



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Chimiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI  
INDIRIZZO SCIENZE CHIMICHE  
CICLO XXIII°

**Applicazioni innovative della Risonanza Magnetica Nucleare  
alle matrici alimentari. Uno studio sul caffè verde.**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

**Supervisore :** Ch.mo Prof. Stefano Mammi

**Dottorando :** Giampaolo Venditti

# Indice

<b>Astract.....</b>	<b>IV</b>
<b>Cap.1. Introduzione.....</b>	<b>1</b>
1.1. Fisiologia della pianta di caffè e varietà e morfologia dei chicchi.....	1
1.2. I costituenti chimici del chicco di caffè.....	3
1.2.9. il processo di torrefazine.....	15
1.3. Ricerche sulla qualità del caffè: lo stato dell'arte....	16
1.3.1. Il concetto di qualità del caffè.....	16
1.3.1.1. Studi sull'acqua nel caffè verde.....	17
1.3.1.2. Studi sull'origine geografica/botanica.....	18
1.4. Impiego dell'NMR nella scienza e tecnologia degli alimenti.....	20
1.4.1. NMR nel dominio dei tempi.....	21
1.4.1.1. Applicazioni QC/CA dell'NMR nel dominio dei tempi.....	22
1.4.1.2. Analisi del rilassamento NMR.....	25
1.4.2 NMR ad alta risoluzione.....	28
1.5. Scopo della ricerca.....	30
<b>Cap.2. Materiali e metodi.....</b>	<b>32</b>
2.1. Metodologie sperimentali.....	32
2.1.1 Principi teorici dell'NMR.....	32
2.1.1.1. Meccanismi di rilassamento.....	35
2.1.1.2. Sequenze NMR per la misura dei tempi di rilassamento.....	37
2.1.2. NMR ad alta risoluzione bidimensionale.....	42
2.1.2.1. TOCSY.....	43
2.1.2.2 NOESY.....	44
2.1.2.3 DOSY.....	45
2.2. Metodi di elaborazione dei dati.....	48
2.2.1. Metodi chemiometrici.....	48

2.2.1.1	Analisi delle componenti principali (PCA).....	49
2.2.1.2	Partial Least Square to latent structure (PLS).....	55
2.2.2	Trasformata inversa di Laplace.....	56
<b>Cap. 3</b>	<b>Risultati e discussione.....</b>	<b>61</b>
3.1	Studio delle mobilità protoniche delle componenti presenti nel chicco verde tramite NMR nel dominio dei tempi.....	61
3.1.1	Studio delle mobilità e della distribuzione dell'acqua el chicco di caffè verde mediante NMR nel dominio dei tempi.....	59
3.1.2.	Cenni allo studio delle mobilità dei lipidi.....	73
3.2	Sviluppo e applicazione di un metodo per la determinazione simultanea del contenuto di umidità e lipidi nel caffè verde mediante NMR nel dominio dei tempi.....	79
3.3	Determinazione dell'origine geografica del caffè verde mediante NMR ad alta risoluzione.....	102
3.3.1.	Assegnazione degli spettri della fase organica.....	102
3.3.1.1.	Assegnazione dello spettro $^1\text{H}$ in $\text{CDCl}_3$ .....	102
3.3.1.1.	Assegnazione dello spettro $^{13}\text{C}$ in $\text{CDCl}_3$ .....	109
3.3.2.	Analisi degli spettri della fase acquosa.....	120
3.3.2.1.	Scelta del solvente.....	120
3.3.2.2.	Riproducibilità dell'estrazione.....	121
3.3.2.3.	Assegnazione degli spettri della fase acquosa.....	122
3.3.2.4.	Confronto tra gli spettri dell'estratto acquoso.....	131
3.3.3.	Analisi statistica.....	136
3.3.3.1.	Analisi statistica degli spettri protonici in cloroformio.....	136
3.3.3.2.	Analisi degli spettri al $^{13}\text{C}$ dell'estratto in cloroformio.....	142
3.3.3.3.	Analisi statistica degli spettri dell'estratto acquoso.....	147
3.3.3.4.	Creazione di un modello finale.....	152
<b>Cap. 4</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>155</b>

<b>Bibliografia.....</b>	<b>158</b>
<i>Appendice I. Descrizione del rilassometro Bruker Minispec.....</i>	<i>166</i>
<i>Appendice II. Metodi di calibrazione.....</i>	<i>177</i>
<i>Appendice II. Parametri di Input ed output di Upen.....</i>	<i>179</i>
<i>Appendice IV. Analisi gascromatografica di alcuni oli di caffè.....</i>	<i>183</i>

# Abstract

La qualità del caffè verde rappresenta il principale requisito per la realizzazione di una bevanda apprezzata a livello commerciale.

Attualmente tra i vari campi interessati dalla produzione scientifica sulla qualità del caffè verde vi sono lo sviluppo di metodologie per garantire l'autenticità e lo studio delle metodiche più appropriate per la quantificazione dell'acqua.

Nel primo caso la necessità di metodi rapidi per l'autenticazione del caffè è divenuta in tempi recenti un'esigenza sempre più pressante a causa della crescente diffusione di pratiche di adulterazione nella filiera commerciale di questo prodotto.

Tuttavia sono ancora limitati i metodi formulati per la determinazione dell'origine geografica; inoltre, la bassa numerosità di campioni analizzati nei lavori compiuti in tale ambito rende i risultati trovati non sufficientemente significativi.

Rimane infine ambiguità sui possibili markers da utilizzare nella discriminazione.

Occorrono da un lato quindi metodi adatti ad analisi routinarie per il controllo del maggior numero possibile di campioni, e dall'altro una scelta univoca di possibili markers per la discriminazione geografica delle varie qualità di caffè.

Nell'ambito degli studi compiuti sull'acqua rimane ancora aperta la problematica della distribuzione dell'acqua stessa all'interno della matrice. La comprensione di questo fenomeno è di notevole importanza in quanto è stata osservata ad esempio in letteratura la correlazione fra il grado di idratazione e le proprietà meccaniche del chicco verde.

La ricerca presentata in questo dottorato ha cercato di dare una risposta alle problematiche aperte appena descritte con il ricorso alla Risonanza Magnetica Nucleare, recentemente utilizzata con successo in ambito alimentare.

In questo lavoro sono stati sviluppati infatti due metodi per la determinazione dell'origine geografica del caffè verde, rispettivamente con l'NMR nel dominio dei tempi, e con l'NMR ad alta risoluzione, quest'ultimo in combinazione con l'analisi statistica multivariata.

Il primo metodo, basato sull'NMR nel dominio dei tempi, è stato realizzato per mezzo di uno spettrometro operante alla frequenza di 20 MHz (Bruker Minispec Mq20), e permette la determinazione simultanea delle percentuali di acqua e olio di un elevato numero di campioni in maniera rapida e riproducibile tramite l'utilizzo della sequenza spin echo.

I valori delle percentuali di acqua e olio nei campioni sottoposti ad analisi è stato ricavato utilizzando due differenti calibrazioni per l'acqua e per l'olio.

Le percentuali di acqua e olio ottenute dall'applicazione del metodo su 500 campioni di caffè verde sono stati sottoposti ad analisi statistica (ANOVA).

I risultati ottenuti indicano che una buona discriminazione dei continenti di provenienza dei campioni è possibile utilizzando il valore di percentuale di olio come marker.

Per quantificare correttamente le componenti acqua e olio con la sequenza spin echo è stata necessaria l'analisi preliminare dei tempi di rilassamento trasversale ( $T_2$ ) nel chicco verde con l'NMR nel dominio dei tempi mediante l'applicazione della sequenza CPMG. Le distribuzioni continue di tempi di rilassamento trasversale sono state ricavate invertendo con la trasformata di Laplace con l'aiuto del software Upen le curve CPMG ottenute.

L'assegnazione preliminare della popolazioni di  $T_2$  relative alla fase acqua nella regione compresa fra 0.1 e 3 ms è stata realizzata confrontando i profili di rilassamento di una serie di chicchi verdi con i corrispondenti profili ottenuti per essiccazione in stufa.

La regione di  $T_2$  relativa alla componente lipidica dei chicchi verdi è stata invece assegnata sia confrontando i profili di rilassamento di una serie di chicchi a diversi livelli di idratazione sia confrontando le distribuzioni di  $T_2$  nel chicco con quella dell'olio estratto dallo stesso.

Allo scopo di far luce sulla distribuzione dell'acqua nel caffè verde la regione della distribuzione di  $T_2$  attribuita all'acqua è stata studiata in dettaglio con una serie di esperimenti sistematici di reidratazione graduale di chicchi precedentemente essiccati.

Le distribuzioni di  $T_2$  ottenute da chicchi essiccati e reidratati manualmente fino al 35% (su base secca) sia con  $H_2O$  che con  $D_2O$  e, alternativamente, per esposizione in atmosfera di umidità controllata, sono state confrontate con quelle di chicchi verdi tal quali. I dati ottenuti indicano che fino a ~ 10% l'acqua incorporata nel chicco manifesta una mobilità ridotta, in quanto probabilmente adsorbita o legata con le pareti cellulari mediante ponti idrogeno. La reidratazione con acqua deuterata ha evidenziato inoltre il contributo dello scambio protonico al segnale della distribuzione osservato.

L'analisi dei profili di distribuzioni dell'acqua ha inoltre portato all'osservazione che questo risulta determinato dalla convoluzione di due popolazioni di mobilità protonica, rispettivamente centrate a ~ 0.5 e 1 ms. Sia nel chicco verde che in quelli reidratati è stato trovato che a contenuti di acqua fino a 4% delle due popolazioni è visibile solo quella a mobilità inferiore, mentre a percentuali intermedie sono presenti entrambe.

Con riferimento all'articolo di Pittia e collaboratori, la componente a rilassamento rapido potrebbe essere associata all'effetto di antiplasticizzazione dell'acqua, mentre la popolazione caratterizzata da rilassamento più lento può essere correlata all'effetto plasticizzante dell'acqua. In questo senso i nostri dati forniscono una conferma ed un'interpretazione in termini di mobilità protoniche al cosiddetto effetto di antiplasticizzazione, scoperto a livello macroscopico.

La distribuzione dei tempi di rilassamento trasversale dei  $T_2$  della regione associata ai lipidi (cioè quella compresa fra ~10 ms e ~ 300 ms) mostra un profilo multimodale, che suggerisce la presenza di tre diverse mobilità protoniche. Tale osservazione è stata confermata sia con lo studio della dipendenza dalla temperatura delle mobilità protoniche, compiuto sia per la fase lipidica all'interno dei chicchi, sia per l'olio fresco isolato mediante estrazione soxhlet, sia dal confronto con dati di letteratura.

Questa osservazione ha trovato inoltre conferma nei dati di letteratura.

Un metodo per la discriminazione geografica è stato infine elaborato mediante l'analisi statistica multivariata delle risonanze NMR sia degli estratti organici che acquosi di 48 campioni di caffè verde di diversa provenienza. I dati ottenuti indicano che nell'estratto organico gli acidi grassi sembrano essere efficaci nel discriminare i campioni africani da tutti gli altri analizzati, mentre le componenti minoritarie sono efficaci nella differenziazione tra i campioni con diversa provenienza.

In particolare il Kahweolo correla positivamente con i campioni del Brasile, mentre la caffeina e i composti minoritari differenziano i campioni centro americani da quelli del sud America, e altri componenti minoritari non identificati che caratterizzano i campioni africani e quelli asiatici.

La caratterizzazione dell'estratto acquoso mediante esperimenti bidimensionali ha permesso inoltre l'identificazione di sistemi di spin caratteristici degli estratti protonici dei campioni di caffè brasiliano, quali zuccheri minoritari e isomeri dell'acido clorogenico.

Esperimenti di diffusione DOSY condotti sull'estratto acquoso dei campioni di origine africana hanno inoltre avvalorato l'ipotesi di una possibile interazione caffeina/ acidi clorogenici. In particolare i dati ottenuti fanno supporre che nell'estratto acquoso del campione africano analizzato, la caffeina è presente in soluzione sia in forma libera che complessata con l'acido clorogenico.

## **Abstract (English)**

The quality of green coffee represents the main condition for the production of a good end product at a cup level.

Nowadays among the fields which the scientific publications deal with about the green coffee quality there are the development of methodologies for the authenticity assurance, and the study of the most appropriate methods for the water quantification.

In the former case, because of the increased diffusion of adulteration practises along the coffee commercial chain, recently the need of rapid methods for coffee authentication is increased. However, the number of developed methods for the geographical origin are still limited; furthermore, the low number of analyzed samples in all the works carried out about this topic makes the achieved results not sufficiently statistically significant.

Ambiguity also remains about the markers to be used for the geographical discrimination of coffee qualities. Thus are required, on the one hand, suitable routine methods to control as many samples as possible, on the other hand a unique set of markers has to be established.

In the field of the studies carried out on water the problem of its distribution within the coffee matrix is still open. The understanding of this phenomenon is of great importance, since a correlation between the degree of hydration and the mechanical properties of the green coffee bean has been observed in literature, for instance.

The research presented in this PhD work has tried to give answers to open questions mentioned above with the help of the magnetic resonance technique, which has been successfully employed in the food field .

In this work two different methods have been developed to achieve the geographical origin determination of green coffee, by using the time domain NMR (TD NMR), and with the help of the high resolution NMR technique combined to multivariate statistical analysis , respectively methods.

The first one, based on the time domain NMR has been realized by means of a benchtop analyser operating at a resonance frequency  $^1\text{H}$  of 20 MHz (Bruker Minispec Mq20), and also enables the fast simultaneous determination of water and oil percents of a high number of samples in a non destructive, and reproducible way, through the NMR spin echo sequence.

The percentages of water and oil in the analysed samples has been obtained by using two distinct calibration lines, respectively .

The results obtained by the application of the method on 500 green coffee samples have been subjected to statistical analysis (ANOVA)

The obtained results indicate that a good discrimination of the continental origins of the samples is possible by using the oil percent value as a marker.

To correctly evaluate water and oil components by means of the spin echo sequence the preliminary analysis of the transverse relaxation times ( $T_2$ ) in the green bean with the help of by using the

CPMG NMR sequence. The continuous  $T_2$  distributions were obtained by inverting the experimental CPMG curves with the Laplace transformation with the help of a suitable Upen program

The preliminary assignment of the  $t_2$  mobility populations relative to water phase in the region spanning from 0.1 to 3 ms was achieved by comparing the relaxation profiles of a series of green beans to the corresponding profiles of the same oven-dried beans

The  $T_2$  region of the lipid component of the was assigned by comparing either the relaxation profiles of a some green beans at different hydration levels, or by comparing the  $T_2$  distribution of the untreated bean with the one of the freshly extracted oil from the same bean.

To shed light on the water distribution in green coffee bean, the  $T_2$  region, which was previously assigned to water proton mobility, was analysed in details by means of systematic gradual re-hydration experiments on previously desiccated coffee beans.

The  $T_2$  distributions obtained either from manually rehydrated beans either with  $H_2O$  or  $D_2O$  up to 35% (dry basis) or, alternatively, wetted by exposure of a controlled air environment, were compared to the untreated beans. Data obtained indicate that up to  $\sim 10\%$  water embedded in the bean exhibits a rather restricted mobility, likely as a result of interaction with the cell walls or hydrogen bond formation.

Furthermore, the relaxation profiles obtained by rehydrating the dry beans with  $D_2O$  highlighted the contribution of the proton exchange mechanism to the overall Laplace inversion signal.

By the analysis of the profile of water distributions was found that this is determined by the convolution of two distinct proton mobility populations, positioned at 0.5 and 1 ms, respectively.

In the green bean as well as in the re-hydrated ones, which were analysed, it was found that at hydration levels up to 4%, only the fast relaxing population can be observed (i.e. the one at a lower  $T_2$ ), while at intermediate water contents they are both present.

The fast relaxing component could be assigned to the antiplasticization effect of water, while the one which is characterized by a slower relaxation rate may be associated to water plasticizing the macromolecular polymers. In this sense our observation could provide an interpretation in terms of proton mobility to the so called antiplasticization effect, which was first discovered at a macroscopic level.

The analysis of the  $T_2$ s distribution of the region assigned to the lipid phase (i.e the one by  $\sim 10$  ms to  $\sim 300$  ms) shows a multimodal profile, which in particular suggests the presence of three different proton mobility populations. This observation, which was observed in the green bean as well as in the freshly extracted oil from the same bean, was then confirmed either by analysing the temperature dependence of the components and or by literature.

An alternative method for the geographical authentication was also elaborated by means of the multivariate statistical of the NMR resonances obtained either from the organic or the aqueous extracts of 48 samples belonging to different geographical origins. The obtained data indicate that in the organic extract the fatty acids seem to be effective as a markers for the discrimination the African samples among all the other ones, while the resonances of the minor constituents are able to differentiate all the samples of different origin. In particular kaweahl compound positively correlates with the Brazilian samples, while the caffeine peaks and other minor compounds discriminate the middle American samples from the ones of the south. Finally, other minor constituents characterize African and Asian samples. characterization of aqueous extract through bidimensional NMR experiments allowed the identification of characteristic spin systems of the other not identified components.

DOSY diffusion experiments were carried out on the aqueous extract of African samples and supported the hypothesis of an interaction occurring between caffeine and chlorogenic acids. In particular, the obtained data allow one to suppose that in the aqueous extract of the analyzed African sample the caffeine is present in solution both in the free form and as a complex with the chlorogenic acid.



# Capitolo 1. Introduzione.

## 1.1. Fisiologia della pianta di caffè e varietà e morfologia dei chicchi.

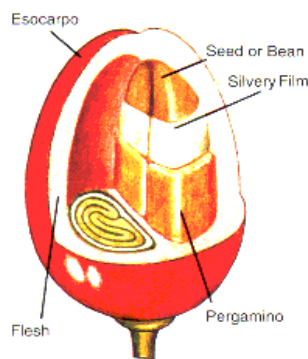
Il caffè viene classificato nella famiglia delle Rubiaceae, che comprende più di 500 generi e circa 8000 specie. Si tratta di una famiglia biologicamente e morfologicamente diversificata; cataloga minuscole erbacee, piccole piante floreali classificate come gardenie, liane, alberi tropicali e arbusti che crescono negli strati bassi delle foreste.

Morfologicamente la pianta di caffè è un arbusto (Figura 1.1) che può raggiungere un'altezza fino a 6.5 m in funzione della varietà e delle condizioni di crescita.



**Figure 1.1 e 1.2:** Foto della pianta di caffè e della “ciliegia” (cherry).

Le inflorescenze si raggruppano da 2 a 20 fiori bianchi e una volta impollinati portano ai frutti che maturano in 7-11 mesi. I chicchi di caffè che ne derivano sono i semi delle drupe (ciliegie) ovali che, maturando, da verdi diventano rosse .



**Figura 1.3:** Struttura della ciliegia di caffè

Le ciliegie sono costituite da una pellicola esterna (esocarpo) che racchiude la polpa (mesocarpo), ricca in zucchero ed acqua, e il seme propriamente detto (Figura 1.3). Quest'ultimo consiste di due, raramente tre, emisfere ellittiche, ognuna rivestita da un sottilissimo tegumento chiamato "pellicola argentea", mentre più esternamente è avvolto dal "pergamino" (endocarpo) una pellicola di colore giallo dorato.

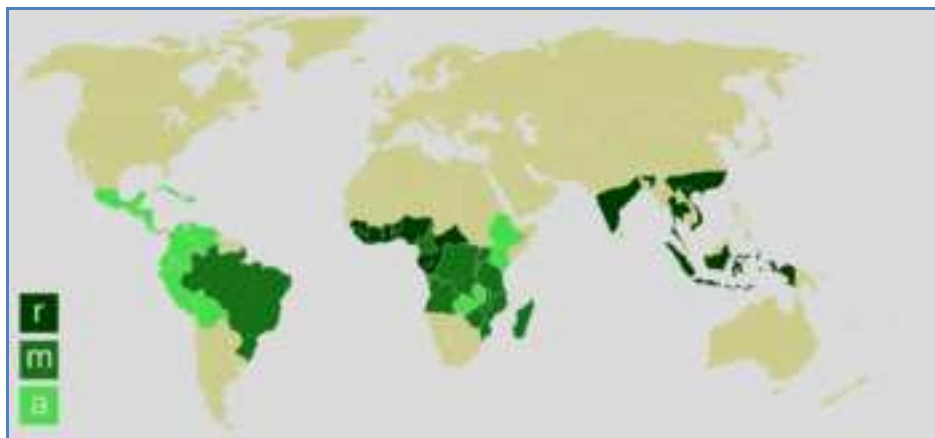
Il genus *Coffea*, a cui appartiene il caffè, comprende fino ad un centinaio di specie, tra le quali sono state riscontrate differenze chimiche anche consistenti [1, 2]; tra queste, la *Coffea arabica* e la *Coffea canephora* (quest'ultima conosciuta anche come Robusta) sono le più considerate a livello commerciale.

