli altri adulteranti quali *Calendula officinalis*, *Bixa orellana* e *Arnica montana* non sono presenti nei campioni di prova.

L'autrice afferma che il metodo, anche se presenta delle mancanze, si pensi all'incapacità di rilevare i coloranti sintetici, comunque può essere utile per rafforzare il controllo delle materie prime e dei prodotti finiti come metodo rapido e facile.

2.4.7.2 *Barcoding Melting Curve Analysis (Bar-MCA)*

Se con Marieschi e Torelli sono presi in considerazione i *marker* RAPD e SCAR con (Jiang, et al., 2014) ci si focalizza sulla ASPCR, PCR allele specifica; tutti metodi, comunque, che sfruttano i frammenti specifici. I *marker* richiedono lo *screening* di nuovi frammenti e alleli per progettare primer specifici. I primer specifici non sono in grado di rilevare adulteranti nuovi o sconosciuti; limitazione da non sottovalutare per la rilevazione di nuovi adulteranti. Limite che ha permesso di sviluppare nuovi *marker* molecolari basati sui primer universali costruiti sui codici a barre di DNA. I codici a barre di DNA sono delle brevi sequenze di DNA rare utilizzate per identificare delle specie; si utilizza la regione standard di DNA come la regione *tag*. Queste permettono di avere un metodo di identificazione rapido, accurato ed automatizzabile. Al momento sono utilizzate per l'identificazione di vegetali, valutazione e conservazione della biodiversità e per il rilevamento dell'adulterazione. In letteratura si trovano proposte differenti regioni di DNA plastidiale in cui sono inclusi i geni *rbcL*, *matK*, *rpoB* e *rpoC₁* oltre ai geni non codificanti *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA* e *trnL-Fspacer* e alle regioni ITS2 che servono come *barcode* di DNA per l'identificazione delle piante.

Generalmente il DNA plastidiale è di forma circolare e più piccolo del DNA nucleare; ne esistono più copie. Il fatto che sia piccolo e presente in molte copie gli permette di essere più resistente alla degradazione rispetto al nucleare e ne favorisce la formazione di frammenti più grandi (Soffritti, et al., 2016).

Nello specifico i codici a barre *rbcL*, *matK* e *trnH-psbA* sono raccomandati dal “Consortium for Barcode of Life” perché riescono a discriminare il 79% dei diversi gruppi di piante, ma affinché si possano sviluppare è necessaria un’elaborazione dati post-PCR, ci sia il sequenziamento del DNA con poi l’allineamento delle sequenze con successiva loro analisi con il programma BLAST; tutto questo però rende la codifica a barre del DNA relativamente complicata, dispendiosa in termini di tempo e poco intuitiva. Date le difficoltà, il gruppo di ricerca adotta l’analisi della curva di fusione, metodo con diversi vantaggi tra cui: la velocità e la sensibilità, non necessita di gel, è economico e non è necessaria una post elaborazione della PCR. La produzione della PCR, *Real Time PCR*, si ottiene mediante il monitoraggio in fluorescenza proprio della curva di fusione del DNA a doppio filamento; doppio filamento intercalato con il colorante SYBR Green. Vantaggi che consentono alla tecnica di poter essere utilizzata per identificare la presenza di patogeni, nella diagnostica biologica e per la definizione di autenticità alimentare.

Lo studio in sé accoppia l’analisi della curva di fusione SYBR Green I con il *barcoding* del DNA utilizzando le regioni universali per ottenere una rilevazione rapida e capace di misurare l’adulterazione. In questo modo il Bar-MCA è in grado di distinguere lo zafferano dalle diverse specie vegetali e rilevare le tracce di adulteranti nei prodotti commerciali. Con un unico passaggio, con la durata di 3 ore, si termina l’autenticazione. Al contrario, il metodo di sequenziamento richiede molto più tempo, minimo 2 giorni lavorativi, e costi maggiori, 10 volte di più.

I campioni utilizzati nello studio sono descritti nella Tab. 2-12 e Fig. 2-40. Tutti i campioni, ad eccezione degli sconosciuti, sono riconosciuti da un tassonomo.

Tabella 2-12: Elenco dei campioni utilizzati nel presente studio con il relativo luogo di acquisto; ad eccezione degli adulteranti. * luogo riportato nella figura 2-40

Campioni	Luogo di acquisto
<i>11 campioni di C. sativus</i>	Mercati delle erbe, Cina
- 2	Anguo, Cina
- 1	Bozhou, Cina
- 5 (lotti)	farmacia Tongrentang, Cina
- 3 (stimmi interi)	Iran
<i>6 campioni commerciali non identificati</i>	
- 3	Shanghai Traditional Chinese Medicine Co. Ltd. (Shanghai, Cina)
- 2	Mercato delle erbe di Anguo, Cina
- 1	farmacia Tongrentang, Cina

23 adulteranti

- 1 *Calendula officinalis* *
- 4 *Carthamus tinctorius* *
- 1 *Daucus carota* *
- 6 *Dendranthema morifolium* *
- 1 *Hemerocallis fulva* *
- 5 *Nelumbo nucifera* *
- 5 *Zea mays* *

Sample vochmen	Species	Origin
Cs1		Anguo herb market, Hebei
Cs2		Anguo herb market, Hebei
Cs3		Iran BADIEE (Batch 20120110)
Cs4		Iran BADIEE (Batch 20111018)
Cs5		Iran BADIEE (Batch 20121120)
Cs6	<i>Crocus sativus</i>	Tongrentang pharmacy (Batch A1320060920)
Cs7		Tongrentang pharmacy (Batch A20120306101002768)
Cs8		Tongrentang pharmacy (Batch A20111126101002768)
Cs9		Tongrentang pharmacy (Batch A20100420001004968)
Cs10		Tongrentang pharmacy (Batch A20120402200250329)
Cs11		Bozhou herb market, Anhui
CsA1		Anguo herb market, Hebei province
CsA2		
CsA3	unknown	Shanghai traditional Chinese medicine Co., Ltd.
CsA4		
CsA5		
CsA6		Tongrentang pharmacy
Dm1		TianHongJiSheng pharmacy
Dm2		Jinyaotang pharmacy
Dm3	<i>Dendranthema morifolium</i>	Jinglongtang pharmacy
Dm4		Jin xiang pharmacy
Dm5		BoZhou herb market (2013)
Dm6		BoZhou herb market (2012)
Col	<i>Calendula officinalis</i>	BoZhou herb market
Ct1		TianHongJiSheng pharmacy
Ct2	<i>Carthamus tinctorius</i>	JinYaoTang pharmacy
Ct3		JinXiang pharmacy
Ct4		BoZhou herbal market
Nm1		TianHongJiSheng pharmacy
Nm2		JinYaoTang pharmacy
Nm3	<i>Nelumbo nucifera</i>	JinXiang pharmacy
Nm4		JingLongTang pharmacy
Nm5		Bozhou herbal market
Dc1	<i>Daucus carota</i>	DongZhiMen super market
Zm1		DongZhiMen super market
Zm2		TianHongJiSheng pharmacy
Zm3	<i>Zea mays</i>	JinYaoTang pharmacy
Zm4		JingLongTang pharmacy
Zm5		JinXiang pharmacy
Hf1	<i>Hemerocallis fulva</i>	Bozhou herbal market

Figura 2-40: Elenco degli adulteranti utilizzati e relativi luoghi di acquisto (Jiang, et al., 2014)

I campioni di *D. carota* e *Z. mays* sono acquistati freschi, fino al momento dell'estrazione del DNA sono conservati a -80°C in azoto liquido. Tutti i campioni prima di essere congelati

sono macinati finemente con Retsch MM 400 Mixer Mill (Retsch Technology GmbH, Haan, Germania).

Il DNA genomico, del materiale fresco ed essiccato, si isola con il metodo CTAB e quantificato con l'analisi in assorbanza ottica a $\lambda_{260 \text{ nm}}$. L'estrazione del DNA si attua su campioni costituiti da almeno 0,5 g di vegetale in polvere e 50 mg di polvere di un adulterante scelto a caso.

Una volta estratto il DNA si procede all'amplificazione con la RT-PCR, la fusione del DNA e la raccolta dei segnali in fluorescenza. Il sistema RT-PCR ABI 7500 (Applied Biosystems, California, USA) utilizza 20 μl di miscela; la miscela di reazione è composta da:

- 10 ng di DNA genomico
- 10 μl di 2xSYBR Green Premix Ex Taq (Takara, Bio Group, Kyoto, Giappone)
- 0,2 μl di 10 mM di *reverse* e *forward* primers; sintetizzati dal Beijing Genomics Institute (Beijing, Cina)
- 0,4 μl di 50xROX reference Dye II (Takara, Bio Group, Kyoto, Giappone)

Altro punto fondamentale è lo *screening* dei primer: si fa uso di 4 frammenti del *barcoding* di DNA. Sono i geni: *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* e *ITS2* ed il frammento distanziatore *trnL-F*. I geni e i distanziatori per lo zafferano e per gli adulteranti si selezionano mediante analisi della forma della curva di fusione e temperatura di fusione (T_m) degli ampliconi; temperatura alla quale si ha una diminuzione improvvisa della fluorescenza del colorante SYBR Green I intercalato nel DNA a doppio filamento. I frammenti di codice a barre di DNA sono amplificati con le coppie di primer:

- *psbAF/trnHR*
- *1F/724R*
- *3F/1R*
- *ITS2/ITS3*
- *trnL/trnF*

Queste coppie sono in grado di discriminare lo zafferano dagli adulteranti selezionati, in figura 2-41, si riportano i primer e le condizioni della PCR che permettono la loro formazione.

Markers	Primer	Sequences 5' to 3'	Real-time PCR reaction conditions
<i>trnH-psbA</i>	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	50°C 2 min; 95°C 30 sec; 95°C 5 sec, 58°C 34 sec, 40 cycles
	trnHR	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	
<i>rbcL</i>	1F	ATGTCACCACAAACAGAAAAC	50°C 2 min; 95°C 30 sec; 95°C 5 sec, 60°C 34 sec, 40 cycles
	724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
ITS2	ITS2	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	50°C 2 min; 95°C 30 sec; 95°C 5 sec, 60°C 34 sec, 40 cycles
	ITS3	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
<i>matK</i>	3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	50°C 2 min; 95°C 30 sec; 95°C 5 sec, 50°C 10 sec, 54°C 34 sec, 40 cycles
	1R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
<i>trnL-F</i>	trnL	GGAAATCGGTAGACGCTACG	50°C 2 min; 95°C 30 sec; 95°C 5 sec, 60°C 34 sec, 40 cycles
	trnF	ATTGAACTGGTGACACGAG	

Figura 2-41: Elenco dei primer e delle condizioni di RT-PCR. Condizioni che ne hanno permesso la formazione (Jiang, et al., 2014)

Se lo scopo del lavoro è accoppiare il *barcoding* del DNA con l'analisi della curva di fusione è necessario ottimizzare le condizioni del Bar-MCA; l'ottimizzazione prevede che l'esperimento sia ripetuto in triplice copia e considerati il numero di cicli della PCR, la concentrazione del DNA e l'influenza della temperatura di *annealing* per costruire dei modelli delle curve di fusione e del T_m . I suddetti profili derivano da 11 campioni di zafferano; il monitoraggio è ad opera di primer appropriati e dalle condizioni ottimizzate. Per le analisi e per la costruzione dei modelli si utilizza il software ABI 7500 v.2.0.1 che permette anche di ottenere i valori necessari per definire la riproducibilità e la precisione dei modelli della curva di fusione, caratteristiche necessarie per lo studio della precisione e della stabilità del metodo.