La prima, più diffusa (rappresentante circa tre quarti della produzione mondiale) è molto pregiata in quanto fornisce un caffè dall'aroma apprezzato e dal gusto lievemente acidulo, mentre l'altra specie, più resistente alle malattie, fornisce un caffè dal gusto più forte e corposo.

Le differenze in composizione chimica che intercorrono tra i chicchi della specie arabica e quelli della robusta sono sia qualitative che quantitative: la prima ha un maggiore contenuto di lipidi e di altre sostanze come la trigonellina, mentre la robusta contiene più caffeina e acidi clorogenici.

I semi delle due varietà presentano forma e dimensione differenti; infatti se i chicchi della specie arabica hanno una forma ovale e convessa con una spaccatura ad "S" longitudinale, quelli della specie robusta, generalmente di dimensioni minori, sono tondeggianti con una fenditura centrale rettilinea.

L'area geografica in cui vengono coltivate le due specie è una fascia tropicale, sub-tropicale o equatoriale racchiusa tra la latitudine 30° N e 30° S. La robusta viene coltivata principalmente in Africa e nei paesi del Sud-Est Asiatico, mentre l'arabica è coltivata nell'America Centrale e Meridionale (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Aree geografiche di produzione del caffè. (r = robusta; a = arabica; m = misto delle due varietà)

La specie arabica cresce ad altitudini comprese tra i 500 m nelle regioni subtropicali fino a oltre 2500 m vicino l'equatore; predilige un clima temperato con una temperatura compresa tra i 15 e i 24 °C.

La robusta è una specie coltivata in un'altitudine compresa tra il livello del mare fino a 1000 m, tollera temperature più calde e umidità maggiori rispetto a quelle tollerabili dalla specie arabica; entrambe sono danneggiate dalla brina, fenomeno molto comune nel sud del Brasile come all'equatore sopra i 2000 metri.

I chicchi di caffè si ottengono dai frutti con due metodi: il metodo a secco ed il metodo umido.

Nel primo i frutti sono essiccati al sole, i semi vengono quindi liberati dall'involucro, dalla membrana pergamenacea e dalla pellicola argentea, poi sottoposti a pulizia e a cernita. Il secondo metodo invece, prevede varie fasi: pulizia delle bacche, macerazione, spolpatura, fermentazione, lavaggio, essiccazione e sbucciatura. Il caffè che si ottiene in questo modo è detto lavato (*washed coffee*).

Nonostante le specie siano in numero ridotto, le qualità di caffè commerciate sono numerose e si distinguono per forma, grossezza e difetti dei semi. Alcune qualità più comuni sono:

- Moka: a grani piccoli, poco arrotondati, ovali e molto profumati;
- Bourbon: a grani rotondi più grossi del Moka;
- S. Tomè: di colore biancastro o giallognolo;
- Portorico: a grani grossi, ovali e piatti da un lato;
- Haiti: poco omogeneo e con molte impurezze;
- Giamaica: quando è preparato ad umido presenta chicchi uniformi di color azzurro cupo, quando è preparato a secco ha colore grigio-verde;
- Messico: grosso e leggero se di pianura, duro e corneo se di monte;
- Brasile, che è il più commercializzato. Viene classificato come: Rio, Santos e Bahia. Quest'ultimo contiene spesso grani neri e presenta un aroma poco gradevole, il Santos è grigio-scuro e regolare, mentre il Rio possiede l'aroma migliore.

## **1.2. I costituenti chimici del chicco di caffè.**

La composizione chimica del caffè verde dipende dalla varietà, dall'origine, dal tipo di processo di lavorazione e dalle condizioni climatiche della regione in cui viene coltivato (*terroir*).

In particolare, differenze sia qualitative che quantitative esistono in maniera consistente tra la varietà robusta e arabica e naturalmente all'interno delle varietà stesse, e tra il caffè verde e tostato [2,3].

I costituenti più significativi (Tabella 1.1 – Figura 1.5) sono l'acqua, i lipidi, la caffeina, la trigonellina, proteine, amminoacidi, carboidrati, acidi carbossilici, acidi clorogenici e minerali. Per certe

classi di sostanze, come acidi clorogenici, amminoacidi e carboidrati, le trasformazioni che si realizzano durante la tostatura sono significative, mentre per altre classi, ad esempio la caffeina, sono trascurabili.

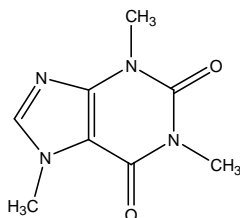
COMPONENTI	ARABICA		ROBUSTA	
	Verde	Tostato	Verde	Tostato
Caffeina	1.2	1.3	2.2	2.4
Trigonellina	1	1	0.7	0.7
Proteine e amminoacidi				
proteine	9.8	7.5	9.5	7.5
amminoacidi	0.5	0	0.8	0
Zuccheri				
saccarosio	8	0	4	0
zuccheri riducenti	0.1	0.3	0.4	0.3
altri zuccheri	1	N.D.	2	N.D.
polisaccaridi	39.8	38	54.4	42
Acidi				
alifatici	1.1	1.6	1.2	1.6
chinico	0.4	0.8	0.4	1
clorogenici	6.5	2.5	10	3.8
Lipidi	16.2	17	10	11
Prodotti di caramellizzazione	-	25.4	-	25.9
Aromi volatili	tracce	0.1	tracce	0.1
Minerali	4.2	4.5	4.4	4.7
Totale	100	100	100	100
Acqua	8.0-12.0	0-5.0	8.0-12.0	0-5.0

**Tabella 1.1.** Composizione media del caffè verde (% su base secca) [3].

### 1.2.1. Caffeina

La caffeina (Figura 1.5) è la molecola più studiata, e la sua attività farmacologica è oggetto di numerose reviews [4].

Il contenuto medio nella arabica è di 1.2 % , e nella robusta 2.2%, con marcate differenze interspecifiche e intra-varietà. È probabile che nei chicchi di caffè verde questa molecola sia presente sotto forma di complesso 1:1 con il clorogenato di potassio [5]; la scarsa solubilità di tale complesso impedisce tuttavia la diffusione della caffeina all'interno dei tessuti vegetali [6].



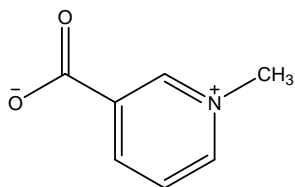
**Figura 1.5:** Struttura della caffeina (1,3,7-trimetilxantina)

La caffeina contribuisce per il 10 ÷ 30% circa al gusto amaro della bevanda di caffè, per cui non sembra avere un effetto diretto sulla qualità sensoriale.

Potrebbe tuttavia diventare un indice indiretto di qualità qualora sia compresa in dettaglio la relazione che lega la sua concentrazione nella pianta e nel chicco con altri costituenti.

È termicamente stabile, e le piccole perdite che si realizzano durante la tostatura sono dovute alla sua sublimazione a temperature superiori ai 179 °C.

### 1.2.2. Trigonellina



**Figura 1.6:** Struttura della trigonellina (acido N-metilnicotinic).

Nonostante differenze sostanziali siano state riscontrate fra i livelli di concentrazione di trigonellina fra l'arabica (0.6-1.3%) e la robusta (0.3-0.9%), non si è trovata ancora alcuna correlazione tra queste differenze e la qualità del caffè. L'unico contributo di questa molecola alle proprietà organolettiche del caffè è dato dal suo sapore pungente, dovuto alla incompleta degradazione durante la tostatura.

Come prodotti di degradazione della trigonellina sono stati identificati molti composti aromatici eterociclici: acido nicotinic, piridina, il metilestere dell'acido nicotinic e numerosi altri composti che contribuiscono all'aroma del caffè tostato.

### 1.2.3. Proteine e amminoacidi

Gli amminoacidi sono presenti nel caffè verde sia liberi (0.5 % del totale) che combinati a formare proteine. Il contenuto di amminoacidi liberi dipende molto dal grado di maturazione del chicco. È stato osservato che la quantità di triptofano, treonina, glicina, tirosina, serina, alanina, lisina e arginina diminuisce col grado di maturazione, ma la relazione tra il loro contenuto e l'aroma del caffè tostato, di cui sono importanti precursori, non è ancora del tutto chiaro.

Per quanto riguarda le proteine, i valori in un chicco di caffè variano dall'8.7 al 12.2% d.b. (*dry basis*, indicato per valutare una percentuale su base secca) a seconda del metodo analitico usato per determinarle e sono rappresentate da una frazione solubile in acqua (albumina) e da una frazione insolubile presente approssimativamente in uguale quantità [3].

La tostatura porta ad una denaturazione delle proteine con successiva degradazione delle stesse. Normalmente si osserva un aumento degli amminoacidi più stabili quali alanina, acido glutammico, glicina, leucina, valina e fenilalanina e una diminuzione di quelli meno stabili come arginina, cistei-

na, serina e treonina, i cui gruppi funzionali sono particolarmente reattivi. Gli amminoacidi liberati sono coinvolti in molte reazioni che producono sostanze volatili responsabili dell'aroma del caffè, tra cui la reazione di Maillard tra amminoacidi con gruppi amminici liberi e zuccheri riducenti, e la degradazione di Strecker tra un amminoacido e un dicarbonile.

Quest'ultima reazione porta alla formazione di un aminochetone che successivamente condensa generando composti eterociclici contenenti azoto.

#### 1.2.4. Carboidrati

Circa il 50% della massa totale secca del chicco verde è costituita da polisaccaridi, più una frazione di arabinosio (40%-50% db), e oligosaccaridi (5-10% db), costituiti principalmente da saccarosio. Nonostante la struttura chimica dei polisaccaridi sia stata oggetto di vari studi [7-9] non risulta ancora completamente chiarita. I polisaccaridi solubili sono generalmente rappresentati da polimeri del mannosio, del galattosio e del glucosio.

Zucchero	Arabica	Robusta
Arabinosio	3.7	4.0
Mannosio	22.0	22.0
Glucosio	7.2	8.2
Galattosio	11.0	13.1
<b>Totale</b>	<b>43.9</b>	<b>47.3</b>

**Tabella 1.2:** Carboidrati nel caffè verde: percentuali di monosaccaridi su base secca [3].

I polisaccaridi insolubili sono particolarmente studiati in quanto, proprio per questa proprietà, sono determinanti per la qualità finale dell'estratto. Le pareti cellulari, insolubili, sono composte da cellulosa ed emicellulosa, principalmente  $\beta$ -1,4 mannani, arabinogalattani [10], questi ultimi in quantità superiore del 3% nella robusta [8, 9], e pectine, le quali possono fungere da deposito energetico.

Il processo di tostatura produce una degradazione dei polisaccaridi in frammenti di minor dimensione, aumentando la loro solubilità in acqua [10]. Tali frammenti possono reagire con gruppi amminici delle proteine nella reazione di Maillard, formando materiali polimerici ad alto peso molecolare noti come melanoidine, responsabili dell'imbrunimento del caffè tostato.

Il saccarosio, essendo termicamente labile, inizia a decomporsi a temperature di 130 °C, riducendosi dal 7% nel verde al 2-3% nel torrefatto, contribuendo all'aroma e alla formazione di sostanze po-

limeriche. La sua decomposizione inizia con il rilascio per idrolisi dei suoi componenti, glucosio e fruttosio, aumentando così la quantità di zuccheri disponibili per la reazione di Maillard con gruppi amminici.

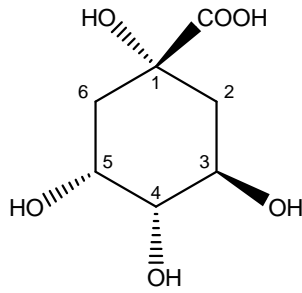
### **1.2.5. Acidi carbossilici**

L'acidità della bevanda di caffè è un importante attributo sensoriale e dipende non solo dal pH, ma anche dai singoli acidi presenti, ognuno dei quali apporta un caratteristico sapore. Dei 34 acidi identificati nel caffè verde, di cui 15 volatili, quelli presenti in maggior concentrazione sono l'acido citrico, malico e chinico [11]. L'acido chinico (Figura 1.8) è normalmente presente nei chicchi di caffè verde sotto forma di acido clorogenico (estere dell'acido chinico e caffeico), ma si trova anche libero ed è presente in quantità maggiore nella varietà arabica. Il suo contenuto aumenta con il grado di tostatura dal momento che si forma per degradazione dei suoi precursori [11]. Per quanto riguarda il chicco tostato, i principali responsabili del gusto sono: l'acido citrico, acetico, formico, chinico, malico, acidi carbossilici ad alto peso molecolare e clorogenici.

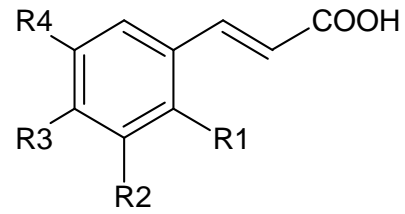
### **1.2.6. Acidi clorogenici**

Gli acidi clorogenici (CGA), il cui interesse è cresciuto notevolmente negli ultimi anni per la scoperta della forte attività antiossidante, antivirale e ipoglicemica che esercitano, sono i più abbondanti composti fenolici presenti nel caffè verde. In esso sono presenti in quantità abbastanza elevata, principalmente sotto forma di sali potassici, probabilmente come complesso 1:1 con la caffeina. Il loro contenuto varia dal 6% nei chicchi della varietà arabica, al 10% nei chicchi della varietà robusta. Questi composti fenolici sono responsabili dell'incurimento ossidativo dei chicchi durante lo stoccaggio, mentre la loro mancanza è correlata alla loro "luminosità" [3].

Sebbene con il termine acido clorogenico la IUPAC si riferisca esclusivamente all'acido 5-caffeoilchinico, il più importante in natura e nel caffè, la comunità scientifica considera acidi clorogenici tutta la famiglia di esteri formati da uno o più acidi aromatici con un acido alcolico. In particolare si prendono in considerazione gli esteri dei derivati dell'acido trans-cinnamico come l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido p-idrossicinnamico, con l'acido chinico (Figure 1.7 e 1.8).



**Figura 1.7:** Acido chinico.



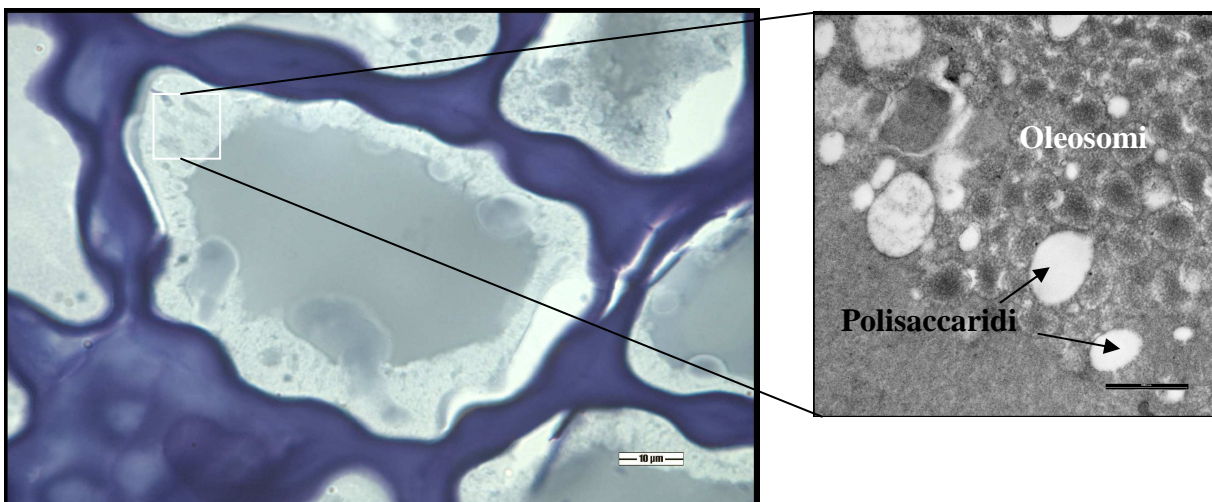
**Figura 1.8:** Acido trans cinnamico (R=H)

La famiglia degli acidi clorogenici comprende sia acidi monoclorogenici che diclorogenici a seconda che la reazione di esterificazione del gruppo carbossilico avvenga su uno o due gruppi ossidrilici nelle posizioni 3, 4, e 5 dell'acido chinico, preferenzialmente in posizione 5.

### 1.2.7. Fase lipidica.

Nel chicco verde i lipidi esistono sia allo stato liquido (*coffee oil*), sia allo stato solido sotto forma di cere (*coffee wax*).

I primi, che costituiscono il cosiddetto olio di caffè, sono presenti all'interno dell'endosperma [11] sotto forma di corpi globulari (oleosomi) dalla forma spesso approssimativamente sferica, dal diametro medio fino a  $\cong 1 \mu\text{m}$  [13-15]. Tali corpi oleosi (lipidosomi) risultano compartimentati da una membrana fosfolipidica e possono fungere da deposito energetico. Nella figura sotto riportata è mostrata un'immagine TEM di una cellula (a sinistra), mentre nell'immagine di destra è mostrato un ingrandimento in cui è possibile distinguere la formazione dei lipidosomi [16].



**Fig 1.9.** Immagine al microscopio a trasmissione elettronica (TEM) di cellula (a sinistra) e relativo ingrandimento (a destra) della porzione in cui sono localizzati gli oleosomi (ammassi globulari scuri) in un chicco di caffè verde. Le aree bianche rappresentano formazioni polisaccaridiche [16].

La percentuale di olio estratto varia significativamente in funzione della varietà del chicco. Nell'arabica i lipidi rappresentano circa il 15% della massa totale del chicco, anche se sono stati trovati in qualche caso valori fino al 17%. Per la varietà robusta la media è, in accordo con diversi autori, del 10-11.5%, ma si possono riscontrare valori inferiori al 7% [20,21].

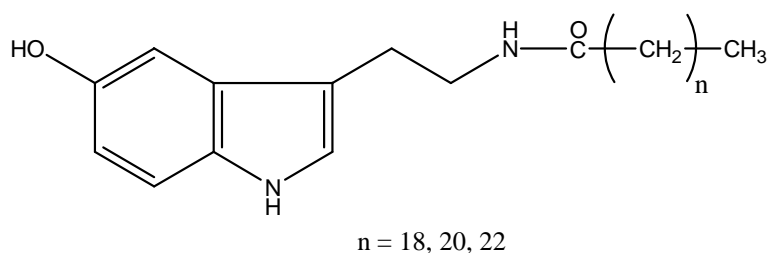
Il *coffee wax* rappresenta invece lo 0.2 ÷ 0.3% della fase lipidica totale, e si trova localizzato sulla superficie esterna del chicco, di cui costituisce lo strato protettivo [18].

I lipidi nell'olio di caffè verde sono formati per il 75% da trigliceridi e da un'alta percentuale, rispetto agli altri oli vegetali, di frazione "insaponificabile", costituita principalmente da diterpeni liberi ed esterificati (19%), steroli liberi ed esterificati (5%) e una minore quantità di tocoferoli [19, 20] (Tabella 1.3).