I campioni, come già detto, sono identificati da un tassonomo, ma inoltre autenticati anche attraverso l'amplificazione e sequenziamento del frammento *trnH-psbA*.

Le condizioni per la RT-PCR prevedono l'utilizzo di 25 µl di miscela costituita da:

- 10 ng di DNA genomico
- 2,5 µl di 10xEx Taq (Takara, Bio Group, Kyoto, Giappone)
- 0,2 µl di 10 µM di *reverse* e *forward* primers
- 1 µl di 10 mM di dNTP
- 1 U Ex Taq polimerasi (Takara, Bio Group, Kyoto, Giappone)

Il sistema Gene Amp PCR 9700 (Applied Biosystem, California, USA) permette la moltiplicazione dei frammenti. Le combinazioni tempo-temperatura sono le seguenti: 95°C per 5 minuti, 35 cicli a 95°C per 30 secondi, 58°C per 30 secondi, 72°C per 40 secondi e l'estensione finale a 72°C per 5 minuti.

I prodotti della PCR si confermano mediante elettroforesi in gel di agarosio al 1,5% e controllati direttamente sotto luce ultravioletta per la presenza intercalata nelle sequenze di bromuro di etidio; poi sequenziati da un sequenziatore automatico ABI 3730 (Applied Biosystem, California, USA) del Beijing Genomics Institute e allineati con il programma Clustal W.

Per il campione non identificato, CsA₁, i frammenti amplificati trnH-psbA sono sub clonati affinché siano sequenziati; con il sequenziatore ABI 3730 si controllano e sequenziano tre cloni positivi. Le sequenze che ne risultano sono identificate dall'algoritmo MegaBLAST.

L'altro aspetto, oltre al *barcoding* del DNA, è la curva di fusione; la quale è influenzata dal contenuto di guanina/citosina nel DNA ma anche dalla lunghezza e dalla disposizione delle sequenze. La presenza di polimorfismi di regioni di *barcoding* tra lo zafferano e gli adulteranti influenza la forma della curva di fusione e la T_m quindi, per ottenere dei primer adatti per l'autenticazione si utilizzano 5 *barcode* primer per amplificare le regioni di DNA plastidiale rbcL, i geni matK codificanti ed i non codificanti trnH-psbA e i distanziatori trnL-F e ITS2. Le curve di fusione sono analizzate con il software ABI 7500 v.1.4. I risultati evidenziano che le curve di fusione zafferano/adulterante generate da psbAF/trnHR, 1F/724R, ITS2/ITS3, 3F/1R, trnL/trnF originano tutti picchi singoli, un esempio in Fig. 2-42. L'importante è che il prodotto target sia amplificato tramite PCR; in tal modo si ottiene la quantità sufficiente di prodotto che permette la combinazione con SYBR Green I. Per ottenere sufficienti prodotti è necessario tener presente la temperatura di *annealing* e la concentrazione del DNA. Uno dei fattori da tener presente per ottimizzare il metodo è la T_m ; per questo, il gruppo di ricerca decide di utilizzare diverse temperature: 56, 58, 60 e 62°C così che si ottengano delle curve di fusione le cui forme e risultati siano confrontati con le diverse temperature di *annealing*. Impiegando le temperature sopra elencate non si registrano delle differenze nelle curve di fusione; le variazioni ricadono nel range 81,88±0,25 – 82,00±0,27. Anche con le analisi ANOVA non si notano differenze significative di T_m ; la deviazione standard più bassa si ha a 58°C, SD= ±0,20, valore scelto come temperatura di *annealing* ottimale.

L'altro parametro che influenza la curva di fusione è la concentrazione di DNA. Per ottimizzare la concentrazione da utilizzare si servono di un campione di zafferano a caso e, regolata la concentrazione a 100 ng/μl, provvedono a diluire il campione con diluizioni in serie (100; 50; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 ng/μl). Ogni singola concentrazione è amplificata in triplice copia dalla coppia di primer psbAF/trnHR alla temperatura di *annealing* di 58°C e per 40 cicli di PCR. Se i valori dei risultati ottenuti dallo zafferano sono sottoposti all'analisi con il software ABI 7500 si può vedere come la concentrazione di DNA influenzi la curva di fusione; concentrazioni troppo alte o basse portano ad una diminuzione della temperatura di fusione e l'aumento della deviazione standard. Di conseguenza, individuano come concentrazione ottimale di DNA un range compreso tra 5 ng/μl e 10 ng/μl.

Ottimizzata la temperatura di fusione e la concentrazione di DNA, si può procedere con l'analisi dei campioni di zafferano; 11 lotti sono selezionati a caso e amplificati in triplice

copia dalla coppia di primer psbAF/trnHR per ottenere dei modelli di curve di fusione alle quali si possano riferire i campioni commerciali. Risulta che i 33 prodotti di PCR hanno la stessa curva di fusione, la T_m media del frammento psbAF/trnHR ha un valore di $81,92^{\circ}\text{C}$, la deviazione standard di $0,20$ e quella relativa di $0,24\%$. Per testare la precisione dell'analisi della curva di fusione della spezia selezionata a caso e amplificata dalla coppia di primer si ripete l'amplificazione per 6 volte, i risultati mostrano stessa forma e nitidezza, la temperatura di fusione dello zafferano pari a $81,90 \pm 0,063^{\circ}\text{C}$ e RDS pari a $0,077\%$. La riproducibilità si testa con un campione di zafferano suddiviso in 6 aliquote dalle quali si provvede a produrre la curva di fusione; risultato ottenuto: la media di T_m è pari a $81,90 \pm 0,090^{\circ}\text{C}$ e RDS pari a $0,011\%$. La differenza massima di temperatura registrata è di $0,17^{\circ}\text{C}$ per la temperatura del picco di fusione nelle diverse serie, mentre all'interno della stessa serie è di $0,12^{\circ}\text{C}$.

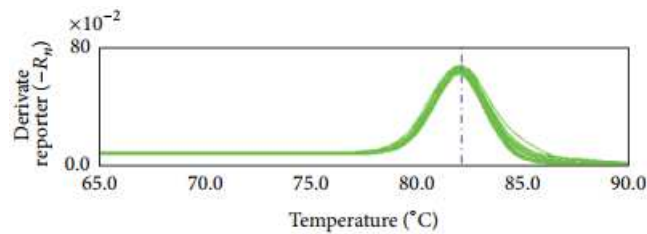


Figura 2-42: Rappresentazione della curva di fusione di *Crocus sativus* ottenuta dal barcode trnH-psbA (Jiang, et al., 2014)

La differenza di temperatura dello zafferano e dell'adulterante è pari a $0,6$ per la coppia primer ITS2/ITS3 e di $1,2$ per la coppia psbAF/trnHR; in figura 2-43 si rendono note le diverse curve di fusione ottenute a seguito dell'amplificazione della coppia psbAF/trnHR.

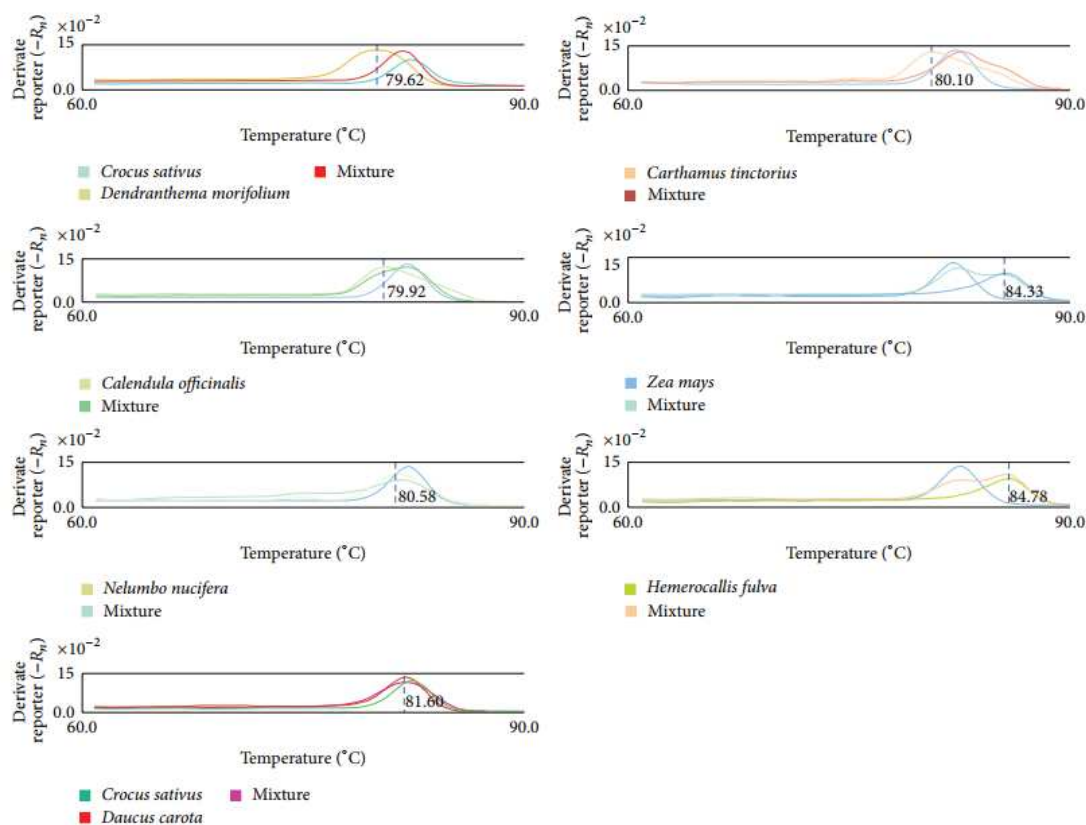


Figura 2-43: Curve di fusione dello zafferano e dei suoi adulteranti ottenute con la Real Time PCR. Le miscele di zafferano autentico e di adulterante preparate sono in rapporto 1:1 (stessa reazione PCR) e sono amplificate in triplicato con la coppia di primer psbAF/trnHR (Jiang, et al., 2014)

In Tab. 2-13, si richiamano i valori delle curve di fusione delle miscele, dello zafferano e dei singoli adulteranti, significativamente differenti tra di loro, presenti nella figura 2-43; la sensibilità e la specificità sono sufficienti per differenziare le tre diverse tipologie di campioni.

I risultati permettono di dire che la coppia primer psbAF/trnHR è adeguata poiché permette di distinguere gli adulteranti in modo sufficiente anche se all'interno della regione psbA/trnH sono presenti polimorfismi.

Tabella 2-13: Temperatura di fusione dei picchi delle singole specie vegetali

Composto	Temperatura media di fusione
<i>C. sativus</i>	81,92°C
<i>H. fulva</i>	84,78°C
<i>Z. mays</i>	84,33°C
<i>D. carota</i>	81,60°C
<i>N. nucifera</i>	80,58°C
<i>C. tinctorius</i>	80,10°C

<i>C. officinalis</i>	79,92°C
<i>D. morifolium</i>	79,62°C

Il passo successivo è autenticare i campioni commerciali incogniti adottando il Bar-MCA. La figura 2-44 presenta un esempio dei risultati ottenuti analizzando il campione CsA1 ottenuto dal mercato delle erbe di Anguo, Cina.

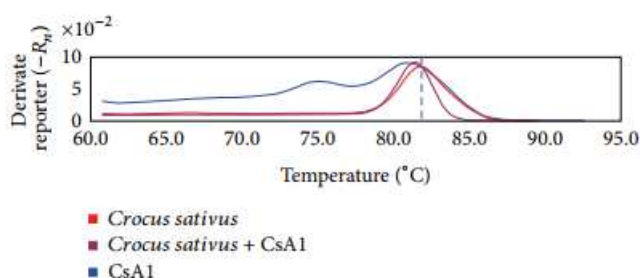


Figura 2-44: Bar-MCA per l'autenticazione dello zafferano commerciale sconosciuto. (linea rossa) curva di fusione dello zafferano autentico, (linea blu) campione commerciale sconosciuto e (linea viola) miscela dei due prodotti. Si osservano delle curve significativamente diverse tra di loro; ciò significa che il campione può essere fraudolento (Jiang, et al., 2014)

Il picco principale della curva di fusione si colloca nell'intervallo di temperatura 80,5-81,6°C; i soli vegetali adulteranti che presentano una curva di fusione simile al campione sono quella della carota e fiore di loto, 81,60°C e 80,58°C, rispettivamente. Questo potrebbe indicare che uno dei due prodotti sia miscelato con la spezia, ma bisogna tener presente che la curva di fusione dipende dal contenuto di guanina/citosina, lunghezza e sequenza del prodotto di PCR; fattori che provocano lo spostamento di T_m , a causa della miscela, verso valori inferiori a 80,5°C definendo in questo modo la possibilità che il prodotto commerciale non è adulterato con i precedenti vegetali ma con il cartamo o la calendula, 79,92°C e 79,62°C, rispettivamente. Altra considerazione da tener presente è il picco secondario a circa 75°C di *N. nucifera* perché anche il campione sconosciuto lo presenta; per cui rintracciando le sequenze dalla coppia di primer si ha l'opportunità di confermare ulteriormente i risultati con la produzione dei cloni. 3 cloni positivi sono selezionati in modo casuale e sequenziati con il risultato prodotto da MegaBLAST, il quale indica che 2 dei 3 sono identici al 100% con il gene *psbA* di *C. sativus* e l'altro è simile al genoma cloroplastico completo del fiore di loto al 99% della somiglianza nucleotidica. Fatte le dovute considerazioni e ottenuti i contro risultati relativi agli esiti del sequenziamento e dall'analisi della curva di fusione si può dichiarare con certezza che il campione sconosciuto è zafferano adulterato con fiore di loto.

I restanti campioni, invece, risultano essere zafferano autentico.

Il metodo Bar-MCA è applicato con successo per l'autenticazione dello zafferano, con tutti i pro e i contro: tempi e costi ridotti se paragonati a quelli necessari per il sequenziamento (3 ore contro minimo 2 giorni, costi 10 volte inferiori), si esegue in un unico passaggio, la curva di fusione permette di autenticare in modo notevole ed è in grado di differenziare i campioni non solo al livello di genere ma anche di specie, se considerate le T_m specifiche di ogni prodotto di PCR, e si ha la possibilità di analizzare i campioni simultaneamente permettendo così di ridurre ulteriormente i costi e avere un'alta produttività, ma c'è la necessità di avere un *database* delle curve di fusione, sono indispensabili i modelli archiviati nella banca dati nel caso in cui fosse necessario accertare la dubbia provenienza dei campioni.

Il gruppo di ricerca propone molteplici considerazioni; per il primer matK risulta che la maggiore differenza di temperatura si ha tra *H. fulva* e *D. morifolium*, mentre per i geni trnL-F ricade tra *N. nucifera* e *Z. mays*. I risultati relativi a T_m indicano che matK non è in grado di differenziare *H. fulva* dallo zafferano per le piccole differenze di temperatura di fusione come anche non è in grado di distinguere *C. sativus* da *D. morifolium*, considerazioni simili anche per il primer trnL-F e ITS2 per la coppia zafferano/calendula. Quindi, solo trnH-psbA potrebbe differenziare lo zafferano dai suoi adulteranti e distinguere proprio quest'ultimi tra di loro in base alla temperatura di fusione. Considerazione finale che il gruppo di ricerca tiene a fare è che se il *barcoding* del DNA sfrutta le grandi differenze di temperatura di fusione per le analisi di conferma consente di ridurre il carico di lavoro successivo.

2.4.7.3 Confronto dell'efficienza di differenti kit utili all'estrazione del DNA e approfondimento dell'analisi genetica ed epigenetica

Il lavoro portato avanti da (Soffritti, et al., 2016) si concentra sul confronto di differenti metodi di estrazione del DNA, sfrutta 3 kit, nelle matrici alimentari. I metodi scelti permettono di recuperare al massimo il DNA; di conseguenza si produrranno marcatori di DNA indispensabili a definire la presenza di adulteranti, tra cui estratti liquidi e solidi di *Buddleja officinalis* e *Gardenia jasminoides*. Si usufruisce dell'analisi di metilazione perché permette di differenziare i differenti tessuti; consente di riconoscere le diverse parti del fiore di *Crocus* utilizzate per adulterare il prodotto. Realizzano anche un confronto con i profili MS-AFLP e AFLP per dimostrare che i segnali polimorfici sono potenzialmente utili ai fini della tracciabilità. L'analisi del modello di metilazione si basa sulla metilazione del DNA, nello specifico della citosina, convertendo quest'ultima in 5-metilcitosina, una delle modifiche epigenetiche più diffuse; ne consegue che lo stato di metilazione delle citosine può cambiare mentre la sequenza del DNA si conserva tra i diversi tessuti dell'organismo. Le differenze che si creano influenzano la struttura della cromatina e l'espressione genica.

Nella 2-45, in elenco, sono descritti i campioni utilizzati dal gruppo di ricerca oltre alla lista delle provenienze ed eventuali note a riguardo dell'estrazione del DNA.

Name ^a	Description	Origin	DNA Extraction ^b
AD.01.JM	Saffron (<i>C. sativus</i>) powder adulterated	France	-
AD.02.JM	Saffron stigmas adulterated	France	-
AD.03.JM	Gardenia (<i>G. jasminoides</i>) extract (liquid)	France	n.v.
AD.04.POL	Safflower (<i>C. tinctorius</i>) petals	Greece	+
AD.05.POL	Gardenia fruit extract (powder)	Greece	n.v.
AD.06.POL	Calendula (<i>C. officinalis</i>) petals	Greece	+
AD.07.POL	Saffron stamens	Greece	-
AD.08.POL	Curcuma (<i>C. longa</i>) rhizome powder	Greece	-
AD.09.POL	Buddleia (<i>B. officinalis</i>) powder extract	Greece	n.v.
AD.10.POL	Buddleia powder extract	Greece	n.v.
AD.11.JM	Curcuma powder	France	-
AD.12.JM	Saffron stigmas adulterated	France	-
AD.13.JM	Saffron powder adulterated	France	-
AD.14.JM	Gardenia extract (liquid)	France	n.v.
AD.15.BM	Curcuma powder	Italy	-
AD.16.BM	Saffron powder Commercial A	Italy	-
AD.17.BM	Saffron powder Commercial B	Italy	-
AD.18.BM	Saffron leaves	Italy	+
AD.19.BM	Safflower leaves	Italy	+
AD.20.BM	Gardenia leaves	Italy	+
AD.21.BM	Buddleia leaves	Italy	+
AD.22.JM	Gardenia fruits	France	n.v.

^a AD: ADulteration project; JM: Jean-Marie; POL: POLissiou; BM: Busconi Matteo. ^b Visible signal on agarose gel. Samples marked with "+" were usually characterized by high quality DNA; "-" or "n.v." samples were usually characterized by DNA degradation, as supported by the presence of a more (-) or a less (+) intense smear; and samples with "n.v." were characterized by the absence of any visible (no visible DNA) signal.

Figura 2-45: Identificazione dei campioni utilizzati per sviluppare i metodi con le relative informazioni (Soffritti, et al., 2016)

Il gruppo rende noto che dopo l'estrazione del DNA dai campioni, ad eccezione di alcuni cioè quelli ottenuti da foglie, tepali, stami e stigmi, tutti sono in grado di dare delle bande ben

visibili. Le eccezioni, invece, originano segnali molto deboli o addirittura assenti, ma non ci sono significative differenze tra i 3 kit in termini di presenza/assenza e di intensità del segnale nel gel di agarosio. I 3 kit utilizzati sono: GeneElute Plant, Plant DNA Purification e DNeasy Plant.

L'assenza o la bassa concentrazione di DNA deriva dalla degradazione dell'acido deossiribonucleico che ostacola la corretta quantificazione dall'estrazione; in questo caso la scelta migliore da adottare per verificare la presenza di qualsiasi DNA presente e vedere l'assenza di inibitori è la PCR (come si è appurato nei precedenti lavori riportati nel sottoparagrafo). In realtà Soffritti aggiunge che per migliorare la PCR sarebbe opportuno aggiungere PVP (polivinilpirrolidone) nel mix di amplificazione perché la migliora. Dei 3 kit, GeneElute Plant permette di ottenere le amplificazioni da molti più campioni rispetto agli altri 2, comunque forniscono gli stessi risultati.