COSTITUENTI	LIPIDI (%)
Trigliceridi	70-80
Acidi grassi liberi	0.5-2.7
Esteri diterpenici	15-18.5
Diterpeni liberi	0.1-1.2
Steroli ed ester sterolici	1.4-3.2
5-idrossitriptammide	0.3-1.0
Tocoferoli	0.3-0.7
Fosfatidi	0.3

**Tabella 1.3:** Lipidi presenti nel caffè verde [3].

Il *coffee wax* è costituito per il 63% da sostanze insolubili in etere di petrolio, come composti fenolici ed in particolare tre ammidi derivate dalla 5-idrossitriptammide dagli acidi arachidico (C<sub>20</sub>), behenico (C<sub>22</sub>) e lignocerico (C<sub>24</sub>) (Figura 1.10).



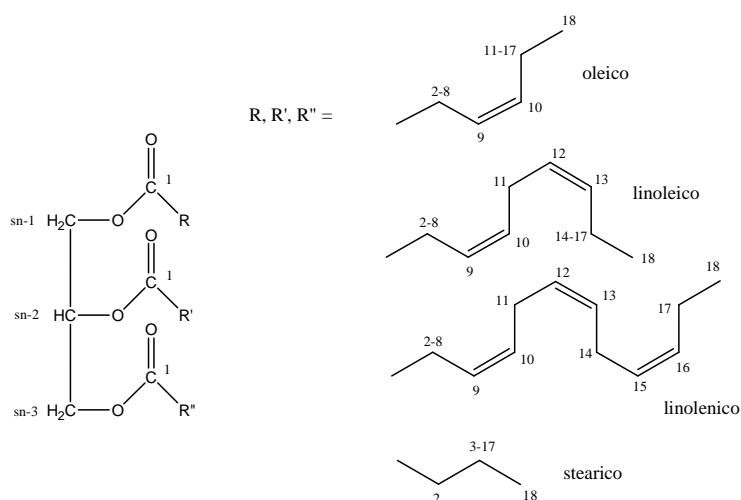
**Figura 1.10:** Formula di struttura generale della 5-idrossitriptammide C-5-HT [12].

Il restante 37% è costituito invece da composti solubili in etere di petrolio, la cui composizione è identica a quella dell'olio di caffè eccetto che per la distribuzione degli acidi grassi (Tabella 1.3). Infatti, mentre l'olio di caffè contiene principalmente acido palmitico (30-35%), stearico, oleico e linoleico (40-45%), nel *coffee wax* sono presenti trigliceridi contenenti maggiormente acidi grassi saturi (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>) come l'acido arachidico (C<sub>20</sub>), behenico (C<sub>22</sub>) e lignocerico (C<sub>24</sub>).

ACIDO GRASSO		Coffee oil	Coffee wax
Miristico	C14:0	Tracce	1.5
Palmitico	C16:0	31.1	24.9
Stearico	C18:0	9.6	6.5
Oleico	C18:1	9.6	4.8
Linoleico	C18:2	43.1	23.8
Linolenico	C18:3	1.8	Tracce
Arachidico	C20:0	4.1	14.1
Behenico	C22:0	0.9	21
Lignocerico	C24:0	Tracce	3.7
Saturi	C18:0 ÷ C24:0	14.6	45.3

**Tabella 1.4:** Composizione (%) degli acidi grassi nell'olio di caffè e della frazione solubile in etere di petrolio della cera [2].

La maggior parte degli acidi grassi presenti sono esterificati con glicerolo e formano gli acilgliceroli; il 20% è esterificato con diterpeni, una piccola quantità con steroli, mentre una frazione piccolissima si trova sotto forma di acidi grassi liberi. I gliceridi o acilgliceroli sono esteri del glicerolo con acidi grassi, ovvero acidi carbossilici a catena lunga, generalmente lineare, saturi ed insaturi, a numero pari di atomi di carbonio, anche se non sono infrequenti acidi a numero dispari di atomi di carbonio ramificati nella forma iso oppure con costituenti diversi nella catena idrocarburica. La maggior parte degli acidi grassi presenti nel chicco di caffè è sotto forma di trigliceridi (TAG), prodotti dall'esterificazione delle tre funzioni alcoliche della glicerina con tre acidi grassi liberi (Figura 1.11), anche se non mancano i monogliceridi (MAG) e i digliceridi (DAG). Quando i gruppi acilici sono tutti uguali il trigliceride è detto semplice, in caso contrario è detto misto.



**Figura 1.11:** Rappresentazione di un trigliceride con esempi di alcuni acidi grassi fra i più comuni.

La biosintesi dei trigliceridi comporta che alcuni acidi occupino posizioni preferenziali sulla catena del glicerolo negli oli vegetali, tra cui quello di caffè, presentando così una chiara regiospecificità:

- gli acidi saturi palmitico e stearico si trovano esclusivamente in posizione 1 e 3;
- gli acidi oleico e linoleico occupano prevalentemente la posizione 2, mentre l'acido linolenico presenta una distribuzione variabile.

La distribuzione e la quantità degli acidi grassi non subiscono sensibili variazioni durante la tostatura: gli acidi grassi insaturi sembrano essere soggetti a reazioni innescate dalla temperatura con la formazione di isomeri trans, soprattutto dell'acido linoleico.

La composizione di acidi grassi liberi consente di differenziare le due varietà robusta e arabica (Tabella 1.4); nei chicchi di robusta la percentuale di acido stearico è inferiore a quella dell'acido oleico, mentre nella varietà arabica i due acidi grassi sono in percentuale pressoché uguale. Il rapporto acido stearico/oleico può quindi dare una prima indicazione della quantità di specie robusta nelle miscele [12].

ACIDO GRASSO		ROBUSTA	ARABICA
<b>Miristico</b>	C14:0	Tracce	<b>Tracce</b>
<b>Palmitico</b>	C16:0	31	<b>34.5</b>
<b>Stearico</b>	C18:0	5.8 – 7.2	<b>5.6 – 6.3</b>
<b>Oleico</b>	C18:1	12.3	<b>8.4</b>
<b>Linoleico</b>	C18:2	41	<b>44</b>
<b>Linolenico</b>	C18:3	0.9	<b>1.5</b>
<b>Arachidico</b>	C20:0	2.7 – 4.3	<b>2.6 – 2.8</b>

<b>Behenico</b>	C22:0	0.3 – 0.8	<b>0.5 – 0.6</b>
<b>Lignocericico</b>	C24:0	0.3 – 0.4	<b>0.2 – 0.4</b>

**Tabella 1.5:** Composizione in acidi grassi nell'arabica e nella robusta.

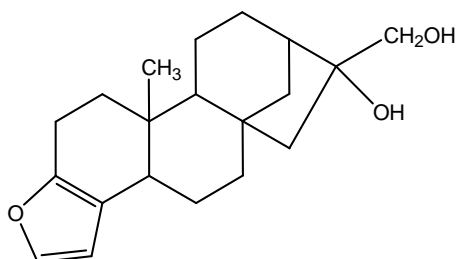
Il contenuto di acidi grassi liberi è in generale stretta relazione con l'età del caffè [17], dal momento che col passare del tempo gli acidi grassi sono soggetti oltre che a reazioni di autossidazione anche all'azione di enzimi lipolitici.

### 1.2.8. Componenti minoritarie.

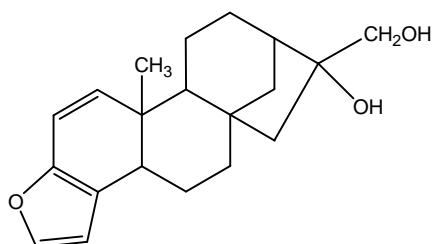
Sono presenti in quantità molto variabile, normalmente attorno al 10% del grasso totale, e vengono distinte in due frazioni: saponificabile e insaponificabile. La prima comprende le cere (esteri degli acidi grassi a lunga catena con alcoli superiori), i fosfolipidi, i derivati dell'acido glicerofosforico, gli sfingolipidi e gli acidi fosfatidici. La seconda, invece, comprende quelle sostanze che dopo la saponificazione del grasso possono essere facilmente estratte con appropriati solventi organici. Nell'olio di caffè l'insaponificabile è costituito principalmente da:

#### Diterpeni

Sono i componenti principali della frazione insaponificabile dell'olio di caffè e il loro contenuto in peso varia dall'1.3% all'1.9% nella varietà arabica e dallo 0.2% all'1.5% nella varietà robusta. Essi sono alcoli diterpenici con struttura simile al kaurene [19] denominati cafestolo e kahweolo (Figure 1.12 e 1.13).



**Figura 1.12:** Cafestolo.

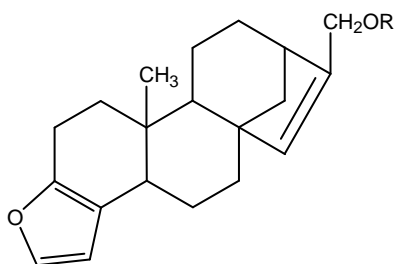


**Figura 1.13:** Kahweolo.

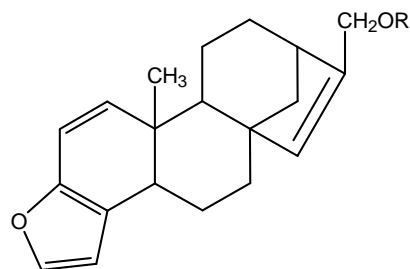
I due diterpeni sono presenti nella forma libera solo per il 2-6%, mentre la maggioranza di essi è presente come monoesteri degli acidi grassi, esterificati sull'ossidrile terziario con acido palmitico, linoleico, oleico, stearico, arachidico e behenico [20].

Gli esteriferi diterpenici risultano essere molto sensibili al calore; il contenuto di cafestolo e kahweolo diminuisce con l'aumento della temperatura a seguito della formazione di prodotti secondari. Due di

questi composti sono stati identificati e sono il deidrocafestolo e deidrokahweolo (Figura 1.14 e 1.15), le cui quantità aumentano in relazione alla temperatura raggiunta.

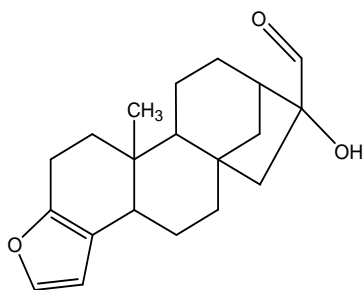


**Figura 1.14:** Deidrocafestolo.

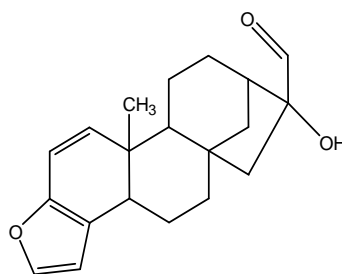


**Figura 1.15:** Deidrokahweolo.

Anche le aldeidi cafestale e kahweale sono due prodotti di degradazione del cafestolo e kahweolo (Figure 1.16 e 1.17).



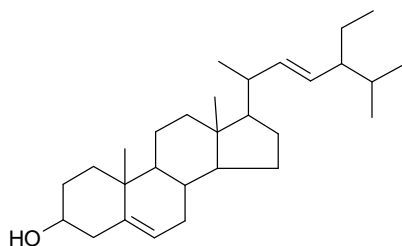
**Figura 1.16:** Cafestale.



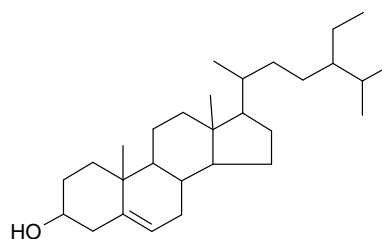
**Figura 1.17:** Kahweale.

## Steroli

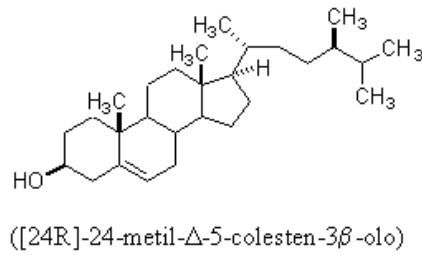
Una categoria di componenti minoritari molto importante è quella degli steroli, sostanze alicicliche, non sature, con un gruppo alcolico secondario. Nell'olio di caffè sono presenti molteplici tipi di steroli, differenti per la struttura delle catene laterali. Essi possono essere sia nella forma libera (circa il 40%) che nella forma esterificata (60%) [19], con una distribuzione diversa tra la specie arabica e robusta. Tra i liberi, i principali sono: stigmaterolo,  $\beta$ -sitosterolo e campesterolo mentre tra quelli esterificati è presente in maggior quantità il  $\beta$ -sitosterolo, quindi il campesterolo e infine lo stigmaterolo [22] (Figure 1.18 e 1.19).



**Figura 1.18:** Stigmaterolo.



**Figura 1.19:**  $\beta$ -sitosterolo.

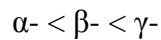


**Figura 1.20:** campesterolo.

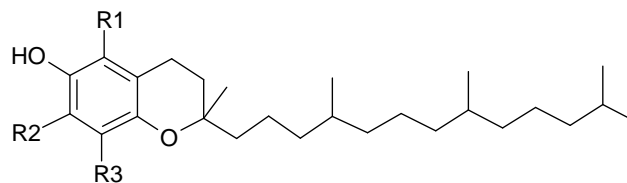
La tostatura influisce poco sulla quantità e sulla distribuzione degli steroli.

### Tocoferoli

La presenza dei tocoferoli  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - nell'olio di caffè è stata dimostrata da Folstar nel 1997 (Figura 1.20). Normalmente sono contenuti nell'olio di caffè in rapporto 2:4:0.1 e il contenuto totale è di circa 5.5-6.9 mg/100 g. I tocoferoli hanno un duplice interesse poiché possiedono attività vitaminica e sono anche gli antiossidanti naturali più conosciuti. L'attività antiossidante varia in questo modo:



mentre l'attività vitaminica è esercitata quasi solo dall' $\alpha$ -tocoferolo (90% del totale) con il quale viene identificata la vitamina E.

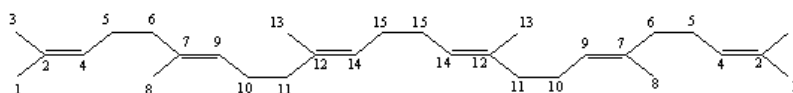


$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{CH}_3$	$R_3 = \text{CH}_3$	$\alpha$ -tocoferolo
$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{CH}_3$	$R_3 = \text{H}$	$\beta$ -tocoferolo
$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \text{CH}_3$	$R_3 = \text{CH}_3$	$\gamma$ -tocoferolo

**Figura 1.21:** Formule di struttura dei tocoferoli

### Altri composti

Tutti gli oli vegetali contengono piccole quantità di idrocarburi paraffinici tra cui il predominante è il n-nonacosano ( $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$ ). Tra gli idrocarburi olefinici, invece, il più significativo è lo squalene ( $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ ), un idrocarburo instaurato costituito da sei unità isopreniche (Figura 1.21).



**Figura 1.22:** Struttura dello squalene.

Non mancano poi alcoli alifatici superiori, aldeidi, chetoni, composti fenolici e vitamine liposolubili.

### 1.2.9. Il processo della torrefazione.

Il caffè utilizzato per produrre la nota bevanda viene ottenuto per torrefazione dei semi della pianta ed è con questo processo che acquista le sue caratteristiche proprietà organolettiche e il suo aroma. In questa operazione i chicchi assumono un colore che va dal bruno carico al bruno nerastro, aumentano di volume (50-80%), cambiano la loro struttura e subiscono una perdita in peso del 13-20%. Inoltre gli zuccheri caramellizzano, il contenuto di umidità diminuisce, una piccola quantità di caffeina viene persa per decomposizione e si produce un olio bruno che conferisce aroma e sapore al chicco.

La torrefazione può richiedere all'incirca 10-20 minuti o meno, a seconda del meccanismo di trasferimento di calore adottato e del livello di torrefazione desiderato.

Segue il trasferimento dei chicchi su setacci freddi, in modo da evitare un'eccessiva torrefazione o una bruciatura. I cambiamenti iniziali avvengono a temperature sopra i 50 °C, alle quali le proteine denaturano e l'acqua evapora. L'incurimento, che si realizza sopra i 100 °C, è dovuto alla pirolisi dei composti organici con sviluppo di melanoidine, probabilmente a seguito della reazione di Maillard, ed è accompagnato dal rigonfiamento dei chicchi.

- A 150 °C comincia la perdita di sostanze organiche sotto forma di acqua, CO<sub>2</sub>, CO e la formazione di centinaia di sostanze volatili che conferiscono al caffè il suo caratteristico aroma. In questa fase il processo è esotermico e le reazioni di pirolisi raggiungono il massimo tra i 190 e i 210 °C, dopodiché il processo diventa endotermico, ritornando ad essere esotermico nello stadio finale.
- Sopra i 240 °C il chicco inizia a bruciare con la formazione di fuliggine. Al momento del cambiamento tra il processo endotermico ed esotermico è possibile sentire il primo scoppio dei chicchi (popping). Il secondo "popping", dovuto all'esplosione delle cellule per l'aumento della pressione interna, indica la fine della tostatura. Il caffè disponibile in commercio è in realtà una

miscela di 4-8 varietà con differenti caratteristiche organolettiche, che vengono tostate separatamente.

### **1.3. Ricerche sulla qualità del caffè verde: lo stato dell'arte.**

#### **1.3.1. Il concetto di qualità del caffè.**

La qualità è definita dall'Organizzazione Internazionale per le Standardizzazioni (ISO) come "l'abilità di un insieme di caratteristiche (che si possono chiamare attributi) inerenti a un prodotto o a un processo di soddisfare le richieste del consumatore o di altre parti interessate" (ISO 2000).

Per il caffè oggi la definizione di qualità può assumere definizioni diverse lungo la catena che collega il produttore al consumatore.

A livello di industria la qualità del caffè è infatti espressa come combinazione del livello di produzione, prezzo e facilità di coltura; a livello di importatore/esportatore la qualità è invece connessa con la dimensione dei chicchi, l'assenza di difetti, la disponibilità di prodotto e il prezzo; a livello di tostatura la qualità dipende dal contenuto di umidità, stabilità delle caratteristiche, origine, prezzo e composizione chimica.

Infine, gli aspetti ritenuti maggiormente importanti nelle aspettative del consumatore riguardo la qualità del caffè comprendono: le proprietà organolettiche (corpo, acidità, aroma, fragranza), assenza di odori sgradevoli (off-flavours), sicurezza per la salute, intesa come assenza di contaminanti (micotossine e presenza residua di pesticidi), garanzia dell'autenticità del prodotto e, infine, la presenza e la quantità dei valori nutrizionali contenuti nella bevanda.

È utile sottolineare infine che il concetto di qualità risulta altamente dipendente da alcune fonti di variazione genetiche (quali ad es. i processi di raccolta e di lavorazione, fattori pedoclimatici e fisiologici).

Da quanto detto risulta che il tentativo di dare una definizione univoca di qualità del caffè rimane un compito quanto mai complesso ed è destinato per tal motivo a rimanere opportunamente circoscritto [23].

La prima condizione nella realizzazione di un caffè apprezzato è garantire la qualità della materia prima; da ciò deriva l'esigenza del controllo di qualità sul chicco verde.

A questo proposito, in relazione alle particolari esigenze di mercato, è stato elaborato dalla ISO un elenco di informazioni sulle caratteristiche del caffè verde (ISO 9116) il cui accertamento è ritenuto condizione necessaria ai fini della commercializzazione dello stesso. Tra queste figurano l'origine geografica e botanica, l'anno di raccolta, il contenuto di umidità, i difetti totali del chicco, la proporzione di chicchi danneggiati dagli insetti, e le dimensioni dei chicchi stessi.

I molteplici temi affrontati dall'attuale produzione scientifica si occupano in parte di questi requisiti. Alcuni dei lavori compiuti sul caffè verde sono già stati accennati nell'ambito della descrizione dei costituenti chimici del caffè. Accanto ai numerosi studi di base per la conoscenza della composizione del chicco e dei suoi costituenti – la quale, come è già stato detto, è ancora su alcune tematiche limitata (ad esempio per ciò che riguarda i polisaccaridi) – i problemi maggiormente affrontati possono essere così riassunti: la ricerca di parametri di qualità organolettici; lo sviluppo di metodologie e la ricerca di descrittori chimici per la garanzia dell'autenticità; la quantificazione e lo studio delle interazioni fra l'acqua e la matrice solida; lo studio e l'ottimizzazione dei parametri e dei fenomeni coinvolti nel processo della tostatura e, infine, studi biologici sul controllo dei geni nella produzione di varietà nuove che incontrino le esigenze del mercato.