Tabella 2-14: Risultati ottenuti dall'analisi dalle diverse tipologie di campioni

Campioni	Descrizione	Risultati
<i>AD.04.POL</i>	Cartamo petali	Risultati simili con i 3 kit e per i campioni per le analisi AFLP e MS-AFLP
<i>AD.06.POL</i>	Calendula petali	Risultati simili con i 3 kit e per i campioni per le analisi AFLP e MS-AFLP
<i>AD.18.BM</i>	Zafferano foglie	Risultati simili con i 3 kit e per i campioni per le analisi AFLP e MS-AFLP
<i>AD.19.BM</i>	Cartamo foglie	Risultati simili con i 3 kit e per i campioni per le analisi AFLP e MS-AFLP
<i>AD.20.BM</i>	Gardenia foglie	Risultati simili con i 3 kit e per i campioni per le analisi AFLP e MS-AFLP
<i>AD.21.BM</i>	Buddleja foglie	Risultati simili con i 3 kit e per i campioni per le analisi AFLP e MS-AFLP
<i>AD.03.JM</i>	Gardenia estratto liquido	Non si è prodotta l'amplificazione, anche modificando parametri di estrazione ed amplificazione
<i>AD.05.POL</i>	Gardenia estratto dal frutto in polvere	Non si è prodotta l'amplificazione, anche modificando parametri di estrazione ed amplificazione
<i>AD.09.POL</i>	Buddleja estratto in polvere	Non si è prodotta l'amplificazione, anche modificando parametri di estrazione ed amplificazione

Campioni	Descrizione	Risultati
<i>AD.10.POL</i>	Buddleja estratto in polvere	Non si è prodotta l'amplificazione, anche modificando parametri di estrazione ed amplificazione
<i>AD.14.JM</i>	Gardenia estratto liquido	Non si è prodotta l'amplificazione, anche modificando parametri di estrazione ed amplificazione

L'assenza di amplificazione negli estratti, sia liquidi che solidi, può derivare da una completa mancanza di DNA nelle matrici di partenza o per l'incapacità di amplificare il DNA presente a causa di interferenti della polimerasi; i quali eventualmente co-estratti insieme al DNA.

A questo proposito testano l'eventuale presenza di inibitori negli estratti preparando delle miscele di zafferano e di estratto in percentuali uguali, 50:50, e si ripete l'estrazione e l'amplificazione del DNA utilizzando dei primer specifici per lo zafferano e per le specie estratte: gardenia e buddleja. Anche così si è sempre amplificato solo il DNA dello zafferano ma mai l'altro; ne consegue che si può escludere la presenza di inibitori e quindi, la spiegazione più probabile è proprio l'assenza di DNA recuperabile dagli estratti. L'assenza di DNA è un fenomeno molto comune, deriva da come il prodotto è trattato; non si conosce come questi siano ottenuti o il tipo di trattamento applicato per produrli. Comunque, non si può escludere la possibilità di inibitori direttamente legati al DNA degli estratti.

Per i campioni rimanenti, non riportati nella tabella sovrastante, il kit Gene Elute Plant Genomic DNA Miniprep produce delle migliori prestazioni; le amplificazioni delle PCR ottenute permettono l'utilizzo in successive analisi.

Lo studio riporta che in genere la dimensione massima del filamento di DNA alimentare amplificato tramite PCR, a seguito e in funzione dell'intensità delle lavorazioni, assume una dimensione massima generalmente di 500 bp; con l'unica eccezione per il primer plastidiale matK che è in grado di amplificare frammenti fino a 900 bp.

Come per gli studi condotti dai precedenti autori, dall'estrazione del DNA si ottengono dei primer universali che però non sono in grado di discriminare le diverse specie, ma utilizzati proprio perché si trovano nelle zone altamente conservative del DNA; elemento che viene sfruttato per produrre dei primer specifici più selettivi. Questi, anche se si trovano nelle regioni altamente conservative, comunque, hanno la possibilità di incorrere in variazioni di sequenze tra le diverse specie. Gli ampliconi dei 2 geni plastidiali utilizzati sono matK e rbcL proprio perché entrambi sono presenti nelle 6 specie prese in esame: zafferano, calendula, cartamo, curcuma, buddleja e gardenia. Inoltre, hanno scoperto che le sequenze di matK, delle 6 specie,

subiscono più variazioni rispetto a *rbcL*. A questo proposito l'identità di sequenza, che rappresenta la similarità tra due sequenze, di *matK* è compresa tra il 73-93%; basato sul confronto rispettivo delle coppie *C. sativus* e *G. jasminoides* e la coppia *C. tinctorius* e *C. officinalis*, mentre per la sequenza *rbcL* i valori sono dell'ordine dell'89% per *C. sativus* associato a *C. tinctorius* e *C. officinalis* e del 98% per *C. tinctorius* con *C. officinalis*. Il divario tra le sequenze *matK* di solito è di 0-3%, mentre per *rbcL* è pari a 0%. La specificità si testa sulle diverse specie; si veda la figura 2-46 in cui si evidenzia l'amplificazione effettuata con i marcatori selettivi su: crocus (Croc), cartamo (Cart), curcuma (Curc), calendula (Cal), gardenia (Gard) e buddleja (Budd). Si ha un'alta specificità e amplificazione solo nelle specie previste per i marcatori di crocus, curcuma, cartamo e calendula, mentre meno specifici sono quelli per gardenia e buddleia in quanto si amplificano anche in altre specie come cartamo e reciprocamente in gardenia e buddleja, ma nessuno amplifica nel crocus.

Ai fini di evitare dei falsi negativi o positivi, è importante che i primer per gli adulteranti non si amplifichino nello zafferano e viceversa.

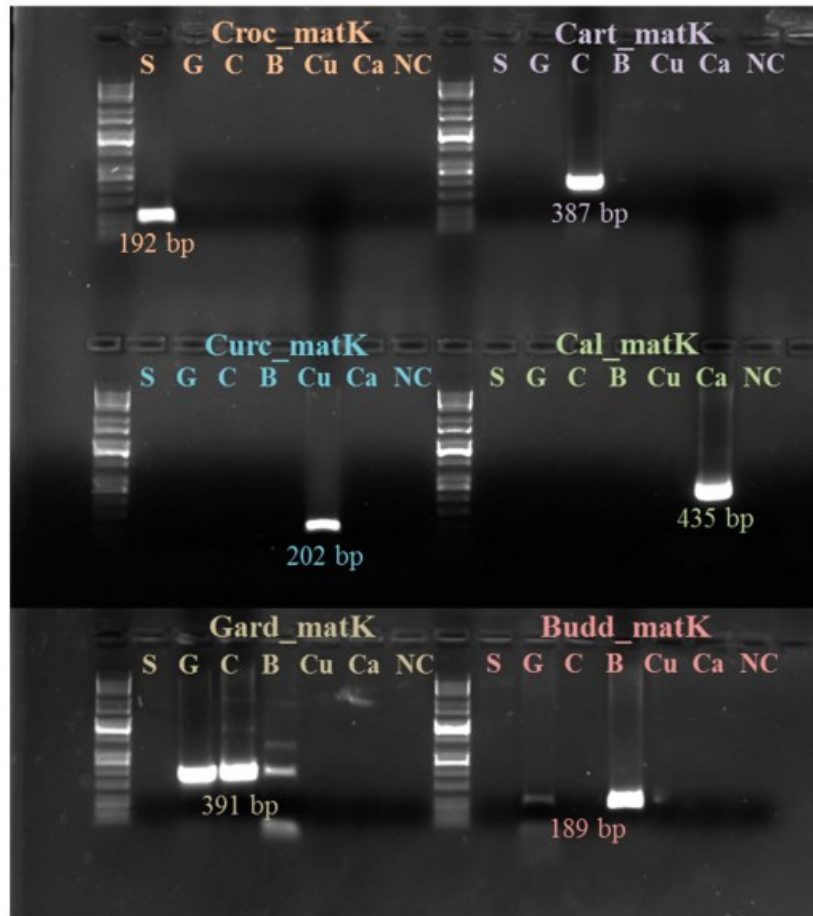


Figura 2-46: Amplificazione della PCR con i marcatori specifici matK sulle diverse specie in esame. S (zafferano); G (gardenia); C (cartamo); B (buddleja); Cu (curcuma) e Ca (calendula); NC (controllo negativo) (Soffritti, et al., 2016)

Il difetto maggiore del *marker* matK dello zafferano è che risulta amplificare anche molte delle altre specie del genere *Crocus*; conseguenza che provoca la difficoltà di poterlo impiegare come specie-specifico, ma anche se ripiega l'attenzione su un altro marcatore come opaK, matK risulta essere sempre il migliore in termine di robustezza e specificità. Considerazioni che hanno portato il gruppo di ricerca a continuare lo studio con il *marker* matK.

Considerando 4 campioni adulterati (AD.01.JM; AD.02.JM; AD.12.JM; AD.13.JM) se sottoposti all'amplificazione con il solo *marker* specifico per *Crocus* si ha la totale assenza di altre amplificazioni; visivamente per conoscere il grado di adulterazione si osserva il grado di rilascio di colore in acqua. Dalle figure 2-47, e 2-48 si nota come i campioni adulterati tendono a rilasciare più colore, l'acqua si colora più intensamente e con un rilascio più rapido, dinamica che si osserva nel prodotto commerciale rispetto a ciò che accade per lo zafferano autentico.

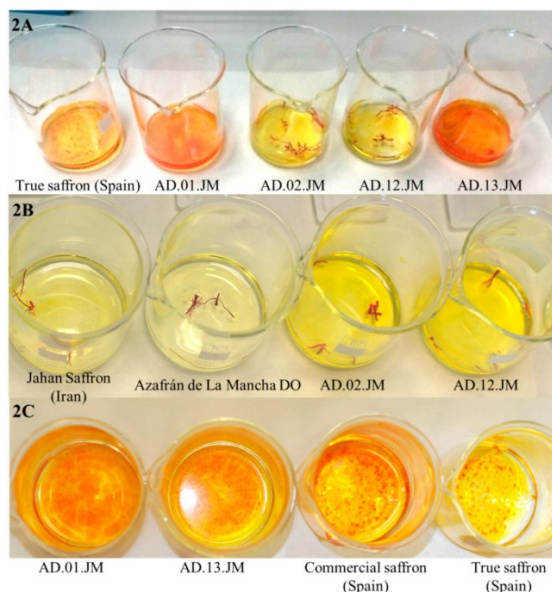


Figura 2-47: Confronto dei diversi campioni in termini di rilascio di colore in acqua; sono stati testati sia campioni di zafferano adulterato che campioni di zafferano autentico. (A e B) Mostrano la differente capacità dei pigmenti di solubilizzarsi in acqua considerando lo stesso quantitativo di prodotto in polvere e in stimmi. (C) Considera la differente capacità di rilasciare il colore nel solvente da parte di zafferano autentico, spagnolo in polvere, e un campione commerciale, di zafferano spagnolo, oltre a due campioni adulterati di cui si sono avvalsi nel presente lavoro. Sia gli adulterati che i prodotti commerciali rilasciano una colorazione molto più forte rispetto al vero zafferano (Soffritti, et al., 2016)

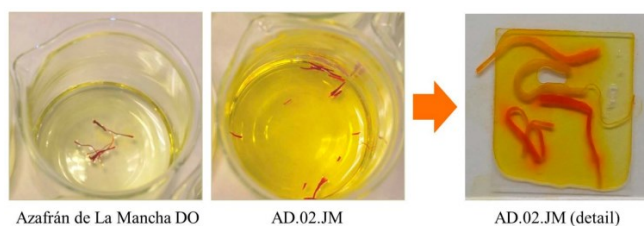


Figura 2-48: Confronto degli stimmi di zafferano, stesso quantitativo, di un prodotto autentico e di uno adulterato; confronto ottenuto dopo solo tre minuti in acqua fredda. Il dettaglio degli stimmi adulterati permette di osservare colorazioni differenti di questi ultimi dal rosso a giallo; si ipotizza che l'adulterazione del campione sia un mix di molti zafferani differenti e di anni diversi proprio perché quest'ultimi diventano marroni con il passare degli anni. Il criminale per riportare il colore originale ha utilizzato dei coloranti sintetici. L'assenza di amplificazione con altri marcatori, tranne che per *Crocus*, supporta questa teoria (Soffritti, et al., 2016)

I *marker* sviluppati affinché siano utilizzabili per l'autenticazione dello zafferano devono essere validati, nelle miscele delle specie vegetali, e mostrare la capacità di riconoscere la presenza di eventuali adulteranti anche con percentuali molto basse. Quindi, per la validazione e per stimare la sensibilità della tecnica hanno preparato dei campioni artificialmente adulterati, miscele preparate prima dell'estrazione del DNA:

- zafferano più curcuma
- zafferano più buddleja
- zafferano più gardenia
- zafferano più cartono
- zafferano più calendula

e i rapporti tra i vegetali utilizzati per la valutazione sono: 50/50; 80/20; 90/10; 95/5; 98/2; 99/1; 99,5/0,5.

La tecnica risulta essere in grado di rilevare la presenza il DNA di adulterante anche per la coppia con un rapporto pari a 99,5/0,5. Le percentuali utilizzate si riferiscono all'adulterante aggiunto prima dell'estrazione del DNA, non la quantità che si ha dall'estrazione, poiché il rapporto finale, di sicuro, sarà diverso dal rapporto iniziale in polvere.

Le altre analisi, considerate in questo lavoro, sono le AFLP e le MS-AFLP. Sono in grado di rilevare le diverse parti del fiore dello zafferano quali ad esempio petali, stili e stami, spesso utilizzati come adulterante quasi esclusivamente nei prodotti in polvere; se fossero utilizzati nei prodotti commerciali con stimmi interi sarebbero facilmente identificabili con l'analisi microscopia. Si utilizzano queste analisi, non le analisi con approcci molecolari, perché lo zafferano stesso ha una scarsa diversità genetica, sarebbe particolarmente difficile rilevare l'adulterazione con le altre porzioni del fiore.

In base all'origine geografica e alla differente parte nello stesso organismo si hanno dei cambiamenti epigenetici; l'analisi AFLP confronta i profili genetici mentre l'analisi MS-AFLP riguarda i profili epigenetici.

Verificare la degradazione del DNA è il punto di partenza per rilevare l'adulterazione con altri tessuti della stessa pianta; l'analisi preliminare si svolge su 3 campioni di zafferano puro: un campione di stimmi e due in polvere. In Fig. 2-49 si può osservare come i profili AFLP degli stimmi, interi o in polvere, sono quasi esattamente gli stessi. Osservazione che permette di dire che l'essiccazione non influisce in modo così elevato sulla degradazione del DNA.

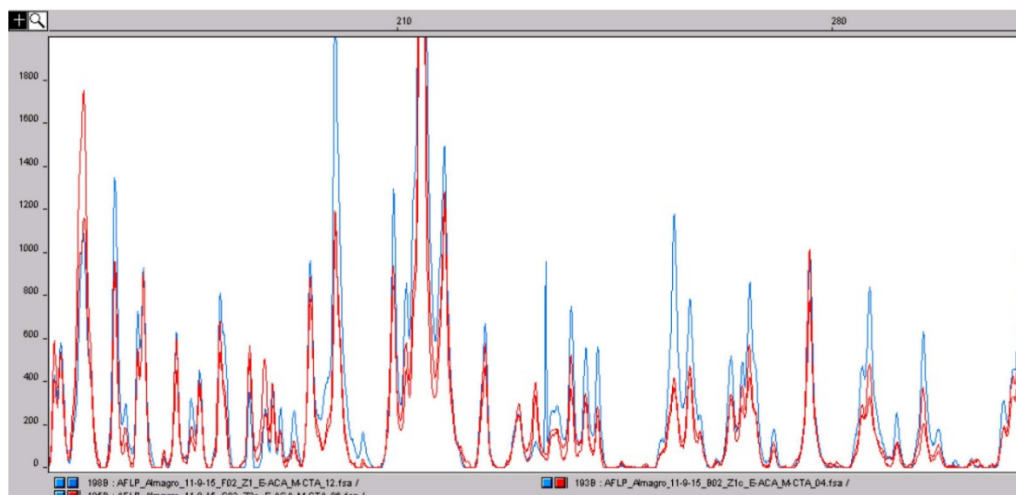


Figura 2-49: Confronto dei profili AFLP di (in blu) di un campione di stigmi interi e 2 (in rosso) di zafferano in polvere (Soffritti, et al., 2016)

Per l'analisi si considerano un insieme di stigmi, stami e tepali. Le miscele così realizzate, a partire dai diversi tessuti, provengono da diverse origini geografiche e sono conservate all'interno della banca del germoplasma di Cuenca. I risultati riferiscono che non c'è nessuna variazione nei profili AFLP di stigmi e tepali tra i *pool* e i tessuti; in realtà, presentano alcuni polimorfismi. Se un *mix* al 50% di stigmi e stami, preparato prima dell'estrazione del DNA, è sottoposto a ripetizione dell'estrazione e analisi AFLP si osserva che i polimorfismi non derivano dalla formazione di artefatti del metodo proprio perché si ritrovano nella miscela.

Se considerata l'analisi MS-AFLP essa è in grado di fornire dei risultati più interessanti se vengono presi come riferimento gli stigmi: si riscontrano delle differenze molto piccole nel profilo epigenetico tra i *pool* degli stigmi, dei tepali, degli stigmi e tepali, ma una grande differenza epigenetica tra i singoli campioni che hanno un'origine geografica differente. L'analisi genetica non riesce a rilevare alcuna differenza fra i due tessuti, al contrario l'analisi epigenetica è riuscita a rilevare un certo numero di polimorfismi. I risultati più interessanti si ottengono con gli stami: i profili dell'antera e del filamento sono significativamente diversi (Fig. 2-50), si nota un elevato numero di polimorfismi all'interno dei quattro gruppi dei tessuti e nei profili degli stigmi e tepali.

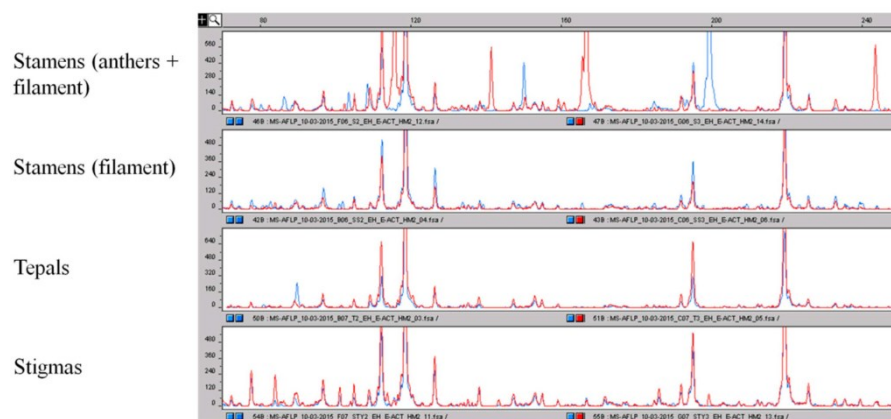


Figura 2-50: Confronto del profilo epigenetico ottenuto utilizzando l'analisi MS-AFLP di differenti parti del fiore del crocus. Il profilo epigenetico degli stami interi è davvero differente rispetto a quello dei filamenti o delle altre parti del fiore. Si hanno elevati polimorfismi tra gli stami e altre parti del fiore stesso (Soffritti, et al., 2016)

Le analisi, replicate indipendentemente, forniscono sempre lo stesso profilo epigenetico; la grande differenza secondo gli autori deriva dai grani pollinici all'interno delle antere, infatti rimuovendo quest'ultime e mantenendo solo il filamento il profilo MS-AFLP è molto simile a quello degli stigmi.

Per tutto il tempo in cui si eseguono le analisi delle repliche si ottengono sempre gli stessi dati; cioè la somiglianza elevata tra gli stigmi, i tepali e i filamenti, mentre si rileva una variazione elevata con gli altri tessuti e con il profilo epigenetico dello stame.

Arrivati a questo punto è possibile testare i campioni di zafferano commerciale applicando le stesse metodologie, AFLP e MS-AFLP. Si preparano anche alcuni campioni adulterati artificialmente: miscele di zafferano in polvere commerciale con gli stami, stesse percentuali di prima. Effettuata l'estrazione del DNA si confrontano i profili, genetici ed epigenetici, dello zafferano commerciale e dei mix con i profili genetici ed epigenetici degli stigmi e degli stami ottenuti in precedenza. Dal confronto si rileva, come previsto, una variabilità genetica assente o molto bassa. Dall'analisi epigenetica si ottiene un risultato significativo: il profilo epigenetico può essere influenzato dall'ambiente; l'elevata variabilità potrebbe ostacolare l'applicazione dell'analisi epigenetica per la rivelazione dei contaminanti da stami.

Il set di campioni, presenti nella Fig. 2-45, necessario per lo sviluppo dei marcatori molecolari considerano anche i 5 estratti, due liquidi e tre solidi in polvere, presumibilmente ottenuti dalla gardenia dalla buddleja. I campioni sono acquistati online. La convalida della funzionalità dei marcatori sviluppati è rappresentata dai campioni adulterati prodotti

artificialmente aggiungendo percentuali differenti di adulterato allo zafferano prima dell'estrazione del DNA (si vedano le percentuali elencate in precedenza).

Per le analisi dei profili AFLP e MS-AFLP si utilizzano 12 diversi tessuti: 4 gruppi di tepali, 4 gruppi stami e 4 gruppi di stigmi; acquisiti dal World Saffron and Crocus Collection depositati nella Banca del Germoplasma vegetale di Cuenca (Cuenca, Spagna). I campioni una volta raccolti sono immediatamente processati per l'estrazione del DNA e prodotta una miscela di stigmi al 50%, o polvere di zafferano, con il 50% di stami e tepali, prima dell'estrazione del DNA. In questo modo si riesce a vedere se i segnali polimorfici tra i diversi tessuti possano essere rilevati anche nei mix.