Verranno di seguito presi in considerazione in dettaglio alcuni dei filoni principali della ricerca scientifica applicata al caffè verde che, per la particolare contiguità tematica, maggiormente si prestano ad un inquadramento della ricerca svolta nel presente lavoro di tesi.

### **1.3.1.1. Studi sull'acqua nel caffè verde.**

Il contenuto di umidità nel chicco verde è considerato il parametro maggiormente critico nel determinare la qualità finale a livello di bevanda. È noto infatti che un contenuto di umidità nel verde superiore a 14% è responsabile dello sviluppo di fermentazioni e della crescita di muffe durante lo stoccaggio e il trasporto, le quali possono condurre alla formazione di micotossine o di odori indesiderati a livello del prodotto finale; al contrario, un basso contenuto di umidità è responsabile della perdita del flavour. L'intervallo di contenuto di umidità raccomandato dalla International Coffee Organization (ICO) per evitare i problemi menzionati, e quindi consentire la commercializzazione del caffè, è stato pertanto stabilito fra 8 e 12.5% [24].

Inoltre, il grado di idratazione del chicco incide anche sul modo e la velocità di tostatura: infatti un chicco con un basso contenuto d'acqua vien torrefatto più rapidamente. Infine, l'importanza del controllo del contenuto d'acqua è legata anche a ragioni economiche, dal momento che il costo del caffè verde è riferito al peso.

Le metodiche ufficiali codificate dalla ISO per la quantificazione del contenuto di umidità nel caffè verde attualmente in uso sono basate sul principio del calo peso. Una parte considerevole di pubblicazioni concentrano l'attenzione sull'analisi e il confronto fra queste metodiche, sulla possibilità di adottare nuove tecniche e, infine, sulla fabbricazione di nuove strumentazioni di misura alternative per il contenuto d'acqua. I risultati di tali studi indicano la metodica ISO 6673 come la più adatta a fini di analisi routinarie del contenuto d'acqua nel caffè verde [25, 26].

Connessa con la problematica del contenuto di acqua è la ricerca delle condizioni ottimali per il processo della tostatura, che costituisce un altro importante campo verso cui si sviluppano gli studi scientifici applicati al caffè. Questa tematica trova un'importante rappresentazione in letteratura in alcune pubblicazioni di Pittia e collaboratori, in una delle quali vengono indagate le modificazioni a carico delle proprietà meccaniche (*texture*) del chicco di caffè in funzione del grado di tostatura e dell'attività dell'acqua. Tali indagini hanno indicato nella perdita di acqua e diminuzione della densità i principali fattori che concorrono nell'infragilimento del chicco durante la tostatura [27, 28] inoltre, un successivo studio ha portato all'interessante osservazione che il contenuto di acqua esercita di per se stesso un'influenza determinante nel modificare le proprietà meccaniche, sia a livello di chicco verde che di tostato. In particolare, a basse percentuali di idratazione l'acqua manifesta un comportamento antiplasticizzante, aumentando la durezza e la fragilità del chicco. Come dichiarato dagli stessi autori in una review riguardante tale fenomeno, il miglioramento della conoscenza di tale fenomeno, osservato con misure meccaniche, richiederebbe un'approfondimento sulla distribuzione dell'acqua a livello microscopico all'interno del chicco [29].

Un tentativo importante di descrivere i meccanismi dell'interazione dell'acqua con la matrice solida nel caffè tostato e macinato è stato realizzato con lo studio condotto da Mateus et al. con l'aiuto dell'NMR nel dominio dei tempi [30].

Fatta eccezione per alcuni interessanti esempi di studio di questo problema [31-33], la questione della distribuzione dell'acqua nel verde tuttavia risulta sostanzialmente scarsamente esplorata nel panorama della letteratura sul caffè. Allo stato attuale pertanto l'insieme delle conoscenze al riguardo risulta ancora limitato.

### **1.3.1.2. Studi sull'origine geografica/botanica del caffè verde.**

L'importanza della conoscenza dell'origine botanica e geografica del caffè è stata imposta da ragioni di tracciabilità nell'ambito del commercio internazionale [25]. Data infatti l'ampia estensione del mercato e del conseguente elevato valore economico che ha assunto negli ultimi anni il caffè, la garanzia dell'autenticità di questo prodotto è diventata un'esigenza molto sentita in risposta alla sem-

pre più frequente pratica dell'adulterazione lungo la sua filiera di produzione. In particolare, la deliberata od accidentale adulterazione del caffè è stata riscontrata sia a livello dell'origine botanica, sia a livello di provenienza geografica.

Delle due varietà del genus *Coffea* più diffuse e maggiormente coltivate, l'arabica e la robusta, alla prima è stato attribuito il valore commerciale più alto, in ragione delle caratteristiche organolettiche in genere più apprezzate dal consumatore. Vi sono inoltre aree geografiche di coltivazione (*terroirs*) nelle quali le particolari condizioni pedoclimatiche (tra le quali l'altitudine e il tasso di precipitazione annuo), insieme con i processi di lavorazione attuati, forniscono qualità di caffè ritenute maggiormente pregiate a livello internazionale. In particolare è ormai riconosciuto ad esempio che la qualità arabica prodotta nell'America centrale è considerata superiore alla stessa varietà proveniente dal Brasile, dove il caffè verde viene raccolto e lavorato in condizioni differenti (*hand-picking*) [34-36]. Per la commercializzazione dei caffè originari di tali aree geografiche, ritenute commercialmente prestigiose e quindi a maggiore rischio di adulterazione, è stata pertanto prevista l'etichettatura.

La crescita negli ultimi anni della domanda di metodiche indirizzate a garantire l'autenticità del prodotto è spiegabile coi motivi citati. Non esistono a tal proposito metodiche ufficiali, pertanto la distinzione del caffè verde in base all'origine botanica e geografica sono oggetto della ricerca scientifica da circa una decina di anni. Il problema che risulta maggiormente trattato nei lavori presenti in letteratura è senz'altro la discriminazione delle varietà arabica e robusta del caffè verde. A tal proposito le metodologie sviluppate per questo problema sono caratterizzate dal tratto comune della ricerca di possibili markers della varietà botanica con l'impiego sia di tecniche cromatografiche (LC, HPLC, GC), sia in alcuni casi spettroscopiche (spettroscopia infrarossa NIR e Raman).

I descrittori chimici per discriminare le varietà botaniche contemplati in questi lavori comprendono la classe degli acidi clorogenici (CGA) e fenolici, i fenoli totali, i metalli e altri elementi (N, P, B), zuccheri, amminoacidi e loro enantiomeri, acidi grassi, steroli, tocoferoli e trigliceridi [38-42].

In alcuni casi sono state inoltre utilizzate combinazioni di markers appartenenti a classi chimiche diverse, come nel caso del lavoro di Ky et al., in cui è stato valutato il potere discriminante della combinazione di trigonellina caffeina e acidi clorogenici [43]. In particolare risulta che i composti contenuti nella frazione lipidica sono in grado di discriminare efficacemente le varietà arabica dalla robusta.

Sulla problematica dell'origine geografica si contano tuttavia un minor numero di lavori. Tra questi uno dei più importanti è quello realizzato da Bertrand et al. mediante l'uso di tecniche cromatografiche accoppiate con metodi analisi statistica multivariata, secondo cui la classe degli acidi cloroge-

nici in combinazione con gli acidi grassi permettono un'adeguata discriminazione delle aree geografiche del caffè, mentre gli acidi grassi considerati singolarmente come markers consentono contemporaneamente la separazione della varietà e dell'area geografica per la specie arabica [38, 44].

Metodi cromatografici accoppiati con tecniche chemiometriche sono stati inoltre impiegati anche nel lavoro di Salces et al., in cui è stato trovato che una discriminazione del caffè verde (sia di specie arabica che robusta) in base all'origine geografica può essere realizzata utilizzando come markers il contenuto di fenoli e metilxantina [45].

In questo particolare ambito va menzionato l'impiego promettente della metabolomica accoppiata con tecniche chemiometriche, in alternativa all'utilizzo di singoli o gruppi limitati di markers [46].

Dal complesso dei lavori appena menzionati per la determinazione dell'origine geografica del caffè non sembra tuttavia emergere un parere univoco su quali siano i markers più efficaci, la scelta dei quali appare piuttosto dipendente dalla particolare tecnica utilizzata; il numero non ampio di campioni analizzati, infine, rende le conclusioni raggiunte ancora non completamente esenti da margini di ambiguità sui risultati.

Infine, dai lavori menzionati emerge sicuramente il ruolo importante giocato dai singoli costituenti della fase lipidica nel determinare l'origine geografica, ma ancora rimangono pareri discordanti sulla dipendenza del contenuto totale di lipidi dalle condizioni microclimatiche, in particolare dall'altitudine [44]. Potrebbe essere quindi interessante approfondire la dipendenza della percentuale lipidica totale nel chicco dall'area geografica di provenienza del caffè verde.

#### **1.4. Impiego dell'NMR nella scienza e tecnologia degli alimenti.**

Nel campo della chimica degli alimenti negli ultimi decenni si è registrato un sempre più frequente ricorso alla Risonanza Magnetica Nucleare sia a livello di ricerca, sia di controllo di qualità a livello industriale. A ciò hanno contribuito da un lato la sempre maggiore richiesta di tecniche il più possibile rapide e non invasive per la conoscenza e il controllo della qualità dei prodotti alimentari, dall'altro il contemporaneo abbassamento dei costi e l'aumento della facilità di utilizzo delle strumentazioni NMR in commercio.

Il grande vantaggio dell'utilizzo dell'NMR su matrici complesse e altamente eterogenee quali quelle alimentari risiede in generale nel fatto che il comportamento di un singolo nucleo (H, C, P ) è sensibile ai diversi ambienti chimici presenti all'interno del materiale stesso in un'unica misurazione.

In letteratura sono documentati numerosi esempi di applicazione dell'NMR su matrici alimentari quali carne, pesce, prodotti caseari, succhi di frutta, vino, birra, e molte altre.

Oggi giorno esistono diverse tecniche fondate sul comune principio della risonanza magnetica nucleare in grado di dare informazioni di diverso genere sugli alimenti: l'NMR nel dominio dei tempi, l'NMR ad alta risoluzione, il MRI (Magnetic Resonance Imaging), lo SNIF.

#### 1.4.1 NMR nel dominio dei tempi.

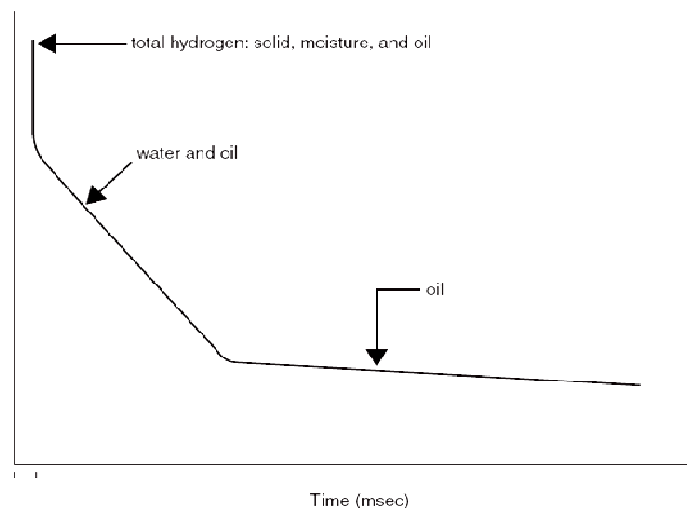
Il nome NMR nel dominio dei tempi deriva dal fatto che, non essendo applicata la trasformata di Fourier, le informazioni sul sistema oggetto di studio vengono di conseguenza ricavate direttamente dal segnale strumentale, rappresentato dall'evoluzione temporale del rilassamento della magnetizzazione del nucleo in esame (solitamente il protone) nel tornare all'equilibrio a seguito di un'eccitazione a radiofrequenza di breve durata.

Sul piano della tecnologia gli spettrometri nel dominio dei tempi sono concepiti come strumenti da banco e ospitano magneti permanenti di intensità di circa 0.4 T (20 MHz per il protone).

In generale il segnale di rilassamento della magnetizzazione trasversale  $M_{xy}$  (prodotta da un impulso di  $90^\circ$ ) è rappresentato da un decadimento esponenziale (*Free Induction Decay*, FID), governato da una costante di tempo caratteristica ( $T_2$ ).

I protoni in stati chimici o fisici differenti (ad es. in fasi come l'acqua e l'olio) possono essere caratterizzati in genere da diverse velocità di rilassamento, ossia valori diversi di  $T_2$ . Pertanto, la forma risultante del segnale NMR prodotto da un sistema multifasico risulta data dalla sovrapposizione di tutte le fasi protoniche a diverso  $T_2$  che sono presenti nel sistema.

Nella figura 1.23 (sotto) è mostrato il segnale prodotto da un generico sistema multifasico:



**Fig.1.23:** schema del FID di un sistema multifasico. Le diverse velocità di rilassamento sono esagerate per chiarezza.

La più semplice sequenza di impulsi utilizzata per generare il segnale strumentale nel dominio dei tempi prevede l'immediata acquisizione del segnale NMR a seguito di un unico impulso a  $90^\circ$ .

Nella sequenza *spin-echo* invece, l'impulso a  $90^\circ$  è seguito, dopo un opportuno tempo  $\tau$ , da un secondo impulso che deflette la magnetizzazione di  $180^\circ$ .

Una descrizione più dettagliata dei principi teorici e delle sequenze è riportata nel capitolo ().

In generale l'analisi del segnale strumentale nel dominio dei tempi permette di ottenere informazioni sul numero delle diverse fasi protoniche, sulla quantità relativa dei protoni in esse contenuti, e sulle relative costanti caratteristiche (e  $T_2$ ) che governano il rilassamento. La quantificazione delle varie fasi protoniche presenti nel campione è possibile in genere qualora le velocità di rilassamento siano sufficientemente distanziate nella scala dei tempi.

Una serie di metodiche sfruttano questo principio per la determinazione del contenuto ad esempio di umidità e/o di olio, o del rapporto solido/liquido nelle matrici alimentari.

Tali metodiche (trattate nel paragrafo successivo), in cui vengono impiegate semplici sequenze di impulsi come il FID e la *spin-echo*, costituiscono la classe delle cosiddette applicazioni dell'NMR nel dominio dei tempi per il controllo della qualità nel campo industriale (Control Quality/ Control Assurance Time Domain NMR: QC/QA TD NMR).

Un modo diverso di ricavare informazioni dal segnale nel dominio dei tempi consiste infine nell'analisi delle costanti di rilassamento ( $T_1$  e  $T_2$ ), il cui studio richiede tuttavia l'uso di sequenze più complesse (ad esempio la CPMG per la misura del  $T_2$ , e l'*Inversion Recovery* per quella del  $T_1$ , che verranno descritte più avanti), e la successiva elaborazione della curva sperimentale con appositi programmi di fitting per ricavare le distribuzioni dei tempi di rilassamento. I metodi basati su questo approccio non trovano ancora un impiego industriale, ma sono diffusi tuttavia a livello scientifico.

#### **1.4.1.1. Applicazioni QC/QA dell'NMR nel dominio dei tempi.**

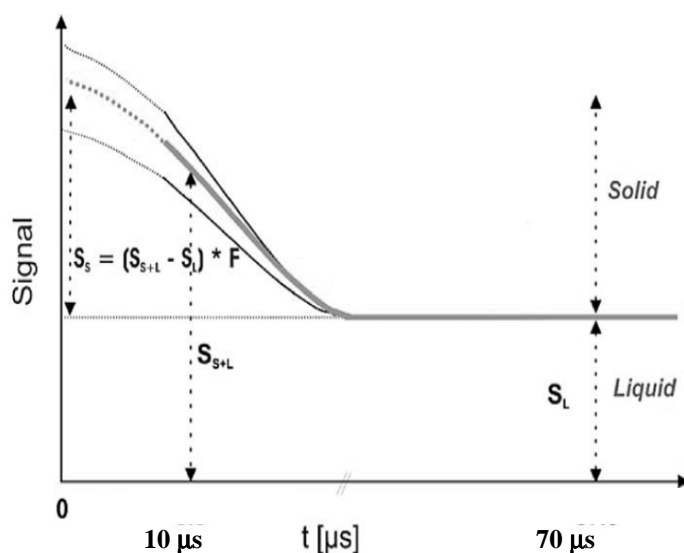
L'avvento della risonanza Magnetica Nucleare nel dominio dei tempi per il controllo della qualità risale agli anni '70, grazie alla cooperazione fra Unilever Research (The Netherlands) e Bruker Physik AG, in risposta all'esigenza di sviluppare tecnologie e metodi più economici rispetto a quelle utilizzati nell'NMR ad alta risoluzione e, al contempo, adatti per scopi di analisi routinarie in

campo industriale. Allo stato attuale si arrivano a contare più di venti applicazioni QC/QA specifiche per il solo campo alimentare [47].

In base alla diversa tipologia di informazioni ricercate, e alla particolare modalità con cui vengono eseguite, le applicazioni QC dell’NMR nel dominio dei tempi possono essere classificate in “assolute” (in cui il segnale viene normalizzato per il peso del campione), e “relative” (*ratio-type*), in cui invece la pesata del campione non è richiesta.

Una delle applicazioni industriali più note dell’NMR nel dominio dei tempi è rappresentata dalla determinazione del contenuto di solido (*Solid Fat Content, SFC*) nei grassi alimentari, che rappresenta attualmente una metodica ufficiale [49-54]. Il principio di funzionamento della misura dell’SFC risiede nel fatto che la fase solida e quella liquida dell’olio possono essere correttamente quantificate in quanto la magnetizzazione trasversale della fase solida decade molto più rapidamente di quella liquida (il  $T_2$  dei protoni del grasso “solidi” infatti è di pochi  $\mu s$ , mentre in fase liquida è dell’ordine delle centinaia di ms).

La determinazione può essere ottenuta seguendo due diversi metodi (diretto e indiretto); secondo il metodo diretto la misura, di tipo relativo, è basata pertanto sul campionamento del FID rispettivamente a 10  $\mu s$ , dove si considera il segnale proporzionale al contenuto totale di protoni ( $S_{S+L}$ ), e a 70  $\mu s$ , dove invece il segnale è dovuto al contenuto protonico della sola fase liquida ( $S_L$ ). Uno schema del segnale in una misura di SFC è mostrato nella figura 1.24 (sotto).



**Figura.1.24** Schema del segnale FID nella misura SFC (adattato da [53])

In base a questa misura il valore di SFC (ad una data temperatura) è allora ricavato come:

$$\% \text{ SFC (T)} = \frac{(S_{S+L} - S_L) * F}{S_L + (S_{S+L} - S_L) * F} * 100 = \frac{S_S * F}{S_L + S_S * F} * 100 \quad (\text{eq. 1.1})$$

dove  $F$  è un opportuno fattore di correzione che tiene conto dell'errore nel campionamento del segnale a 10  $\mu\text{s}$  dovuto al tempo morto del ricevitore.

La determinazione del rapporto solido/liquido è stata sfruttata anche per misurare l'umidità negli alimenti ricchi di amido (farina, semola, farina di granturco, di riso, orzo, fecola di patate, ecc.) da Brosio et al.[48]. In questo tipo di matrici, a causa della pendenza del segnale del liquido ( $\text{H}_2\text{O}$ ), la misura di valore di  $S_L$  è stato realizzato tramite l'introduzione di un ulteriore coefficiente di estrapolazione.