Il gruppo di ricerca segue le istruzioni del produttore del kit Gene Eleute Plant Genomic DNA Mini prep (Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO, USA) per l'estrazione del DNA e analisi AFLP e MS-AFLP, dai diversi tessuti del fiore; con l'accortezza di piccole modifiche. Per gli estratti liquidi prima dell'estrazione del DNA si attua un protocollo di precipitazione così da ottenere un pellet da cui è possibile estrarre l'acido desossiribonucleico. Per i vegetali con un'elevata concentrazione di metaboliti secondari, intralciano il recupero del DNA e/o successive reazioni enzimatiche, aggiungono il 4% di PVP ad ogni campione.

I risultati dell'estrazione del DNA, qualitativi e quantitativi, si valutano con l'elettroforesi su gel di agarosio all' 1%, per il DNA estratto da foglie e petali, mentre 1,5% per le altre tipologie; distinzione che tiene conto della maggiore degradazione del DNA. Usufruiscono di 3 coppie di primer universali, spesso utilizzati per il *barcoding* del DNA, per amplificare il DNA estratto. I primers utilizzati sono:

- 2 coppie di primer sviluppati su geni plastidiali per la sottounità grande di RUBISCO: rbcL-F; rbcL-R
- maturase K: matK-kim1R; matK-kim1F
- 1 coppia di primer specifica per le regioni ITS-S2F; ITS4. Sono geni nucleari per la trascrizione della subunità grande del rRNA

La PCR si produce su un volume finale pari a 25 µl. La soluzione contiene:

- 10 ng o 1 µl di DNA template (1 µl nel caso in cui il DNA estratto non sia visibile su gel di agarosio)
- 1x PCR buffer (Promega, Fitchburg, WI, USA)
- 1,5 mM Mg²⁺
- 0,15 mM dNTPs
- 1 µl di ogni primer 10M
- 4% PVP
- 1 U DNA polimerasi (Promega, Fitchburg, WI, USA)

I parametri del ciclo di amplificazione sono: 95°C per 5 minuti; 35 cicli di 30 secondi a 95°C, 40 secondi alla temperatura di *annealing* (Fig. 2-51), 72°C per 1,5 minuti e l'estensione finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti della reazione di PCR sono caricati ed eseguiti su gel di agarosio contenente 1,5%, 0,5xTBE.

Ottenuti gli ampliconi, si eseguono le ricerche di omologia tramite il programma BLAST e nel database NCBI per verificare la corrispondenza dei frammenti amplificati e le regioni previste. Allineate le sequenze e utilizzate le regioni polimorfiche si progettano dei primer più selettivi per ogni specie in esame e si confrontano con le coppie per stimare la percentuale di identità nucleotidica e le differenze tra le sequenze nucleotidiche. La validazione dei *marker* si effettua mediante PCR in un volume finale di 25 µl. I prodotti della PCR si caricano ed eseguono su un gel di agarosio al 2% 0,5xTBE. I *marker* risultano essere capaci di riconoscere la presenza di un'eventuale adulterazione.

Primer Name ^a	Sequence	Annealing Temperature	Amplicon Size (bp)	Typology
matK-KIM1R	ACCCAGTCCAATCTGGAAATCTTGGTTC	58 °C	Variable, circa 900	Universal
matK-KIM3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG			
rbcl-F	ACCACAAAACAGAGACTAAAGC	52 °C	Variable circa 600	
rbcl-R	GTAATAATCAAGTCCACCRGC			
ITS-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	52 °C	Variable circa 400	
ITS4	TCTCCGCTTATTGATATGC			
Gard_matK_Fw	TGGGATACTCTTATTGATAG	55 °C	391	
Gard_matK_Rev	CCGGGTGAAACCAAATAC			
Budd_matK_Fw	GAACGTCTTTGTTAAGGTTAAG	58 °C	189	
Budd_matK_Rev	CTTGGATGAAACCAAAGCGA			
Curc_matK_Fw	GTAAAAATAGAACATCTTGGAG	56 °C	202	
Curc_matK_Rev	ATATGGTTGAGACCAAAAATG			
Cart_matK_Fw	TGTATGTGAATATGAATCTGGC	54 °C	387	
Cart_matK_Rev	CCATTGAACGCTTACCAGCG			
Croc_matK_Fw	ATCTTATAATAGTATGTTGTGAT	54 °C	192	
Croc_matK_Rev	TGTATGATTGATACCAAAAAGT			
Cal_matK_Fw	CATACTCTGGGCCACAAC	53 °C	435	
Cal_matK_Rev	GAGGAAGCCGTATTCATATT			

^a Gard, gardenia; Budd, buddleia; Curc, curcuma; Cart, *Carthamus*; Croc, crocus; Cal, calendula.

Figura 2-51: Dettagli delle copie primer specie-specifiche con le relative temperature di annealing (Soffritti, et al., 2016)

Nell'analisi AFLP e MS-AFLP metil-sensibili la quantità degli enzimi da utilizzare è valutata utilizzando un'applicazione disponibile sul sito web Fermentas. La tecnica AFLP utilizza gli enzimi di restrizione EcoRI e MseI, mentre per MS-AFLP si utilizza un sistema di restrizione EcoRI o in alternativa la copia di isoschizomeri MspI e HpaII. Quest'ultimo enzima è inattivo se una o entrambe le citosine sono completamente metilate; situazione possibile quando entrambi i filamenti sono metilati, ma riesce a spaccare la sequenza se si trova nella forma emi-metilata, comunque, si considera indipendente dalla metilazione. MspI riesce a scindere solo una delle 2 sequenze, riesce a tagliare la sequenza C5mCGG, ma non 5mCCGG. Effettuate le amplificazioni, utilizzando delle combinazioni di primer che si adattano ai due enzimi di restrizione, i prodotti amplificati dalle amplificazioni selettive si esaminano in un analizzatore genetico ABI Prism 3130 (Life Technology) e studiati con il software fornito dal venditore.

(Soffritti, et al., 2016) ha ottenuto, con il suo studio, dei risultati molto interessanti nel caso in cui si utilizzano i marcatori AFLP e soprattutto MS-AFLP perché evidenziano una grande differenza nel profilo degli stami interi rispetto al profilo ricavato dagli stigmi e tepali; permettendo così di rilevare l'aggiunta di stami tinti, adulterante proprio di *C. sativus*.

2.4.7.4 DNA barcoding-High Resolution Melt (Bar-HRM)

(Bosmali, et al., 2017) e il suo gruppo di ricerca ha preferito approfondire lo studio dell'analisi HMR come metodo post-PCR, metodo che permette di identificare le differenze, in modo rapido e quindi con alta produttività, nella regione di interesse senza i tempi necessari e i costi sostenuti per il sequenziamento; risulta essere lo strumento più valido per differenziare le specie strettamente correlate tra di loro.

Con (Jiang, et al., 2014) si è analizzato il Bar-MCA, con Bosmali si vedrà accoppiato il *barcoding* del DNA con la tecnica dell'HMR (Bar-HRM).

Il Bar-HRM è sfruttato per studiare l'adulterazione a carico dello zafferano, con altre specie vegetali, e fornire delle prove di identità oltre a definire la concentrazione utilizzata di adulterante nei campioni. Per avere dei risultati attendibili hanno incluso un attento campionamento di stimmi di zafferano provenienti da Kozani (Grecia); zona particolarmente vocata per la produzione della spezia. Lo studio mira anche a definire se esistono delle differenze intra ed interspecifiche nella specie coltivata in quella certa area geografica. Dagli esiti saranno in grado di definire se c'è la possibilità di estendere i risultati ai potenziali adulteranti appartenenti a generi differenti. La sensibilità della procedura utilizzata si conferma con l'analisi HPLC in fluorescenza dei metaboliti secondari della curcuma. Si fa uso proprio della curcuma perché risulta tra gli adulteranti spesso aggiunti alla polvere di zafferano nei

prodotti confezionati e nei piatti preparati dalla ristorazione collettiva. In realtà, lo studio ha anche una valenza scientifica per la certificazione DOP dello zafferano greco di Kozani perché molto spesso, ultimamente, sia dal venditore che dal consumatore sono richieste delle prove scientifiche che certifichino il prodotto.

I campioni utilizzati sono riportati nella figura 2-18 e gli standard nel sottoparagrafo relativo all'HPLC.

Le foglie e gli stimmi sono congelati e conservati in azoto liquido fino al momento delle prove, ma prima di iniziare l'analisi il materiale è macinato, separatamente, in mortai di agata sterilizzati. La polvere, 0,2 g, di *C. sativus* è utilizzata per estrarre il DNA genomico totale utilizzando il metodo CTAB modificato (per i dettagli si rimanda all'articolo) per poi conservare il DNA a -80°C. L'isolamento del DNA invece dagli adulteranti: calendula, curcuma, gardenia, mais e cartamo si effettua a partire da 0,4 g di polvere con il kit Nucleospin Food (Macherey-Nagel, Düren, Germania) secondo le istruzioni del produttore.

Le polveri di zafferano e di curcuma sono mescolate a 7 diverse concentrazioni, 0,5%; 1,0%; 2,0%; 10,0%; 15,0%; 25,0%; 50,0%, espresse come % p/p, prima di portare avanti l'estrazione del DNA. La concentrazione dell'acido desossiribonucleico si stima con i metodi spettrofotometrici alle lunghezze d'onda 260-280 nm, utilizzando un Eppendorf Biofotometro, mentre l'integrità con l'elettroforesi su gel di agarosio all'1,0%. I campioni analizzati hanno una concentrazione di circa 20 ng/μl.

Affinché si possa applicare il Bar-HRM è innanzitutto necessario progettare dei nuovi *marker* sulla base della regione trnL delle specie utilizzate, disponibili nella banca dati NCBI, prodotte con il software PrimeL3 Output e allineare le sequenze nucleotidiche per sottoporle allo strumento di ricerca BLAST. La specificità dei primer si valuta con Primer-BLAST che rileva tutte le omologie di tutte le sequenze che sono presenti in GenBank.

Per il rilevare la *fingerprint* dello zafferano e delle altre specie, appartenenti al genere *Crocus*, si utilizzano i primer universali UBI ISSR. Le amplificazioni per le analisi ISSR, con un PTC 200 (MJ Research Inc. Watertown, MA), si eseguono in 20 μl di soluzione in cui sono presenti:

- 20 ng di DNA
- 200 mM di ogni dNTPs
- 1,5 mM di MgCl₂
- 40 pmol di primer
- 2 μl di 10xTaq DNA polimerasi (Invitrogen, Carlsbad, CA)

Un ciclo di amplificazione presume: 94°C per 5 minuti, 35 cicli a 94°C per 30 secondi; 46-56°C, a seconda del primer utilizzato, per 90 secondi; 72°C per 90 secondi e l'estensione finale a 72°C per 5 minuti. Poi, i prodotti dell'amplificazione si separano mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% e colorati con bromuro di etidio; in tal modo si è in grado di rilevare gli ampliconi alla luce ultravioletta (UV Mimbis Pro DNR Bio-Imaging Systems, Gerusalemme, Israele); la scala dei marcatori ha una dimensione di 1Kb di DNA (Invitrogen, USA).

I primer ISSR, selezionati dall'“University of British Columbia” (Canada), utilizzati per l'amplificazione della PCR, originano un risultato del tipo presenza/assenza della banda. I dati ottenuti dalle corse elettroforetiche sono analizzati con il software Fragment Profiler v1.2 (Amersham Biosciences Piscataway NY, USA) che in automatico dimensiona gli alleli e i rende i dati ottenuti dai frammenti dei *marker* ISSR utilizzabili.

Per l'analisi HRM è necessaria l'amplificazione PCR come anche la fusione del DNA e la fluorescenza del punto finale dell'amplificazione; fasi eseguite in un volume di 15 µl, all'interno di termociclatore Rotor-Gene 6000 Real Time PCR 5P HRM (Corbet Research, Sidney, Australia).

La miscela di reazione della PCR contiene:

- 20 ng DNA genomico
- 1x tampone PCR
- 1,5 mM di MgCl₂
- 0,2 mM di dNTPs
- 300 nM di *reverse* primers
- 1,5 mM Syto 9; colorante del DNA a doppio filamento verde fluorescente, intercalante di terza generazione, ad alte concentrazioni riesce a saturare tutti i siti disponibili nel DNA a doppio filamento (Invitrogen, Paisley, Regno Unito)
- 1 U Kapa Taq DNA polimerasi (Kapa Biosystems, USA)

L'utilizzo del Syto è preferito rispetto al SYBR Green I perché la sua fluorescenza è più accurata e può essere utilizzata per monitorare l'accumulo del prodotto amplificato durante la PCR e alla successiva fusione del prodotto su Rotor Gene-600. Il protocollo utilizzato per la reazione PCR prevede: 95°C per 3 minuti; 35 cicli a 95°C per 20 secondi; la temperatura di *annealing* per 20 secondi (57-58°C in funzione al primer); 72°C per 10 secondi e la fase finale di estensione a 72°C per 1 minuto.

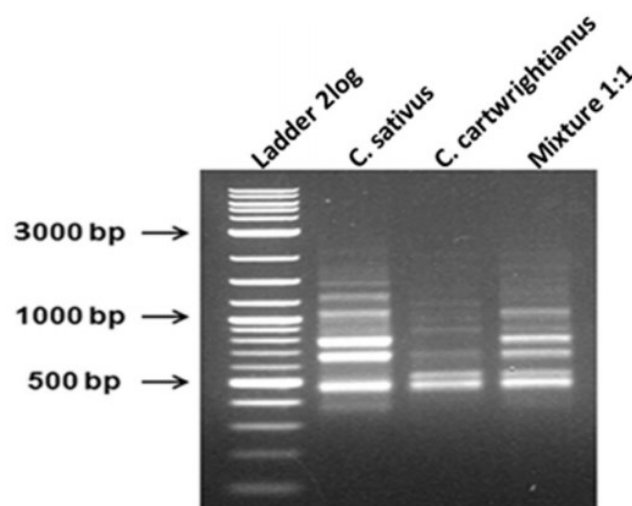
La HMR, invece, prevede che ci sia una fase di pre-fusione alla temperatura appropriata per 90 secondi e poi la fusione, con una rampa di temperatura di 10°C in cui gli incrementi

sono di 0,1°C ogni 2 secondi. Ad ogni fine fase di *annealing* si acquisiscono i dati di fluorescenza; la fluorescenza al punto finale prevede che sia mantenuta la temperatura di 72°C per 30 secondi fino a quando si concludono 40 cicli da 46-56°C per 20 secondi.

Inoltre, affinché si possa aumentare la riproducibilità e l'affidabilità delle analisi che portano alla formazione della curva HMR sono necessari diluizioni di DNA genomico.

A seguito delle analisi, risulta che i 7 primers sono in grado di produrre 91 bande di cui solo 2 sono isolate, la percentuale di loci polimorfici risulta essere del 64,56% con un contenuto medio di informazioni polimorfiche pari a 0,214. L'analisi dei *cluster* dei dati produce la divisione dei genotipi in 2 gruppi con 2 popolazioni raggruppate insieme e la terza in un clade separato. Sono utilizzate 2 diverse tipologie di analisi dei dati: la PCoA e AMOVA; la PCoA definisce che l'analisi dei cluster è più appropriata per rilevare il rapporto genetico condiviso dello zafferano, conferma la bassa variazione genetica di *C.*

sativus, mentre AMOVA mostra che c'è una piccola varianza genetica, il 4%, tra le popolazioni e il 96% tra gli individui appartenenti alla stessa popolazione. Questo permette di affermare le strette relazioni tra le popolazioni di zafferano appartenenti alla zona di coltivazione della DOP "Kronos Kozanis" in Grecia, ciò potrebbe essere dovuto al modo di propagare vegetativamente la spezia, alla selezione dei genotipi e all'esistenza stretta della base genetica nel germoplasma dello zafferano quindi, ci si aspetta una distinzione del genotipo della DOP da qualsiasi altra specie di *Crocus* poiché la *fingerprint* genetica di ogni specie è unica e distintiva. Difatti, l'utilizzo di marcatori ISSR permette di distinguere *Crocus sativus* da uno dei suoi più probabili progenitori, *Crocus cartwrightianus*, si riporta



in figura 2-52.

Figura 2-52: Esempio di utilizzo di uno dei marker ISSR per distinguere *C. sativus* da *C. cartwrightianus*. La loro miscela assomiglia ad entrambe, ma comunque il marker consente la rilevazione (Bosmali, et al., 2017)

Rispetto al codice a barre del DNA che sfrutta l'analisi della curva di fusione (Bar-MCA), l'utilizzo del *barcoding* del DNA con l'analisi di fusione ad alta risoluzione (Bar-HMR) permette di ottenere le curve di fusione di diversi ampliconi, in funzione della forma delle curve di fusione, anche quando si hanno gli stessi valori di T_m ; stessi valori che si verificano quando si è di fronte a curve di fusione degli eterozigoti. Consente anche di massimizzare la possibilità di rilevare adulterazioni e di stimare la concentrazione dell'adulterante vegetale impiegato.

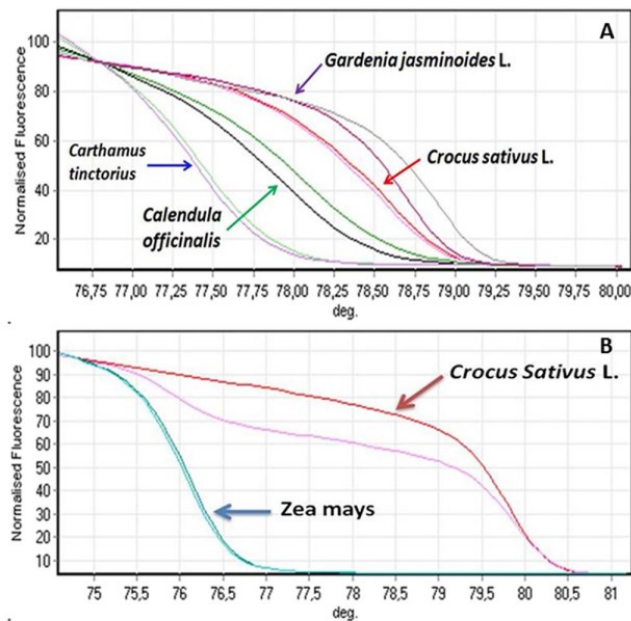


Figura 2-53: Curve HMR normalizzate per gli ampliconi delle diverse specie vegetali ottenute dal marker specifico *trnL* (Bosmali, et al., 2017)

Dalla figura 2-53 si può vedere come ogni vegetale produce una curva a sé stante; permettendo di distinguere la curva di *C. sativus* da quelle delle altre specie; di conseguenza in caso di campioni adulterati si può facilmente individuare e definire la specie a quale genotipo corrisponde. L'esperimento che permette di appoggiare questa ipotesi prevede che sia analizzata una miscela costituita da zafferano e da ognuna delle specie studiate con un rapporto reciproco in peso del 50%. Tra tutti gli adulteranti però si è scelta solo la curcuma; curcuma che è stata aggiunta allo zafferano con 7 differenti concentrazioni; la più alta pari al 50%, mentre la più bassa allo 0,5%, espressa in peso.

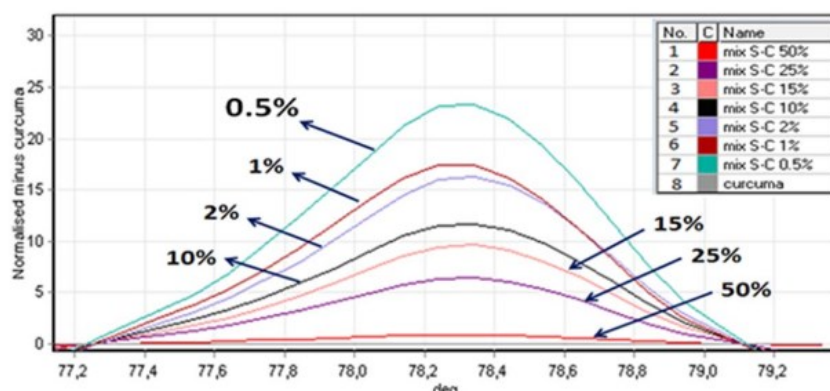


Figura 2-54: Rappresentazione delle curve di fluorescenza normalizzate del DNA con le diverse concentrazioni delle due specie vegetali, curcuma e zafferano. In figura anche il riferimento di *Curcuma longa* autentica (curva grigia) (Bosmali, et al., 2017)

Da come si può vedere sempre nella figura 2-54, man mano che le concentrazioni cambiano gradualmente anche la forma della curva cambia; maggiore è la concentrazione maggiore è l'appiattimento della curva. *C. longa* è rilevabile all'interno dello zafferano anche a concentrazioni di 0,5%; questi risultati indicano che l'approccio basato sul Bar-HRM e i marcatori specie-specifici possono aiutare a rilevare le potenziali frodi a carico dello zafferano da parte della curcuma e di stimarne anche la percentuale. Una difficoltà in cui si potrebbe incorrere è necessità di possedere una banca dati con le curve di fusione per tutte le specie. Banca dati indispensabile come controllo per identificare eventuali campioni sconosciuti.

2.4.8 Reazione di trasferimento protonico - Spettrometria di massa (PTR-MS)

La PTR-MS è più veloce, altamente sensibile, necessita di piccole quantità di campione e i trattamenti sono ridotti al minimo o assenti se si paragonata alla GC; tecnica che richiede un'elevata quantità di campione, è distruttiva ed esige lunghi tempi di estrazione e analisi. Questa tecnica, la PTR-MS, al momento si utilizzata per il controllo qualità di *C. sativus*.