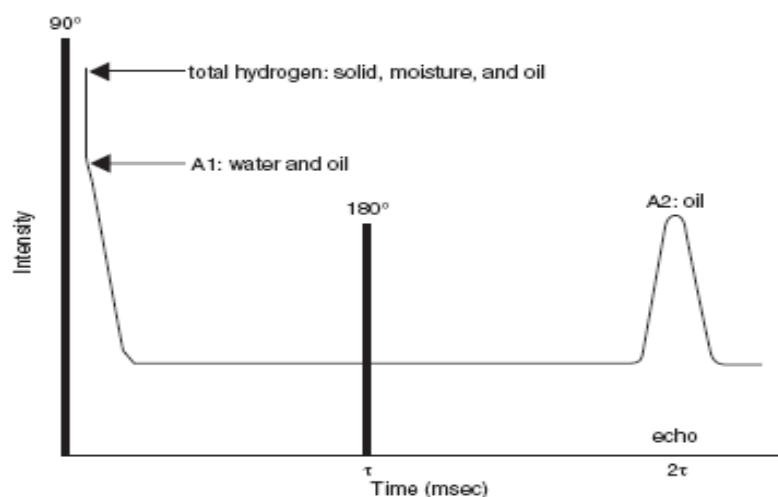
I metodi assoluti vengono impiegati per la quantificazione diretta dell'umidità e/o dell'olio in diverse matrici alimentari. A tale scopo possono essere in genere utilizzate la stessa sequenza FID, oppure la sequenza spin-echo, a seconda della tipologia e del numero di fasi protoniche di cui interessa la quantificazione. Misure assolute con il FID sono state utilizzate, ad esempio, nella quantificazione delle farine campionando il segnale a 100  $\mu\text{s}$ , tempo in corrispondenza del quale la magnetizzazione trasversale del solido è già decaduta e non interferisce nella determinazione [48].

Uno dei campi industriali di maggior impiego delle applicazioni QC è rappresentato infine dall'analisi dei semi vegetali. In letteratura si possono trovare diverse proposte di metodi NMR per la determinazione ad esempio del contenuto lipidico in queste matrici [55-59].

Da questi lavori emerge che, in generale, il campionamento del segnale FID a 70  $\mu\text{s}$  permette una corretta quantificazione della percentuale di olio anche in presenza di basso contenuto di umidità (inferiore a 15%); in presenza di tenori di umidità maggiori il problema può essere superato essiccando i chicchi. Tuttavia, l'accuratezza di questo metodo può diventare inferiore in presenza di campi magnetici disomogenei per la dipendenza significativa dell'ampiezza del segnale dalla posizione angolare dei chicchi nel tubo. È stato quindi proposto recentemente da Tiwari e Gambhir l'utilizzo della sequenza spin-echo per la determinazione dell'olio nei semi senza la necessità della pesata e dell'essiccamento [61,62]. Inoltre, utilizzando la stessa sequenza è possibile ottenere contemporaneamente, oltre alla quantificazione dell'olio, una misura indiretta dell'acqua. La determinazione simultanea dell'acqua e dell'olio nei semi vegetali mediante la sequenza spin-echo è riconosciuta attualmente come metodica ufficiale [63]. Lo schema del metodo è illustrato in figura 1.25 (sotto).

Il funzionamento della misura è basato sul fatto che a bassi contenuti di umidità (15%) in matrici come i semi il  $T_2$  dell'acqua è inferiore a quello dell'olio di due ordini di grandezza. Dopo il primo impulso di  $90^\circ$  la magnetizzazione dei protoni sia delle componenti solide (rappresentate da carboidrati e proteine) che liquide (acqua e olio) decadono per effetto della disomogeneità del campo dopo il primo impulso; l'impulso a  $180^\circ$  rifocalizza la sola componente lipidica, il cui segnale di echo ricompare dopo un tempo  $2\tau$  a 7 ms.

La misura prevede il campionamento del segnale a  $50 \mu\text{s}$  (A1 nella figura 1.25), in cui l'intensità è proporzionale al contenuto protonico totale della fase liquida (acqua e olio); a 7 ms (A2) è dovuto ai protoni della sola fase lipidica, completamente rifocalizzata dall'impulso a  $180^\circ$ . Di conseguenza la percentuale di acqua viene ricavata per differenza di queste due intensità.



**Figura 1.25:** Schema del segnale prodotto dalla sequenza spin-echo (adattato da [64])

La sequenza *spin-echo* è stata utilizzata anche per ottenere la quantificazione separata di acqua e olio nelle drupe di oliva [65].

Con opportune variazioni dei tempi di campionamento la sequenza spin-echo trova poi applicazione anche nella determinazione del contenuto di umidità nello zucchero: in questo particolare caso l'intensità del segnale dopo l'impulso a  $180^\circ$  viene misurata a  $200 \mu\text{s}$  [66].

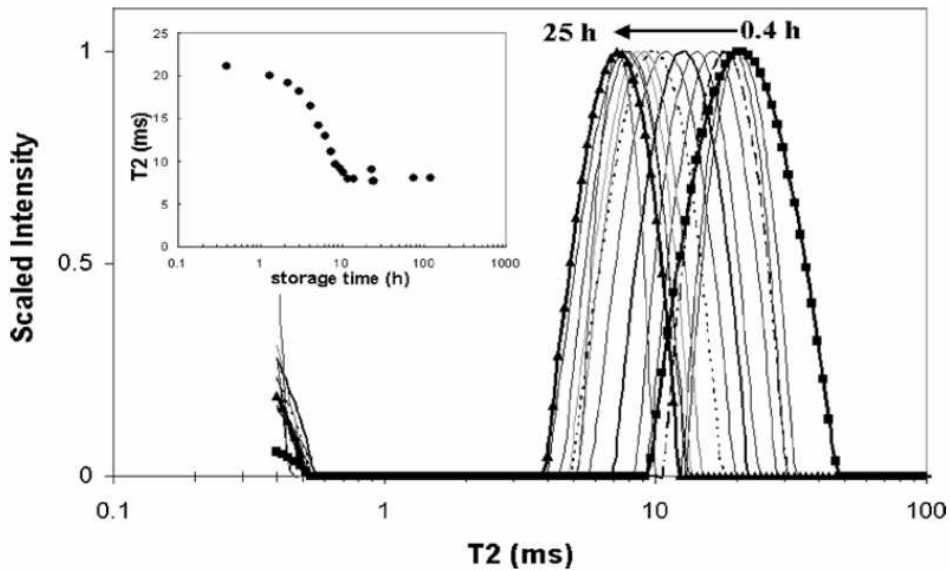
#### 1.4.1.2. Analisi del rilassamento NMR.

Come è già stato detto, in questo caso viene analizzata la distribuzione dei tempi di rilassamento, ottenuta attraverso il fitting dell'intera curva sperimentale. Le costanti di rilassamento  $T_1$  e  $T_2$  della parte liquida possono essere rispettivamente ricavate con l'utilizzo di sequenze come la CPMG e l'inversion recovery. La forma della curva di rilassamento prodotta dalla CPMG viene descritta da

un'equazione generale di tipo multi esponenziale, il fitting della quale fornisce una distribuzione di  $T_2$ , associabili alle diverse componenti protoniche presenti nella fase liquida. Se da un lato i tempi di misura, generalmente più lunghi rispetto alle metodiche QC/QA, rendono meno adatto questo approccio per scopi di analisi routinarie di tipo industriale, tuttavia lo studio della curva di rilassamento presenta il fondamentale vantaggio che l'informazione sul sistema si avvale di tutti i punti di cui è composta la curva sperimentale. Ciò permette ad esempio di superare eventuali difficoltà delle applicazioni QC, rappresentate ad esempio dal fatto che i  $T_2$  di acqua e olio in alcuni matrici alimentari (come nel caso ad esempio del marzapane) sono difficilmente separabili [66]. La quantificazione delle diverse fasi protoniche in questi casi può essere realizzata attraverso l'assegnazione e deconvoluzione delle componenti di rilassamento coinvolte e la valutazione dei rapporti delle aree relative. L'utilizzo della CPMG ha permesso ad esempio la determinazione di acqua e olio nei cibi fritti [67].

Tuttavia, la diffusione dello studio dei tempi di rilassamento NMR, a cui ha contribuito in gran parte lo sviluppo dei metodi basati sulla trasformata di Laplace, trova soprattutto un'ulteriore ampia giustificazione nell'osservazione che le costanti di rilassamento dei diversi protoni presenti nella matrice analizzata dipendono dalla diversa mobilità delle molecole considerate. È pertanto ormai consolidato nel campo della scienza degli alimenti l'utilizzo dei tempi di rilassamento NMR come probes per il monitoraggio di determinate proprietà fisiche considerate rilevanti per la qualità sia dei prodotti che dei processi di lavorazione, o delle trasformazioni chimiche a carico delle matrici alimentari, al pari di altre osservabili quali la densità, il punto di fusione, etc.

Particolare attenzione a questo proposito ha ricevuto lo studio del rilassamento dell'acqua [68]. In particolare il  $T_2$ , essendo una misura della mobilità protonica, è stato correlato ai diversi stati di legame dell'acqua e al tipo di interazione fra questa e la matrice. La mobilità protonica dell'acqua è stata ad esempio efficacemente impiegata negli alimenti a base di amido come probe della dinamica nel processo di idratazione [70, 84, 85].



**Figura 1. 26:** effetto della retrogradazione dell'amilopectina nello spettro di rilassamento dell'acqua (adattato da[69]); nell'inserito è mostrata la dipendenza del  $T_2$  dal tempo di stoccaggio.

per quantificare l'acqua legata, e per monitorare il processo di retrogradazione [69]. L'analisi del  $T_2$  è stata inoltre impiegata per valutare la disponibilità dell'acqua e l'effetto della temperatura durante il processo di cottura nella carne [71, 72].

Alcuni studi condotti su tessuti vegetali e su modelli artificiali di matrici complesse hanno dimostrato inoltre che l'analisi della mobilità protonica dell'acqua permette di trarre considerazioni su come questa è distribuita all'interno delle matrici cellulari e, al contempo, di risalire alla struttura microscopica della matrice stessa [73-77,82,83]. In particolare, il comportamento multiesponenziale della curva di rilassamento dell'acqua nelle matrici biologiche è riferibile ad una situazione di diversa compartimentazione in condizioni di scambio diffusivo lento o assente tra le pareti cellulari [76]. Pertanto l'analisi della distribuzione dei tempi di rilassamento dell'acqua è stata utilizzata per monitorare la struttura subcellulare di molti alimenti in funzione di particolari condizioni. L'analisi delle  $T_2$  dell'acqua ha portato all'assegnazione ad esempio di tre differenti popolazioni protoniche nel tessuto parenchimale della mela, attribuite ad acqua nel vacuolo, nel citoplasma e nelle pareti cellulari [78].

Nella mozzarella di Bufala, tre componenti di rilassamento trasversale sono state assegnate rispettivamente ad acqua del siero, ad acqua intrappolata all'interno del network del gel di caseina e ad acqua della zona di "giunzione" con la fase lipidica. Il valore di  $T_2$  della componente associata al siero è stato inoltre analizzato in funzione del tempo di stoccaggio come indice di invecchiamento della mozzarella [79].

L'aumento del valore di  $T_2$  delle popolazioni protoniche associate all'acqua nei vacuoli e nel citoplasma è stato spiegato con la progressiva riduzione dell'amido in funzione del grado di maturazione nella banana [80].

Recentemente, l'utilità della rilassometria NMR nel dominio dei tempi è stata ulteriormente consolidata dall'avvento delle tecniche bidimensionali, grazie allo sviluppo di algoritmi per il calcolo rapido della doppia trasformata di Laplace [81].

Con questa tecnica è possibile acquisire informazioni ancora più dettagliate sulle popolazioni protoniche in matrici con un elevato grado di complessità grazie alla mappatura multidimensionale dei tempi di rilassamento e dei coefficienti di diffusione, riducendo in tal modo notevolmente l'ambiguità nell'assegnazione delle componenti.

L'estrema efficacia di questa metodologia è stata dimostrata in alcuni lavori sul controllo della qualità della frutta, in cui il fingerprint dei parametri di rilassamento ha permesso di caratterizzare in maniera efficace ad esempio il fenomeno della farinosità nelle mele e dell'imbrunimento interno nelle pere e, inoltre, dei cambiamenti strutturali nell'uovo a seguito del processo di cottura [86 - 88].

#### **1.4.2. NMR ad alta risoluzione**

La potenzialità della risonanza magnetica nucleare ad alta risoluzione nell'identificazione di composti a basso peso molecolare in sistemi altamente complessi è cresciuta negli ultimi 15 anni con lo sviluppo da un lato della tecnologia dei cryoprobes e di strumenti che lavorano a frequenze fino a 900 MHz, e dall'altro delle tecniche multidimensionali e di diffusione.

I vantaggi della non invasività, comuni a tutte le tecniche NMR, e la capacità di fornire informazioni su un ampio numero di metaboliti in un unico esperimento hanno reso l'NMR ad alta risoluzione una tecnica particolarmente indicata per l'analisi degli alimenti [89].

Recentemente, la facile reperibilità di standard interni ha permesso recentemente la progressiva diffusione dell'applicazione quantitativa dell'NMR ad alta risoluzione (qNMR [<http://tigger.uic.edu/~gfp/qnmr/>]), basata sul principio che la risonanza integrata di un analita è proporzionale alla sua concentrazione molare.

Un esempio di protocollo è stato messo a punto per la determinazione dell'istamina nel formaggio [90].

Accoppiata con metodi di statistica multivariata (PCA, PLS), l'NMR ad alta risoluzione ha trovato vasto impiego principalmente nello sviluppo di tecniche analitiche innovative per la classificazione

e l'autenticazione di cibi e bevande di interesse commerciale quali i succhi di frutta [91-95] il the verde [96, 97], i vini [101-104] e le uve [98].

Una parte consistente dei metodi proposti è infine rivolta alla caratterizzazione della provenienza geografica e alla salvaguardia del marchio di origine degli oli d'oliva [99, 100, 105, 106]. Il principio comune dei metodi sviluppati per l'autenticazione consiste nell'acquisizione e successiva integrazione dei profili metabolici di ciascun campione analizzato; gli integrali delle diverse risonanze vengono quindi utilizzati come variabili nell'analisi multivariata per ottenere la discriminazione dei campioni.

## **1.5. Scopo della ricerca**

La ricerca svolta in questo Dottorato si colloca nell'ambito di un progetto, finanziato dalla Fondazione Cariparo, finalizzato al trasferimento tecnologico della tecnica NMR nella risoluzione di problematiche connesse con il controllo di qualità sulle matrici alimentari.

La motivazione della presente ricerca è stata fornita in particolare dall'esigenza di sviluppare metodi basati sull'NMR per l'individuazione di possibili markers per la discriminazione delle diverse qualità del caffè verde su base geografica.

Come è già stato osservato nella parte introduttiva di questa tesi, la produzione scientifica in tale ambito risulta infatti attualmente ancora esigua e soffre inoltre di alcune limitazioni, quali ad esempio il numero ristretto di campioni analizzati e in alcuni casi il carattere distruttivo e dispendioso in termini di tempo delle tecniche utilizzate.

Di qui la necessità di realizzare un metodo tramite l'utilizzo dell'NMR per la determinazione dell'origine geografica nel caffè verde che possa essere applicato su un numero di campioni significativamente elevato. Ci siamo inoltre prefissati l'obiettivo di esplorare la potenzialità di alcuni possibili markers, tra cui principalmente il contenuto percentuale di acqua e olio nei chicchi di caffè verde. In questo caso è stata necessaria la messa a punto di un metodo basato sull'NMR nel dominio dei tempi per la determinazione simultanea di questi parametri. Le fasi operative che hanno contraddistinto la realizzazione e l'applicazione di tale metodo vengono descritte nel paragrafo 3.

Un ulteriore target di questo lavoro è rappresentato inoltre dallo studio della distribuzione dell'acqua e dei lipidi nel chicco verde mediante l'analisi dei tempi di rilassamenti NMR. La motivazione per questo particolare studio è stata dettata da un lato dalla necessità di stabilire i parametri ottimali nella sequenza spin echo utilizzata nel metodo appena descritto; dall'altra la volontà di contribuire alla comprensione della distribuzione e che risulta essere ancora una problematica aperta.

Un metodo alternativo ideato per la determinazione dell'origine geografica è stato infine realizzato mediante l'utilizzo dell'NMR in alta risoluzione accoppiato con l'analisi statistica multivariata (descritto nel paragrafo 3.)



## Capitolo 2. Materiali e metodi.

### 2.1. Metodologie sperimentali.

#### 2.1.1 Principi teorici dell’NMR.

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica spettroscopica che si basa sull’assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche nella regione delle radiofrequenze (4-800 MHz) da parte di un campione immerso in un intenso campo magnetico. Ogni nucleo possiede un numero quantico di spin  $I$  che in base alla natura del nucleo può essere intero, semintero o nullo (Tabella).

NUMERO DI PROTONI	NUMERO DI NEUTRONI	I
pari	pari	nullo
dispari	dispari	intero
pari	dispari	semintero
dispari	pari	semintero

**Tabella 2.1:** valori assunti dal numero quantico di spin  $I$ .

Solo i nuclei aventi  $I$  non nullo risultano NMR attivi, in quanto possiedono un momento magnetico nucleare  $\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{P}$  non nullo, dove gamma ( $\gamma$ ) è il rapporto giromagnetico del nucleo in esame e  $\vec{P}$  il momento angolare, di componenti quantizzate di modulo:

$$|\vec{P}| = [I(I+1)]^{1/2} \hbar \quad \text{con} \quad \hbar = \frac{h}{2\pi} \quad (\text{eq. 2.1})$$

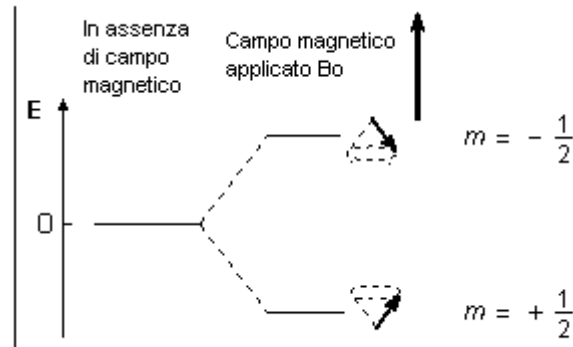
La componente del momento angolare lungo l’asse  $z$  (convenzionalmente assunto come asse di riferimento) vale:  $P_z = m_i \cdot \hbar$ , con  $m_i$  numero quantico magnetico che assume i valori  $-I, -I+1, \dots, +I-1, +I$ . Sono quindi possibili  $2I+1$  stati di spin energeticamente degeneri che differiscono solo per il valore di  $m_i$ . Per il protone, che è il nucleo esaminato in questo lavoro,  $I = 1/2$  per cui sono possibili due stati di spin degeneri:  $\alpha$  ( $m_i = +1/2$ ) e  $\beta$  ( $m_i = -1/2$ ).

Per questi il modulo del momento magnetico nucleare lungo l’asse  $z$  è:

$$\mu_z = P_z \cdot \gamma = m_i \cdot \hbar \cdot \gamma = \pm \frac{1}{2} \gamma \cdot \hbar \quad (\text{eq. 2.2})$$

La degenerazione tra i due stati di spin viene rimossa quando i nuclei sono sottoposti all’azione di un campo magnetico statico  $\mathbf{B}_0$ , cioè in seguito ad un’interazione dei singoli momenti magnetici  $\mu_i$

con il campo. I nuclei infatti si orientano, a seconda del loro stato quantico, in una delle due possibili direzioni rispetto al campo esterno (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Orientazioni possibili del momento angolare sotto l'azione di  $B_0$ .

L'energia di un nucleo nei due stati di spin permessi è data da:

$$E = -\mu_z \cdot B_0 = -\gamma m_i \hbar B_0 \quad (\text{eq. 2.3})$$

Lo stato  $\alpha$  si trova a minore energia, descrivendo una situazione in cui lo spin nucleare è parallelo al campo  $B_0$ ; lo stato  $\beta$  si trova a più alta energia con uno spin antiparallelo al campo. La differenza di energia tra i due stati è proporzionale all'intensità del campo secondo la relazione:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \gamma \frac{\hbar}{2\pi} B_0 \quad (\text{eq. 2.4})$$

Questa è l'energia necessaria per passare da uno stato di spin all'altro (condizione di risonanza), passaggio che avviene per irradiazione con una radiazione elettromagnetica di frequenza appropriata.