Il suo utilizzo permette di ottenere delle *fingerprints*, date dai composti volatili organici (VOC), di campioni di zafferano di differente qualità. Se questa tecnica si abbina con la chemiometria permette di caratterizzare la qualità dello zafferano in base alla forza dell'aroma. In letteratura trova impiego soprattutto per la determinazione di composti aromatici di zafferano iraniano ed italiano. Tecnica associata ad un detector TOF (Kiani, et al., 2018).

CONCLUSIONI

In Italia abbiamo una grande tradizione culinaria in cui lo zafferano è il principe tra gli ingredienti delle ricette tradizionali. Primo tra tutti i piatti conosciuti, anche a livello mondiale, è il risotto alla milanese. Più di nicchia, ma marchigiano, è il brodetto di Porto Recanati. Per le ricette sono sufficienti pochi stimmi affinché il piatto si colori del tipico colore giallo e abbia il caratteristico aroma. Caratteristiche che permettono al piatto di assumere dei sapori unici, ma la coltivazione e la produzione richiede alti costi, riflettendosi sul prezzo di mercato: nel 2020 1 g dell'“oro rosso” oscilla tra i 35-60 €. Prezzo particolarmente accattivante per coloro che vogliono arricchirsi facilmente. La truffa a discapito dei consumatori è principalmente a carico della polvere di zafferano, forma fisica che ne facilita l'aggiunta di materiale estraneo senza che sia facilmente rilevato ad occhio nudo. Nel corso degli anni si è passati dall'utilizzo di specie vegetali, ai coloranti sintetici fino a costruire delle vere e proprie miscele che simulano la spezia, miscele che a volte risultano talmente congegnate che ne rendono difficile l'identificazione. Tra gli adulteranti più comuni si ricordano, *Calendula officinalis*, *Curcuma longa* e *Carthamus tinctorius*, ma anche lo stesso *Crocus sativus* in quanto si utilizzano diverse porzioni del fiore, mentre tra i coloranti sintetici la tartrazina, il giallo chinolina e Ponceau 4R, per citarne alcuni. Ultimamente dalle importazioni in Europa si nota un aumento dei casi in cui alla spezia sono aggiunti gli estratti ottenuti dai frutti di *Gardenia jasminoides*; non è tanto il fatto che si sta sostituendo un prodotto con un altro che faccia scalpore, ma che si è arrivati ad aggiungere un prodotto con effetti negativi sulla salute del consumatore. La pianta contiene una particolare molecola con attività genotossiche. La maggior parte delle adulterazioni, ma le frodi in generali, sono condotte con il solo fine lucrativo, non interessa al soggetto che le compie gli effetti che si possono ripercuotere sul consumatore.

I gruppi di ricerca, le organizzazioni, gli enti pubblici sono sempre in allerta; man mano che le scienze e le tecnologie avanzano anche colui che intende portare avanti le proprie convinzioni progetta nuovi modi per poter evadere i controlli; è come l'espressione popolare “è un cane che si morde la coda”, non c'è possibilità di poter concludere la situazione. Ma quindi che fare? Lasciare che il criminale continui la sua attività accontentandosi dei metodi già sviluppati e funzionali? Non è ammissibile, proprio perché sta giocando non solo con la

fiducia che un cliente ripone nel soggetto, ma soprattutto perché c'è in gioco la salute del consumatore.

Nel 2003 lo zafferano è per la prima volta normato secondo la ISO 3632; negli anni successivi la normativa internazionale subisce diverse revisioni, fino all'attuale del 2011. Normativa che è in grado di definire un eventuale prodotto falsificato, ma sembra avere alcune lacune nella determinazione degli adulteranti, difatti da uno studio approfondito in questo elaborato si è appreso che si sta intervenendo, per inserire ulteriori tecniche e metodi riconosciuti dalla ISO. Revisione che permetterebbe a coloro che applicano un determinato metodo, utile a rilevare anche le più piccole quantità possibili degli adulteranti, di essere riconosciuto. Per poter abbassare molto i costi di un prodotto adulterato si deve far uso di grandi quantità di adulterante, ma è indispensabile riuscire a rilevare la più bassa concentrazione presente poiché molto spesso non si utilizza un solo prodotto ma una miscela; miscela che può rendere le analisi più difficili sia in termini qualitativi, si considera la capacità di rintracciare le specie, i coloranti o altri materiali, ma anche in termini quantitativi perché per sfuggire ai controlli possono utilizzare contemporaneamente diversi composti che nel loro insieme risultano essere tanti, ma se presi individualmente possono risultare al di sotto dei limiti di rilevazione dello strumento. Inoltre, va detto che esistono dei metodi, non ancora normati, che permettono di rilevare sia adulteranti noti che sconosciuti, ma è necessario prendere in considerazione i tempi e i costi necessari per poter portare avanti le analisi. Si è sempre più alla ricerca di metodi che siano rapidi, semplici, poco costosi, robusti e sensibili.

Lungo tutto lo studio si sono considerate diverse tecniche e metodi che permettono di autenticare lo zafferano e identificare le eventuali sue adulterazioni; si passa dalle tecniche consolidate nel tempo e riconosciute dalla ISO 3632:2011 come la spettrofotometria UV-Vis, l'HPCL o la TLC, a tecniche più moderne ed ancora sotto valutazione come la spettroscopia IR, il naso, la mucosa e la lingua elettronica o anche le analisi molecolari che si poggiano su metodi basati sulla PCR, per poi passare ancora alla risonanza magnetica protonica. Tutti questi esempi hanno dei pro e dei contro, non esiste una tecnica e metodo universale che permette di poter autenticare lo zafferano e identificare gli adulteranti; se esistesse non sarebbero possibili le adulterazioni.

Di sicuro la ricerca non si fermerà, cercherà per quanto le sia possibile di stare al passo con le azioni svolte in maniera fraudolenta a discapito di *C. sativus* e cercando di contrastarle.

BIBLIOGRAFIA

- Agostinucci, G., 2009. *Rivista di agraria.org*. [Online]
Available at: <https://www.rivistadiagraria.org/articoli/anno-2009/zafferano-crocus-sativus-1/>
- Barani, D. R., Ciclo XXIII di dottorato. *Frodi alimentari dal 2000 al 2009 in Italia. analisi descrittiva delle principali fattispecie nell'attuale contesto sanzionatorio penale*. s.l.:s.n.
- Bosmali, I., Ordoudi, S., Tsimidou, M. & Madesis, P., 2017. Greek PDO saffron authentication studies using species specific molecular. *Food Research International*, Issue 100, pp. 899-907.
- Carmona, M. et al., 2006. Crocetin Esters, Picrocrocin and Its Related Compounds Present in *Crocus sativus* Stigmas and *Gardenia jasminoides* Fruits. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC-ESI-MS. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Issue 54, pp. 973-979.
- Guijarro-Díez, M., Castro-Puyana, M., Crego, A. L. & Marina, M. L., 2017. Detection of saffron adulteration with gardenia extracts through the determination of geniposide by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, Issue 55, pp. 30-37.
- Heidarbeigi, K. et al., 2015. Detection of Adulteration in Saffron Samples Using. *International Journal of Food Properties*, Issue 118, p. 1391–1401.
- ICQRF, 2019. *REPORT ATTIVITÀ 2019*.
- ISO, 3.-2., 2010.
- ISO, 3.-1., 2011.
- Jiang, C. et al., 2014. Barcoding Melting Curve Analysis for Rapid, Sensitive, and Discriminating Authentication of Saffron (*Crocus sativus* L.) from Its Adulterants. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 14(809037).

- Kiani, S., Minaei, S. & Ghasemi-Varnamkhasti, M., 2018. Instrumental approaches and innovative systems for saffron quality. *Journal of Food Engineering*, Issue 216, pp. 1-10.
- Marieschi, M., Torelli, A. & Bruni, R., 2012. Quality Control of Saffron (*Crocus sativus* L.): Development of SCAR Markers for the Detection of Plant Adulterants Used as Bulking Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Issue 60, pp. 10998-11004.
- Moore, J. C., Spink, J. & Lipp, M., 2012. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77(4), pp. 118-126.
- Morozzi, P. et al., 2019. A Quick and Efficient Non-Targeted Screening Test for Saffron Authentication: Application of Chemometrics to Gas-Chromatographic Data. *Molecules*, 24(2602).
- Ordoudi, S. et al., 2007. Uncovering a challenging case of adulterated commercial saffron. *Food Control*, Issue 81, pp. 147-155.
- Petrakis, E. A., Cagliani, L. R., Polissiou, M. G. & Consonni, R., 2015. Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting. *Food Chemistry*, Volume 173, p. 890–896.
- Rai, N., 2016. *Rai News Food*. [Online]
Available at: <https://www.rainews.it/dl/rainews/articoli/Vino-II-17-marzo-1986-il-caso-metanolo-Dallo-scandalo-a-leader-nel-mondo-09595d49-2809-4108-b17f-392bf102802f.html>
- Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M. & Belligno, A., 2011. HPLC/PDA/ESI-MS Evaluation of Saffron (*Crocus sativus* L.). *NPC Natural Product Communications*, 6(12).
- Schumacher, S. et al., 2016. *Authentication of saffron (Crocus sativus L.) using 1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy*. s.l., XIII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science 2016.
- Sereshti, H., Heidari, R. & Samadi, S., 2014. Determination of volatile components of saffron by optimised ultrasound-assisted extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, Issue 143, pp. 499-505.

- Sereshti, H., Poursorkh, Z., Aliakbarzadeh, G. & Zarre, S., 2018. Quality control of saffron and evaluation of potential adulteration by means of thin layer chromatography-image analysis and chemometrics methods. *Food Control*, Issue 90, pp. 48-57.
- Shawky, E., El-Khair, R. M. A. & Selim, D. A., 2020. NIR spectroscopy-multivariate analysis for rapid authentication, detection. *LWT - Food Science and Technology*, Issue 122.
- Sobolev, A. P. et al., 2019. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends in Food Science & Technology*, Issue 91, p. 347–353.
- Soffritti, G. et al., 2016. Genetic and epigenetic approaches for the possible detection of adulteration.. *Molecules*.
- Tirrò, C. S., aprile 2011. *Le frodi alimentari: concetti di adulterazione, sofisticazione, alterazione, contraffazione, pericolosità, nocività e genuinità*.. [Online]
Available at:
http://www.salute.gov.it/resources/static/ministero/usmaf/Polizia_Sanitaria_aprile_2011/1_e_frodi_alimentari_tirro.pdf
- Torelli, A., Marieschi, M. & Bruni, R., 2014. Authentication of saffron (*Crocus sativus* L.) in different processed, retail products by means of SCAR markers. *Food Control*, Issue 36, pp. 126-131.