Per promuovere una transizione tra i due stati di spin è quindi necessaria una radiazione di frequenza:  $\nu_0 = (\gamma/2\pi)B_0$ , e solo quando la frequenza della radiazione  $\nu_0$  eguaglia la frequenza di Larmor, ovvero la frequenza di precessione dei nuclei  $\nu_L$ , si raggiunge la condizione di risonanza:

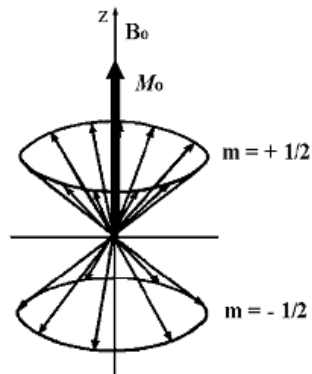
$$\nu_L = \nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (\text{eq. 2.5})$$

In condizioni di equilibrio lo stato  $\alpha$  è termodinamicamente favorito e più popolato rispetto allo stato  $\beta$ . La differenza di popolazione tra i due stati di spin è data dalla funzione di distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{KT}\right) = \exp\left(-\frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi KT}\right) \cong 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi KT} \quad (\text{eq. 2.6})$$

dove  $N_\beta$  è il numero di spin a maggior energia,  $N_\alpha$  il numero di spin a minor energia,  $K$  è la costante di Boltzmann (pari a  $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ),  $T$  indica la temperatura assoluta e  $\Delta E$  è la differenza di energia tra i due stati.

Quando i nuclei di un campione sono sottoposti al campo magnetico  $\mathbf{B}_0$  si instaura una situazione di equilibrio nella quale l'eccesso di nuclei nello stato a minore energia, allineati nella direzione del campo magnetico statico, produce un vettore macroscopico detto magnetizzazione netta  $\mathbf{M}$  (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Rappresentazione della magnetizzazione macroscopica.

Tale vettore deriva dalla somma dei momenti magnetici nucleari  $\mu_i$  dei nuclei presenti nel campione e possiede un'unica componente  $\mathbf{M}_z$  orientata lungo l'asse del campo magnetico. Le sue componenti  $\mathbf{M}_x$  ed  $\mathbf{M}_y$  sono nulle dal momento che le componenti dei singoli  $\mu_i$  sono presenti statisticamente con ugual probabilità sul piano  $xy$  (random phase).

L'applicazione di un impulso a radiofrequenza, tale che la sua componente magnetica  $\mathbf{B}_1$  sia ortogonale a  $\mathbf{B}_0$ , causa una deflessione del vettore magnetizzazione  $\mathbf{M}$  di un angolo proporzionale alla durata dell'impulso:

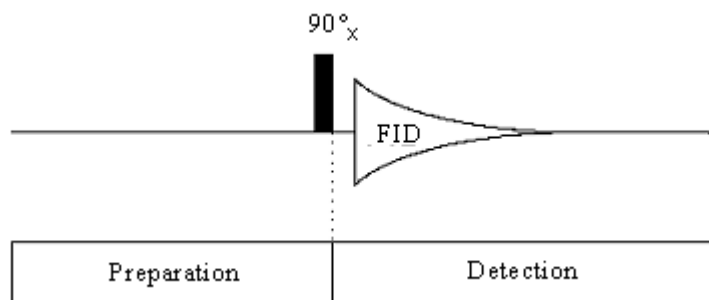
$$\theta = \gamma B_1 \tau_p \quad (\text{eq. 2.7})$$

In questo modo si genera una componente trasversale  $\mathbf{M}_{xy}$  che, una volta rimosso  $\mathbf{B}_1$ , inizia a precessare attorno all'asse  $z$  alla frequenza di Larmor propria di ogni nucleo, generando un voltaggio detto FID (*Free Induction Decay*), ovvero un segnale sinusoidale che decade esponenzialmente nel tempo a causa dei processi di rilassamento che tendono a ripristinare le condizioni di equilibrio. La frequenza di risonanza di ciascun protone è largamente influenzata dal suo intorno chimico; ogni nucleo risente di un campo leggermente diverso da quello applicato come conseguenza dei campi magnetici locali generati dagli elettroni che circondano il nucleo.

Il *chemical shift* ( $\delta$ , espresso in ppm) che misura questo effetto, noto come effetto di schermo, è lo spostamento della frequenza di risonanza di ciascun nucleo rispetto ad un riferimento:

$$\delta = \frac{\nu_o - \nu_{rif}}{\nu_{rif}} 10^6 \quad (\text{eq. 2.8})$$

La Figura 2.3 (sotto) riporta un tipico esperimento NMR monodimensionale:



**Figura 2.3:** schema di un esperimento NMR monodimensionale.

Il periodo di preparazione consente al sistema di raggiungere l'equilibrio termico, un impulso a  $90^\circ$  flette la magnetizzazione  $\mathbf{M}$  sul piano  $xy$ , dove viene registrato il FID. Questo segnale nel dominio del tempo viene trasformato in un segnale nel dominio delle frequenze mediante trasformata di Fourier.

### 2.1.1.1 Meccanismi di rilassamento.

Quando un impulso a radiofrequenza investe un campione immerso in un campo magnetico statico, perturba l'equilibrio tra le popolazioni dei suoi stati di spin. Spento l'impulso il sistema tende a ritornare alle condizioni iniziali attraverso due fenomeni paralleli: *rilassamento longitudinale* e *rilassamento trasversale* [107, 108].

#### Rilassamento longitudinale

L'impulso radiofrequenza sposta il vettore magnetizzazione netta dall'asse  $z$  al piano  $xy$ . Il ritorno della magnetizzazione lungo l'asse  $z$  è detto rilassamento longitudinale o spin-reticolo;  $\mathbf{M}_z$  torna al valore iniziale  $\mathbf{M}_0$  con un processo del primo ordine caratterizzato da una velocità dipendente da  $T_1$  secondo la seguente equazione differenziale:

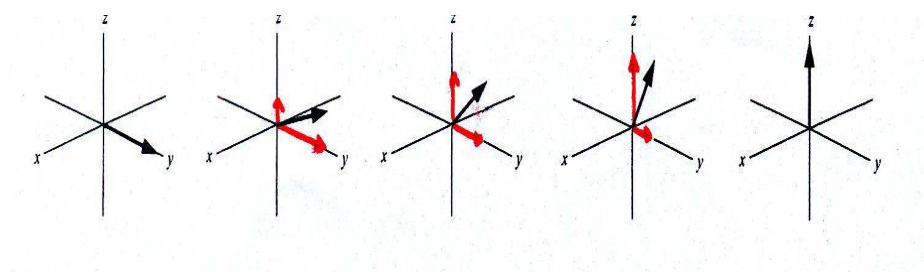
$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (\text{eq. 2.9 e 2.10})$$

dove  $T_1$  è detto tempo di rilassamento longitudinale (Figura 2.4).

I nuclei che assorbono radiazioni in un esperimento NMR fanno parte di quell'insieme più esteso di atomi che costituisce il campione e che è chiamato reticolo, indipendentemente dal fatto che il campione sia un solido, un liquido o un gas. In questi due ultimi stati in particolare, i vari nuclei che compongono il reticolo hanno continui movimenti vibrazionali e rotazionali, che producono un campo magnetico complesso attorno a ciascun nucleo. Il campo dell'intero reticolo magnetico ha pertanto un numero elevatissimo di componenti magnetiche, e almeno una di esse sarà in fase e avrà la stessa frequenza di precessione del nucleo magnetico indagato. Queste componenti dovute ai moti vibrazionali e rotazionali interagiscono con il nucleo, che passa così dallo stato di spin con energia superiore a quello con energia più bassa; l'energia liberata va poi semplicemente ad aumentare l'ampiezza delle vibrazioni e rotazioni termiche e questo comporta un aumento minimo della temperatura del campione [107].

Il tempo di rilassamento  $T_1$  è una misura della vita media del nucleo nello stato di energia più alta e quantifica l'efficacia del rilassamento spin-reticolo: un piccolo valore di  $T_1$  indica un processo di rilassamento efficace e veloce.

Oltre a dipendere dal rapporto giromagnetico del nucleo assorbente, il valore del tempo di rilassamento longitudinale è strettamente legato alla mobilità del reticolo, infatti nei solidi cristallini e nei liquidi viscosi, dove la mobilità è piccola,  $T_1$  è elevato. Con l'aumentare della mobilità aumentano le vibrazioni e le rotazioni e di conseguenza si osserva che  $T_1$  diminuisce.



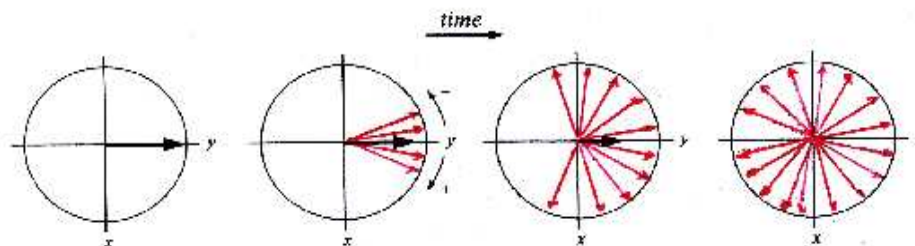
**Figura 2.4:** Rilassamento longitudinale.

### Rilassamento trasversale

Il rilassamento trasversale o spin-spin deriva dall'interazione tra nuclei vicini che hanno velocità di precessione identiche ma stati quantici magnetici diversi. Questo tipo di interazione porta ad uno scambio di stato quantico tra i due nuclei, cioè il nucleo nello stato di spin a più bassa energia viene eccitato mentre il nucleo eccitato rilassa allo stato di energia inferiore. In questo modo l'energia totale del sistema di spin non cambia mentre la vita media di un particolare nucleo eccitato viene abbreviata [107].

È proprio a causa di tali interazioni che il moto di precessione è per alcuni di essi più veloce della frequenza di Larmor, mentre per gli altri è più lento. Il risultato è che gli spin cominciano ad aprirsi a ventaglio nel piano xy e questo porta ad una diminuzione fino a zero della componente  $M_{xy}$  della magnetizzazione, con una velocità dipendente dalla costante di tempo  $T_2$ , secondo la relazione:

$$M_{xy} \propto e^{-t/T_2}$$



**Figura 2.5:** Rilassamento trasversale.

Poichè non c'è più alcuna componente magnetica residua nel piano xy quando il rilassamento è completo lungo l'asse z, questo comporta che  $T_2 \leq T_1$ .

In realtà è necessario considerare un tempo di rilassamento effettivo  $T_2^*$  che tiene conto di tutti quei fattori che contribuiscono alla perdita del segnale trasversale:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2(\Delta B_0)}} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2} \quad (\text{eq. 2.11})$$

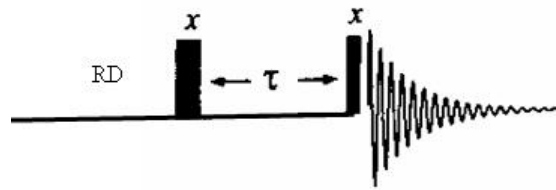
dove il primo termine si riferisce al contributo genuino al processo di rilassamento mentre  $T_{2(\Delta B_0)}$  riguarda la disomogeneità del campo magnetico  $B_0$  nel campione, ed è un'imperfezione strumentale che provoca una variazione del campo magnetico effettivo agente sui nuclei. Questo termine risulta essere preponderante nei liquidi.

### 2.1.1.2. Sequenze NMR per le misure dei tempi di rilassamento.

#### Misure di $T_1$

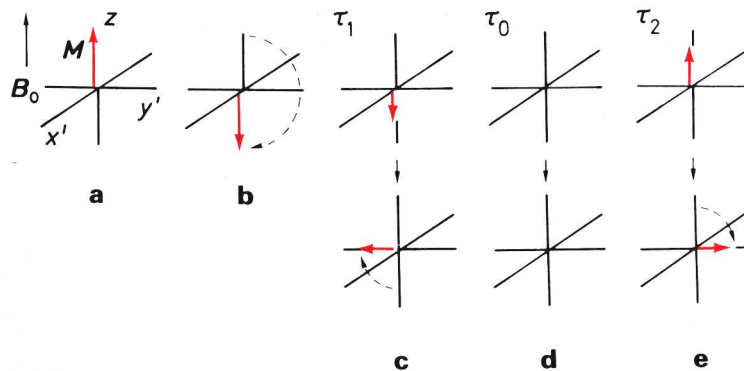
Il valore di  $T_1$  dei campioni è un parametro molto importante sia perché correlato alle proprietà dinamiche delle molecole sia perché indispensabile per definire il tempo di rilassamento (RD) tra una sequenza e la successiva qualora si utilizzino più scansioni. Ci sono diversi esperimenti disponibili per la determinazione del rilassamento longitudinale degli spin nucleari e il metodo più comunemente utilizzato risulta essere l'*inversion recovery*.

Questa tecnica consiste in una sequenza a due impulsi: si applica un impulso di  $180^\circ$ , si attende un tempo  $\tau$ , si applica un impulso  $90^\circ$  e si rivela il segnale (Figura 2.6):



**Figura 2.6:** Sequenza inversion recovery.

Il tempo  $\tau$  che separa i due impulsi viene incrementato in  $N$  esperimenti successivi. Come implica il nome, il primo impulso, a  $180^\circ$  attorno all'asse  $x'$ , inverte la popolazione di spin portando il vettore magnetizzazione, inizialmente diretto lungo l'asse  $+z$ , lungo la direzione negativa dello stesso. Come risultato del rilassamento spin-reticolo il modulo del vettore  $\mathbf{M}$  diminuisce, passa attraverso lo zero, aumenta lungo la direzione positiva dell'asse  $z$  e alla fine raggiunge il suo valore iniziale [108] (Figura 2.7).



**Figura 2.7:** Principio della tecnica inversion recovery per le misure di  $T_1$ .

Le diverse situazioni  $c$ ,  $d$  ed  $e$  caratterizzate dai tempi  $\tau_1$ ,  $\tau_0$  e  $\tau_2$ , possono essere rivelate grazie all'applicazione di un impulso a  $90^\circ$  che allinea il vettore magnetizzazione lungo l'asse  $y'$  dove è presente il rivelatore. Se  $\tau$  è zero, il vettore magnetizzazione si trova lungo la direzione negativa dell'asse  $y'$  con la massima intensità. Se si ripete l'esperimento incrementando il tempo  $\tau$  si può seguire il rilassamento degli spins in questione. Alla fine quando  $\tau$  è sufficientemente lungo ( $\tau_\infty > 5T_1$ ) si realizza un completo rilassamento e si registra un segnale dall'intensità positiva massima.

L'intensità della magnetizzazione registrata  $M_t$  è pari a:

$$M_t = M_0(1 - 2e^{-\tau/T_1}) \quad (\text{eq. 2.12})$$

dove  $M_0$  corrisponde alla magnetizzazione in equilibrio che viene registrata a  $\tau_\infty$ . Rispetto all'equazione (1), il fattore addizionale 2 deriva dal fatto che il recupero inizia con il vettore magnetizzazione invertito.

La costante  $T_1$  si ottiene interpolando i dati sperimentali ottenuti mediante l'equazione precedente. Un metodo tradizionale alternativo, permette di estrapolare il valore  $T_1$  più accuratamente mediante un diagramma semilogaritmico che riporta  $\ln(M_0 - M_t)$  contro  $\tau$ :

$$\ln(M_0 - M_t) = \ln 2M_0 - \frac{\tau}{T_1} \quad (\text{eq. 2.13})$$

In altri casi pratici è sufficiente avere solo una stima del tempo di rilassamento per calcolare i valori ottimali di RD da inserire nelle sequenze di impulsi. Il principio di questo metodo è la scomparsa del segnale a valori di  $\tau$  tali per cui la magnetizzazione longitudinale passa attraverso il piano  $x'y'$ , in quanto la differenza di popolazione risulta essere zero ( $M_t = 0$ ). Dall'equazione (2.13) si ottiene:

$$T_1 = \frac{\tau_0}{\ln 2} = 1.443 \tau_0 \quad (\text{eq. 2.14})$$

### Misure di $T_2$

La misura del tempo di rilassamento trasversale  $T_2$  si esegue sottoponendo il campione, immerso in un campo magnetico  $B_0$ , ad un impulso di  $90^\circ$  lungo l'asse  $x'$ . Al termine dell'impulso la magnetizzazione, ruotata lungo l'asse  $y'$ , comincia ad evolvere sotto i soli processi di rilassamento. Quello che si rileva è il decadimento dell'intensità  $M_{y'}$  nel tempo, ovvero il FID.

In realtà, il tempo  $T_2$  ottenuto in questo modo è dominato dalle inomogeneità di  $B_0$  infatti il campo magnetico si presenta come  $B \pm \Delta B_0$  per cui i nuclei presentano una frequenza di risonanza pari a  $\omega_L \pm \Delta\omega_L$ . Il risultato è un'apertura a ventaglio dei singoli vettori momento. Queste differenze riducono il segnale dal momento che esso dipende dal vettore somma dei momenti magnetici di tutti i nuclei e portano ad una riduzione molto più rapida della magnetizzazione rispetto ai processi di rilassamento genuini.

Il valore della costante di tempo di rilassamento trasversale  $T_2$  può essere quindi ottenuto solo se il contributo della disomogeneità del campo magnetico può essere rimosso. Questo intento può essere raggiunto mediante la sequenza *echo di Hahn* o la sequenza *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG).

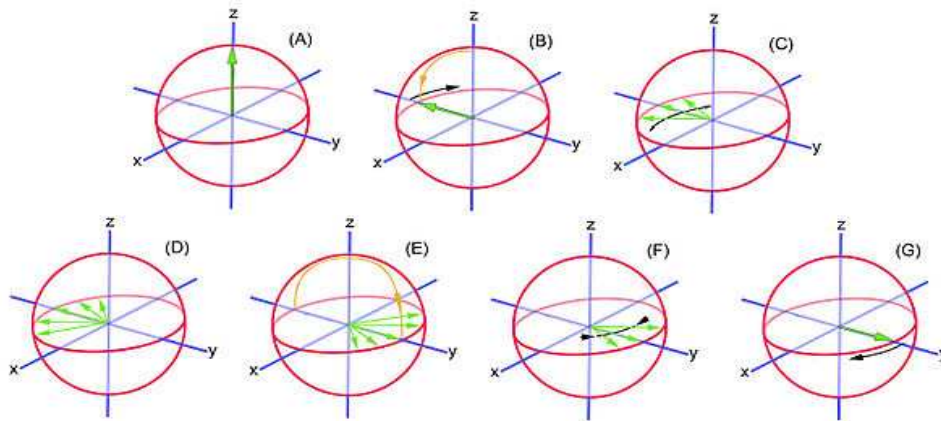
### A - Echo di Hahn

La tecnica *echo di Hahn* (o spin echo) prevede una sequenza di due impulsi: un impulso a  $90^\circ$  e uno a  $180^\circ$  e nella rivelazione del segnale ad un tempo  $2\tau$ .

Schematicamente la sequenza può essere così rappresentata:

$$-\text{[RD-}90_{x'}^\circ\text{-}\tau(n)\text{-}180_{x'}^\circ\text{-echo-]}_n\text{-}$$

dove RD sta per Recycle Delay, ovvero il tempo che intercorre tra un'acquisizione e la successiva durante il quale la magnetizzazione viene lasciata tornare all'equilibrio e  $\tau$  è il tempo tra i due impulsi a  $90^\circ$  e  $180^\circ$ .



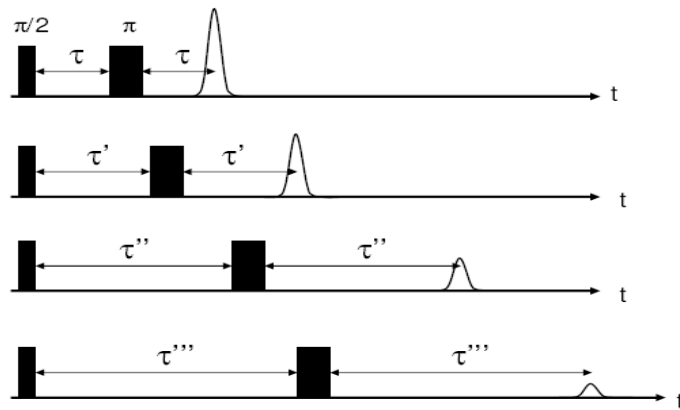
**Figura 2.8:** Evoluzione di  $M$  in una sequenza di echo di spin.

L'impulso a  $90^\circ$ , perpendicolare all'asse  $z$ , ruota la magnetizzazione  $M$  fino a portarla lungo la direzione negativa dell'asse  $y'$  (situazione B, Figura 2.8).

La perdita di fase dovuta alla disomogeneità di  $B_0$  (situazione C e D) è un processo reversibile e può essere contrastata applicando dopo un tempo  $\tau$  un impulso a  $180^\circ$  grazie al quale tutti i vettori vengono ruotati di  $180^\circ$  attorno all'asse  $x'$  e si ritrovano sul piano  $x'y'$  (situazione E). Assumendo che la posizione dei nuclei rimanga costante durante la sequenza di impulsi applicata, i protoni, che si muovono più velocemente, continuano a muoversi in senso orario e gli altri in senso antiorario. In questo modo al tempo  $2\tau$  si ha una situazione di completa rifocalizzazione dei vettori e si raggiunge il punto massimo del segnale spin echo (situazione F e G). Dopo il tempo  $2\tau$  i vettori iniziano ancora ad aprirsi a ventaglio e l'altezza del segnale diminuisce.

Durante l'intervallo  $2\tau$ , alcuni spin perdono la loro coerenza di fase a causa del naturale rilassamento trasversale, e questi, a differenza dell'altro fenomeno non possono essere rifocalizzati con l'echo. Dall'analisi fatta appare chiaro che l'intensità dell'echo dipende solo dal tempo di rilassamento trasversale  $T_2$ .

Questo singolo esperimento viene ripetuto  $N$  volte aumentando di volta in volta il valore di  $\tau$  (Figura 4.12) e, riportando in grafico la variazione dell'altezza dell'echo nel tempo  $\tau$ , si ottiene la curva di rilassamento del campione.

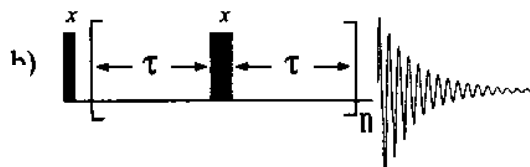


**Figura 2.9:** Rappresentazione grafica della sequenza di impulsi di echo di Hahn.

In realtà se durante il tempo  $\tau$  un qualsiasi spin si sposta all'interno del campione, dopo l'applicazione dell'impulso a  $180^\circ$  esso sperimenta un campo diverso da quello iniziale per cui non viene rifocalizzato e all'aumentare del tempo  $\tau$  questo effetto può diventare preponderante.

### **B - Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)**

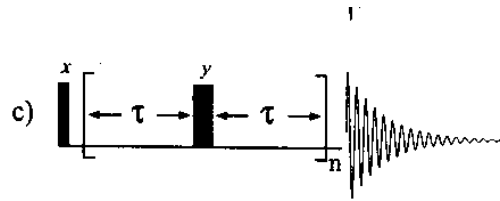
In queste condizioni un migliore approccio si ottiene con la tecnica *Carr-Purcell*, che consiste nel ripetere in ogni singolo esperimento la sequenza spin echo precedente usando il valore di  $\tau$  più piccolo possibile in modo da ridurre la perdita del segnale dovuto alla diffusione.



**Figura 2.10:** Sequenza Carr-Purcell.

L'intensità dell'echo a periodi di tempo più lunghi è ottenuta ripetendo  $n$  volte la sequenza  $-\tau-180^\circ-\tau$ . Questa sequenza causa la rifocalizzazione degli echo alternativamente lungo  $-y'$  e  $+y'$  e l'unico difetto di questo approccio è che qualsiasi errore nella lunghezza dell'impulso a  $180^\circ$  porta ad una imperfetta rifocalizzazione del segnale.

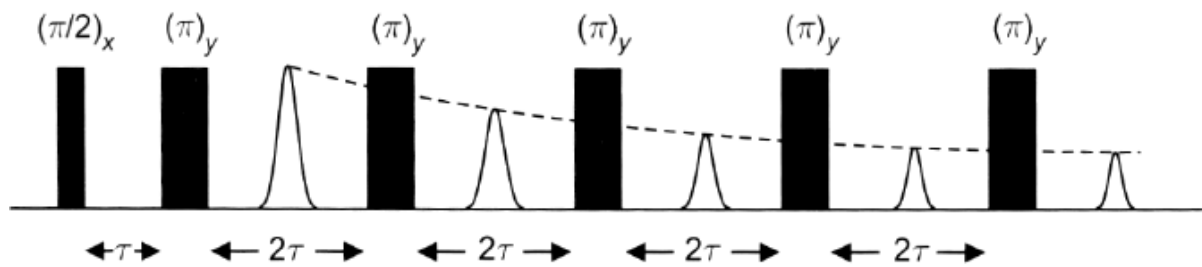
A questo si può ovviare con il metodo *CPMG* (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) [109, 110], nel quale gli impulsi a  $180^\circ$  vengono realizzati sull'asse  $y'$ , anziché  $x'$ , causando in questo modo la rifocalizzazione sulla regione del piano  $+y'$  per ogni echo (Figura 2.11).



**Figura 2.11:** Sequenza CPMG.

In questo modo gli errori sulla lunghezza degli impulsi non sono cumulativi, dal momento che vengono cancellati dopo ogni echo pari ( $n$  pari). Il valore di  $T_2$  si ottiene poi realizzando una serie di esperimenti nei quali viene aumentato il valore  $2\tau n$  incrementando  $n$  (Figura 2.15) e acquisendo il segnale dopo ogni echo pari, a livello del quale tutti gli errori sulla lunghezza dell'impulso sono cancellati.

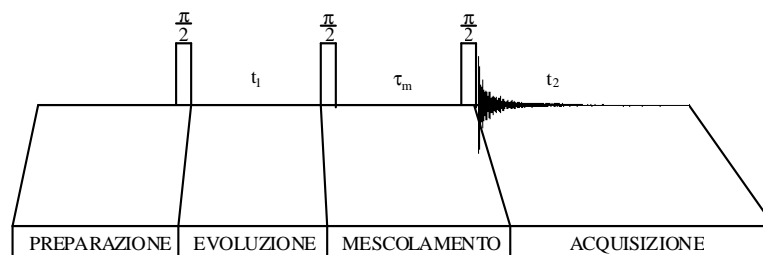
La tecnica *CPMG* è molto più veloce della tecnica *spin-echo*, ma conviene utilizzarla solo quando le componenti di  $T_2$  non sono troppo brevi ( $\mu s$ ).



**Figura 2.12:** Rappresentazione della curva di decadimento esponenziale con costante di tempo  $T_2$  ottenuta con una sequenza CPMG.

### 2.1.2. NMR ad alta risoluzione bidimensionale.

Questo esperimento richiede due trasformate di Fourier, ortogonali tra di loro e su due assi dei tempi indipendenti:  $t_1$  e  $t_2$ . Può essere descritto mediante il seguente schema generale (Figura 2.13):



**Figura 2.13:** Schema di un esperimento NMR bidimensionale

Durante il periodo di preparazione, i nuclei raggiungono l'equilibrio termico ed il sistema viene perturbato mediante un impulso di radiofrequenza a  $\pi/2$  che deflette la magnetizzazione sul piano xy. Durante il periodo di evoluzione ( $t_1$ ) la magnetizzazione può evolvere sotto l'influsso di vari fattori, quali l'accoppiamento spin-spin e la precessione. Il successivo periodo di mescolamento ( $t_m$ ), costituito da una serie di impulsi e intervalli di tempo, causa trasferimenti di magnetizzazione tra gli spin e il segnale risultante viene registrato come FID durante il tempo  $t_2$ . Ripetendo  $n$  volte l'esperimento variando sistematicamente il tempo  $t_1$  si ottengono  $n$  FID, ognuno dei quali fornisce uno spettro nel quale l'intensità e/o la fase dei picchi dipende dal tempo  $t_1$ . L'applicazione della trasformata di Fourier ai FID acquisiti durante  $t_2$  genera la matrice  $S(t_1; \omega_2)$  e la successiva applicazione della trasformata di Fourier lungo l'asse dei tempi  $t_1$  permette di ottenere lo spettro 2D. Solo  $t_2$  è un asse reale dei tempi perché in questo periodo viene acquisito un vero FID; quello che si ottiene lungo l'asse dei tempi  $t_1$  è un interferogramma costruito prendendo un punto da ciascuno spettro monodimensionale della matrice  $S(t_1, \omega_2)$ . Per ottenere utili informazioni da uno spettro 2D è necessario che i nuclei evolvano con una certa frequenza durante il tempo  $t_1$  e con frequenza diversa durante  $t_2$ .

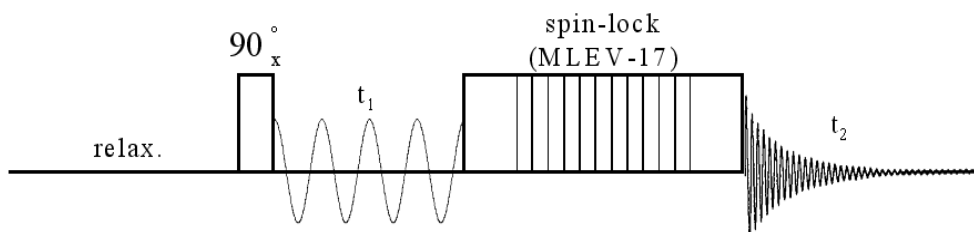
In uno spettro bidimensionale i picchi lungo la diagonale ( $\omega_A, \omega_A$ ) si riferiscono a nuclei in cui la magnetizzazione non si trasferisce e precedono con la stessa frequenza sia durante  $t_1$  sia durante  $t_2$ . Essi comparirebbero anche nel corrispondente spettro monodimensionale. Quelli fuori diagonale ( $\omega_A, \omega_B$ ), denominati *cross-picchi*, esprimono l'avvenuta correlazione tra due nuclei (A e B) tra i quali c'è stato trasferimento della magnetizzazione durante il tempo  $t_m$ , in virtù di uno dei due seguenti tipi di interazioni:

- i) *accoppiamento scalare*: consente il trasferimento della magnetizzazione tra nuclei separati da un limitato numero di legami attraverso la polarizzazione delle loro nubi elettroniche. Gli esperimenti di correlazione scalare utilizzati in questa tesi (TOCSY) mirano ad individuare sistemi di spin relativi a molecole dell'estratto acquoso del caffè verde.
- ii) *accoppiamento dipolare*: consente il trasferimento della magnetizzazione tra nuclei spazialmente vicini ( $d < 4.5-5 \text{ \AA}$ ) ed è dovuto all'effetto nucleare Overhauser (NOE). Gli esperimenti di correlazione dipolare utilizzati (NOESY) mirano ad evidenziare l'eventuale interazione tra diverse molecole presenti nell'estratto acquoso.

### 2.1.2.1. TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)

Il TOCSY è un esperimento bidimensionale omonucleare, nel quale il trasferimento della magnetizzazione tra i nuclei avviene per mezzo dell'accoppiamento scalare spin-spin. Un'opportuna sequen-

za di impulsi composita indicata come spin lock attua il trasferimento della magnetizzazione di ciascun protone a tutti i protoni appartenenti allo stesso sistema di spin, siano essi direttamente accoppiati con il precedente o no. La sequenza di impulsi utilizzata per un esperimento di questo tipo è schematizzata in figura 2.8:



**Figura 2.14:** Sequenza di base dell'esperimento TOCSY

Durante il periodo di spin-lock ( $t_{\text{mix}}$ ) la magnetizzazione rimane bloccata (locked) sul piano trasversale. Gli spin nucleari evolvono unicamente sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare realizzando così la condizione di accoppiamento forte. L'annullamento delle interazioni con il campo magnetico esterno  $\mathbf{B}_0$  elimina infatti i contributi del *chemical shift*; tutti gli spin sperimentano il medesimo campo magnetico efficace consentendo alla magnetizzazione di propagarsi da uno spin al suo vicino e così via; quanto più lungo è il tempo di mescolamento tanto maggiore è la propagazione della magnetizzazione attraverso l'intero sistema di spin.

Ci sono essenzialmente due approcci possibili per l'implementazione dell'esperimento TOCSY; il primo consiste nella realizzazione di un impulso di *spin-lock* con un campo di radiofrequenze (rf) in onda continua, l'altro con una sequenza di impulsi. Poiché nel primo caso è possibile il rischio di danneggiamento del probe a causa della necessità di applicare potenze elevate, generalmente si ricorre al secondo metodo utilizzando una sequenza di impulsi. La sequenza d'impulsi più frequentemente usata è la MLEV-16 alla quale viene aggiunto un impulso di rifocalizzazione di  $180^\circ$  lungo  $y$  (MLEV-17) per eliminare l'errore di fase eventualmente accumulato durante la sequenza:

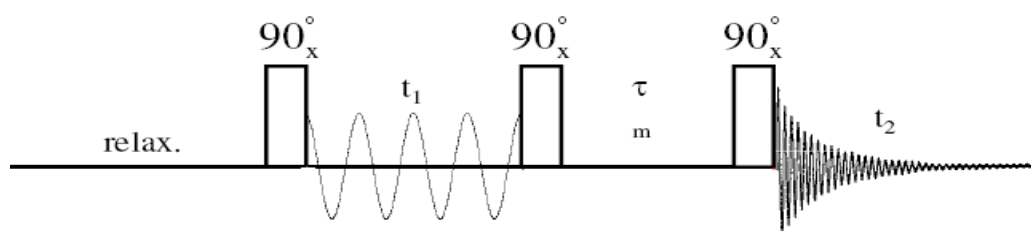
MLEV-16      ABBA BBAA BAAB AABB

dove       $A = 90^\circ_x 180^\circ_y 90^\circ_x$   
              $B = 90^\circ_x 180^\circ_y 90^\circ_x$

MLEV-17      (MLEV-16) –  $180^\circ_y$  – (MLEV-16) –  $180^\circ_y$

### 2.1.2.2. NOESY

Il NOESY è un esperimento che prende in considerazione le interazioni dipolari tra i singoli momenti magnetici nucleari, che si trasmettono nello spazio. Irraggiando selettivamente e intensamente il sistema alla frequenza di risonanza propria di un determinato protone, si osservano variazioni nell'intensità dei segnali corrispondenti a nuclei vicini a quello perturbato, cioè a nuclei ad esso accoppiati dipolarmente. Su tale principio si basa il NOE (Nuclear Overhauser Effect). In figura 2.15 è schematizzato un tipico esperimento NOESY:



**Figura 2.15:** Schema generale per l'acquisizione di uno spettro NOESY

Il primo impulso di  $90^\circ$  trasferisce la magnetizzazione nel piano trasversale dove, durante il  $t_1$ , evolve per effetto del chemical shift e dell'accoppiamento scalare.

Il secondo impulso riporta parte della magnetizzazione lungo z, dove durante il  $\tau_m$  rilassa attraverso fenomeni di interazione dipolare. Infine il terzo impulso riporta la magnetizzazione, che ha subito mescolamenti tra i nuclei accoppiati dipolarmente, nel piano xy permettendo così di rilevarla durante il  $t_2$ . Le componenti di  $\mathbf{M}$  derivanti da accoppiamenti scalari vengono eliminate con opportuni cicli di fase.

Le distanze interprotoniche possono essere determinate dall'entità dell'effetto NOE e quindi dal volume dei cross-picchi presenti nello spettro, secondo la seguente relazione:

$$\eta_I(S) = \frac{W_2 - W_0}{2W_1 + W_0 + W_2} \cdot \frac{\gamma_s}{\gamma_I} \quad (\text{eq. 2.12})$$

(dove le  $W_i$  rappresentano le probabilità di transizione energetiche del sistema di spin considerato). L'effetto NOE è rilevabile solamente per protoni che distano tra loro al massimo  $5 \text{ \AA}$ , poiché è inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza interprotonica; dipende inoltre dal tempo di correlazione che caratterizza la rapidità dei moti molecolari. A seconda che prevalgano  $W_2$  o  $W_0$ , (transizioni a doppio e zero quanto rispettivamente), si avranno NOE positivi o negativi: se consideriamo molecole piccole in soluzioni poco viscosi,  $\omega_0\tau_c \ll 1$  e l'effetto NOE risulta positivo (condi-

zioni di estreme narrowing); al contrario, macromolecole in soluzioni viscosi aventi  $\omega_0\tau_c \gg 1$  (in condizioni di slow motion) mostreranno  $\eta$  negativi. Se invece  $\omega_0\tau_c$  vale circa uno, le transizioni doppio quantiche avvengono con la stessa probabilità delle zero quantiche,  $W_2 \approx W_0$ , perciò l'effetto NOE si annulla.

Nell'effettuare un esperimento NOESY, è necessario scegliere accuratamente il *mixing time* poiché il suo valore deve essere sufficientemente grande da consentire il mescolamento della magnetizzazione tra spin accoppiati, ma allo stesso tempo non troppo elevato in modo tale da evitare trasferimenti successivi di magnetizzazione tra protoni non accoppiati dipolarmente (*spin diffusion*). Questo fenomeno genererebbe nello spettro dei picchi fittizi che potrebbero essere ricondotti a correlazioni non esistenti e inoltre provocherebbero la riduzione di segnali corrispondenti a nuclei accoppiati, rendendo inutilizzabile il loro impiego per la determinazione delle distanze interprotoniche.

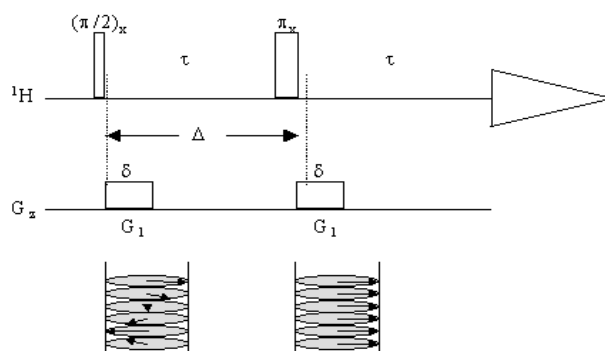
### 2.1.2.3. DOSY

L'esperimento DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) permette di separare i segnali di diversi composti in soluzione sulla base dei loro diversi coefficienti di diffusione senza ricorrere alla separazione fisica degli stessi. La diffusione è la misura del moto traslazionale delle molecole. È una proprietà delle molecole strettamente correlata alle dimensioni delle stesse e in particolare al raggio idrodinamico. Tali grandezze sono legate secondo l'equazione di Stokes-Einstein:

$$D = K_B T / f \quad (\text{eq. 2.13})$$

dove  $D$  è il coefficiente di diffusione,  $K_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  è la temperatura,  $f$  è il fattore frizionale che dipende dalla viscosità  $\eta$  e dal raggio idrodinamico  $r_H$  (assumendo che la molecola considerata sia sferica) secondo la seguente espressione:  $f = 6\pi\eta r_H$

Per misurare o in generale sfruttare la diffusione si sono sviluppate tecniche NMR che usano gradienti di campo magnetico controllati esternamente (Pulsed-Field-Gradient NMR: PFG). Questi provocano cambiamenti spaziali e lineari del campo magnetico applicato  $\mathbf{B}_0$  nel campione, e vengono utilizzati per codificare e decodificare la posizione dei nuclei determinandone lo spostamento. La diffusione molecolare viene rilevata lungo la direzione del gradiente di campo applicato, solitamente lungo l'asse  $z$ . La sequenza base di un esperimento PFG spin echo è la seguente :



**Figura 2.16** : sequenza PFG spin echo

L'applicazione di un impulso a gradiente di campo magnetico codifica la posizione spaziale degli spin nel campione; questa viene in seguito decodificata applicando un secondo impulso esattamente opposto al primo oppure uguale se accompagnato da un impulso a  $180^\circ$ . Con l'impiego di gradienti si avrà rifocalizzazione completa del segnale solo quando il campo locale sperimentato da uno spin è identico durante i due impulsi a gradiente, ovvero, diventando il campo dipendente dallo spazio, solo se lo spin rimane nella stessa posizione fisica tra l'applicazione dei due gradienti. Se la molecola diffonde dalla sua posizione iniziale durante il periodo di diffusione  $\Delta$ , il campo locale sperimentato durante il secondo gradiente non sarà uguale a quello sperimentato durante il primo gradiente, e si avrà rifocalizzazione solo parziale del segnale. Il segnale acquisito sarà attenuato di una quantità proporzionale alla velocità con cui la molecola si è spostata durante il periodo  $\Delta$  e quindi al suo coefficiente di diffusione. Conoscendo l'intensità e la durata del gradiente applicato (e aumentato) ad ogni esperimento, il decadimento del segnale permette di calcolare il coefficiente di diffusione. L'esperimento DOSY è un esperimento bidimensionale in cui la variabile incrementata è l'intensità del gradiente applicato, che causa una modulazione del segnale acquisito, in particolare un decadimento esponenziale correlato alla diffusione molecolare. Tale decadimento viene interpolato secondo la seguente equazione generale:

$$I = I_0 \exp\left(\frac{-2\tau}{T_2} - (\gamma\delta G)^2 D\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \quad (\text{eq.2.14})$$

dove  $I_0$  è l'intensità del segnale quando l'intensità del gradiente è zero,  $G$  è l'intensità del gradiente,  $D$  è il coefficiente di diffusione.

Un esperimento DOSY è rappresentato in uno spettro 2D, con chemical shift lungo un asse (quello della dimensione osservata) e i coefficienti di diffusione lungo l'altro.

## 2.2. Metodi di elaborazione dei dati.

### 2.2.1. Metodi chemiometrici.

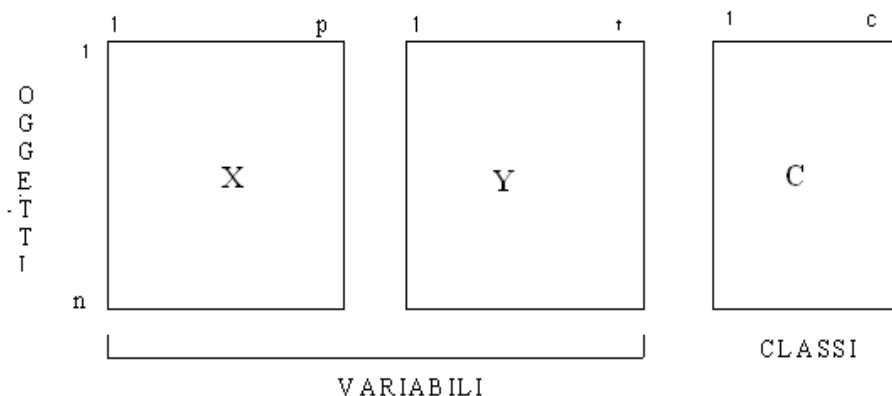
Secondo la definizione data da S. Wold (1974) la chemometria è “...l’arte di estrarre informazioni chimicamente rilevanti da dati prodotti in esperimenti chimici” .

Le metodologie chemometriche permettono di estrarre informazioni da piccoli o grandi set di dati utilizzando modelli matematici e statistici.

Questo insieme di tecniche ha la funzione comune di separare il contenuto di informazione utile da quanto altro è contenuto nei dati come ad esempio rumore sperimentale e informazione ridondanti, cerca in particolare di trovare combinazioni che esprimano relazioni tra variabili provenienti dallo stesso set di osservabili.

La categoria delle tecniche chemometriche comprende l’analisi delle componenti principali (PCA),

Un insieme di dati multivariato può essere rappresentato secondo lo schema riportato in figura.



**Figura 2.17:** Rappresentazione di un insieme di dati multivariato

La tabella dei dati è rappresentata da una matrice di  $n$  righe che rappresenta gli oggetti (campioni, esperimenti etc.) e di  $p/r$  colonne che rappresenta le variabili (descrittori, caratteri etc.) con cui ciascun oggetto viene descritto. Le variabili possono essere distinte in variabili indipendenti (matrice X) e variabili dipendenti (matrice Y). Agli oggetti inoltre può essere associato un vettore che contiene l’informazione di appartenenza di ciascun oggetto ad una delle classi predefinite (matrice C).

In questo lavoro sono state utilizzate la PCA (Principal Component Analysis) e la PLS (Projection to Latent Structure). Entrambi sono metodi di analisi multivariata basati su metodi di proiezione dei dati. Questo approccio rappresenta il caso in cui un gruppo di punti in uno spazio  $k$ -dimensionale ( $k$ , numero di variabili) viene proiettato in uno spazio a minor dimensioni al fine da migliorarne

l'interpretabilità. Le coordinate del set di punti nel nuovo piano fornisce una rappresentazione compressa delle osservazioni e i vettori direzione del piano forniscono una corrispondente rappresentazione delle variabili.

### 2.2.1.1. Analisi delle componenti principali (PCA).

L'analisi delle componenti principali è un metodo di proiezione multivariato che ruota i dati in modo che la massima variabilità sia proiettata sugli assi.

Il principale utilizzo della PCA è per ridurre la dimensionalità di un dataset di variabili quando queste sono numerose e correlate, mantenendo allo stesso tempo il più possibile la variabilità; permette di identificare *patterns* nei dati e di esprimerli in modo da evidenziarne similarità e differenze compiendo una descrizione compatta e ottimale del dataset (Joliffe, 1986).

La PCA opera la riduzione della dimensionalità attraverso la trasformazione di originario dataset di  $p$  variabili  $\{X_1, X_2, \dots, X_p\}$  correlate in un nuovo set di variabili non correlate, chiamate componenti principali ( $PC_i$ ), ordinate secondo la varianza decrescente. Le  $PC_i$  sono combinazioni lineari delle variabili originali, ortogonali e quindi indipendenti tra loro.

L'operazione compiuta dalla PCA è visualizzabile come la rotazione degli assi esistenti verso nuove posizioni nello spazio delle variabili originali. Nella nuova rotazione viene persa la correlazione fra le nuove variabili definite da questa trasformazione.

La prima componente principale ( $PC_1$ ) esprime la massima quantità di variazione

$\text{Var}(PC_i)$  è anche chiamato autovalore di  $PC_i$ .

I dati iniziali vengono rappresentati nella forma di matrice in cui le righe corrispondono ai soggetti (per esempio i campioni di caffè verde) e le colonne le variabili (gli integrali degli spettri NMR).

Graficamente le  $n$  osservabili si distribuiscono in uno spazio costituito da  $p$  variabili.

variabili \ soggetti	$X_1$	$X_2$	...	$X_p$
1	$X_{11}$	$X_{12}$	...	$X_{1p}$
2	$X_{21}$	$X_{22}$	...	$X_{2p}$
...	...	...	...	...
n	$X_{n1}$	$X_{n2}$	...	$X_{np}$

Da questo dataset può essere calcolata la matrice varianza-covarianza delle variabili X che ha la seguente forma:

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} & \cdots & S_{1p} \\ S_{21} & S_{22} & \cdots & S_{2p} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ S_{p1} & S_{p2} & \cdots & S_{pp} \end{bmatrix} \quad (\text{eq.2.15})$$

Questa matrice di dimensioni pXp ha come elemento di posto ij la covarianza tra la variabile Xi e la variabile Xj, perciò sulla diagonale principale si può trovare la varianza delle singole variabili (la covarianza di Xi con se stessa non è altro che la varianza di Xi).

Per calcolare la matrice di covarianza si utilizza la seguente equazione:

$$\text{Cov}(x_j, x_k) = \sum_{i=1}^n \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ik} - \bar{x}_k)}{n - 1} \quad (\text{eq. 2.16})$$

dove n è il numero totale di osservabili.

I risultati ottenuti per la matrice S non sono indipendenti dalle unità di misura nelle quali sono state rilevate le variabili, quindi la matrice varianza-covarianza è utilizzata solo quando le variabili sono state misurate nella stessa scala.

Per l'utilizzo efficace della PCA è necessario un pre-trattamento dei dati.

In generale questo si esegue per stabilizzare i dati ed evitare la non linearità fra le relazioni delle variabili, normalizzare la distribuzione e rendere più solida l'analisi. I trattamenti più comuni si basano su una trasformazione dei dati con funzioni matematiche (log, arcos, radice quadrata), con la *scalatura*, e con la *centratura* dei dati stessi.

Gli intervalli numerici delle variabili presentano generalmente delle differenze sostanziali; una variabile con un intervallo largo avrà una varianza grande mentre una variabile con un intervallo stretto avrà una varianza piccola; poiché la PCA è un metodo basato su una proiezione della massima varianza, il modello dipenderà maggiormente dalle variabili con varianza grande, senza dare peso adeguato alla vera oscillazione di ciascuna variabile. Per standardizzare quindi il peso delle diverse variabili si ricorre alla scalatura, che può essere effettuata secondo diversi criteri; il più comune è detto di *UV scaling* o scalatura a varianza unitaria, che si ottiene calcolando per ogni variabile la deviazione standard e poi moltiplicando ogni valore della variabile per il reciproco della varianza, ottenendo in tal modo per ogni variabile una varianza unitaria.

Con il criterio di scalatura *Pareto* ogni valore viene diviso per la deviazione standard della variabile a cui appartiene, in questo modo la varianza di ogni nuova variabile corrisponde alla sua deviazione standard. Per migliorare l'interpretabilità del modello si procede con la *centratura* della matrice che si ottiene sottraendo ad ogni valore della matrice la media dei valori della rispettiva variabile di appartenenza. I nuovi dati oscilleranno intorno a zero evidenziando la deviazione rispetto alla media.

La procedura matematica per la determinazione delle componenti principali consiste nel calcolo di autovalori e autovettori della matrice covarianza (o di correlazione) dei dati X. Per autovalore della matrice S si intende un numero  $\lambda$  tale che esista un vettore  $v \neq 0$  per cui valga la relazione  $S \cdot v = \lambda \cdot v$ . L'autovettore con il più alto autovalore è la componente principale del dataset.

La prima componente principale  $PC_1$  è data dalla combinazione lineare delle variabili originali  $X_1, X_2, \dots, X_p$ :

$$PC_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1p}X_p \quad (\text{eq. 2.17})$$

che varia il più possibile per i soggetti e per cui vale la condizione:

$$a_{11}^2 + a_{12}^2 + a_{13}^2 + \dots + a_{1p}^2 = 1 \quad (\text{eq. 2.18})$$

dove  $a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1p}$  sono i coefficienti (loading) assegnati alle p variabili originali per  $PC_1$ . I coefficienti delle variabili originali per una componente principale sono le coordinate dei corrispondenti autovettori. Allo stesso modo la seconda componente principale:

$$PC_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2p}X_p \quad (\text{eq. 2.19})$$

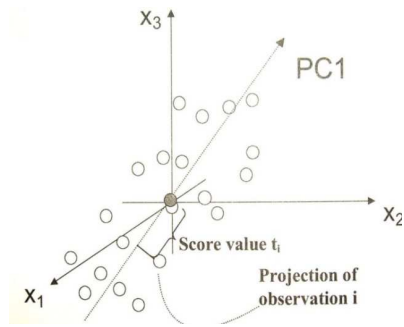
è tale che l'autovalore di  $PC_2$  è quanto più grande possibile, dato il vincolo che:

$$a_{21}^2 + a_{22}^2 + a_{23}^2 + \dots + a_{2p}^2 = 1 \quad (\text{eq. 2.20})$$

e a condizione che  $PC_2$  non sia correlato a  $PC_1$ .

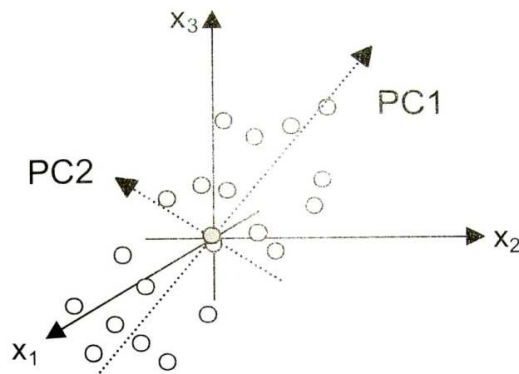
Le altre componenti possono essere espresse nello stesso modo. Teoricamente è possibile determinare p componenti principali ma di solito è sufficiente considerare le prime 2 o 3 che illustrano la parte più importante della variazione totale. Ignorando le componenti meno significative, si perde qualche informazione, ma il metodo è tale da indurre una perdita di informazione molto ridotta, ed ha il vantaggio di ridurre notevolmente le dimensioni del dataset originale.

Geometricamente la  $PC_1$  (figura 2.12) è la linea che, in uno spazio definito da k variabili, (qui rappresentate in numero di tre per semplicità) meglio approssima le osservabili nel senso del *least squares* (minimi quadrati). Ogni osservabile può pertanto essere proiettata su di essa.



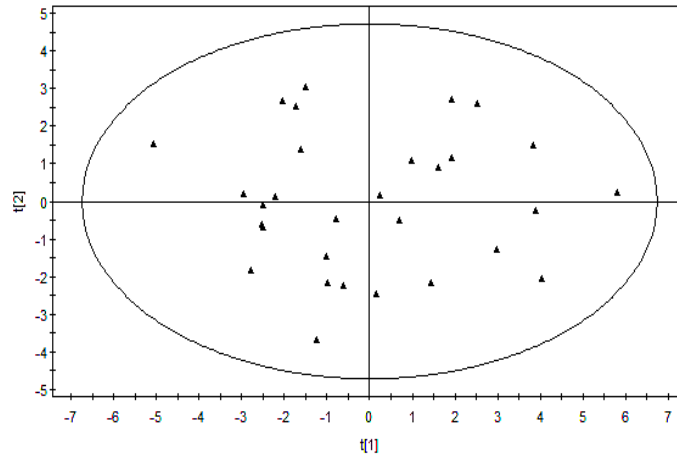
**Figura 2.18:** ottenimenti della PC<sub>1</sub>

Quando due componenti principali sono scelte, insieme definiscono un piano, una finestra nello spazio  $k$ -dimensionale; proiettando le osservabili su questo piano e plottando il risultato è possibile visualizzare la struttura del nostro dataset (figura 2.19).



**Figura 2.19:** rappresentazione delle 2 PCi

I valori delle coordinate delle osservabili su questo piano vengono chiamati *scores*, mentre il plot in cui sono rappresentate è detto *score plot* (figura 2.14).



**Figura 2.20** – Rappresentazione bidimensionale dello score plot

Lo *score plot* consente di verificare il comportamento dei soggetti rispetto alle due o più componenti, ad esempio per identificare eventuali raggruppamenti, la presenza di dati anomali (outliers) o di distribuzioni particolari. Le coordinate di ogni soggetto sono date dalla coppia di *scores* relative alla componenti principali.

Facendo ricorso agli autovettori si possono tracciare gli assi dell'ellisse ( $t_1$  e  $t_2$  della figura 2.20), che dovrebbe contenere tutte le osservabili del dataset di partenza. La realizzazione è basata sulla  $T^2$  di Hotelling; si ottiene questo indice dalla combinazione di tutti i valori di  $t$  relativi alle osservabili considerate e misura la distanza delle osservabili dal centro del modello.

Per modello si intende un'ipotesi sulla struttura della variabilità comune alle osservazioni. La  $T^2$  di Hotelling per la  $k$ -esima osservabile, basata sulle  $N$  variabili, è data dalla seguente relazione:

$$T_k = \sum_{a=1}^N \frac{t_{ka}^2}{s_{ta}^2} \quad (\text{eq. 2.21})$$

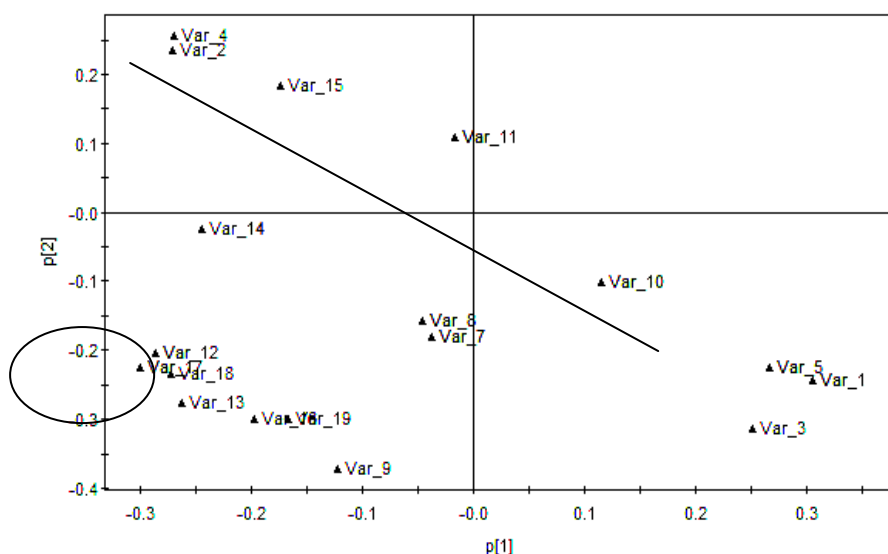
dove  $s_{ta}^2$  è la varianza di  $t_a$ .

Se invece vogliamo sapere come sono correlate le variabili e con che peso influiscono, si considerano i *loadings* di tali variabili.

I *loadings* sono i coefficienti assegnati alle  $p$  variabili originali per ciascuna componente principale, e possono essere rappresentati sotto forma di matrice in cui le colonne corrispondono agli autovettori della matrice di correlazione, mentre le righe rappresentano le variabili originali. In ogni riga si trovano dunque i coefficienti che indicano l'importanza di ogni variabile originale sull'autovettore corrispondente. Algebricamente indicano quanto le variabili siano linearmente combinate a formare

gli *scores*. La matrice dei *loadings* può essere rappresentata graficamente mediante il *loading plot* (figura 2.21); tale grafico permette di valutare l'importanza di ogni variabile originale nelle nuove componenti principali e le relazioni di dipendenza diretta e inversa tra le variabili originali.

Geometricamente il loading della prima componente principale esprime l'orientazione del “modello” di piano definito dalle 2 PC nello spazio k-dimensionale (k variabili). La direzione della PC1 in relazione alla variabile originale è data dal coseno dell'angolo  $\alpha$  formato dalla PC1 con ciascuna variabile  $x$ . Questo valore indica quanto le  $X_n$  variabili originali contribuiscono (load) nella definizione della prima componente principale e delle componenti successive.



**Figura 2.21** - Rappresentazione del loading plot

Gli assi cartesiani sono costituiti generalmente dalle prime due componenti principali, ove i vettori che li rappresentano sono chiamati  $p_1$  e  $p_2$ ; i punti presenti nell'ellisse rappresentano le variabili originali individuate dalla coppia di *loadings* che ciascuna variabile ha nelle due componenti considerate. Le variabili che si trovano vicine all'origine degli assi non sono significative per la determinazione delle due PC considerate. Le variabili che assumono valori elevati (sia positivi che negativi) sull'asse  $PC_1$  contribuiscono in modo preponderante alla definizione della prima componente, mentre quelle che assumono valori elevati su  $PC_2$  contribuiscono maggiormente alla definizione della seconda componente principale. Infine le variabili vicine tra loro sono correlate positivamente mentre quelle opposte, collegate dalla linea (in figura 2.15), lo sono negativamente. Nel caso di variabili disposte a  $90^\circ$  tra loro, queste non hanno alcuna correlazione nel campo delle due componenti principali.

I due plot sono infine sovrapponibili: se un campione è caratterizzato da un certo peso di una PC nello *score plot*, allora sarà caratterizzato nel *loading plot* dalla variabile che pesa nella definizione di quella PC.

Quando alcune osservabili si allontanano dal comportamento generale delle altre può essere utile valutarne l'esclusione dal dataset, attraverso la valutazione di alcuni parametri statistici.

### 2.2.1.2. Partial Least Square Projection to latent structures (PLS)

La PLS è un metodo di relazione tra le matrici X e Y, che rende possibile l'analisi di dati contenenti informazione inutile o incompleta. È un modello di proiezione che può approssimare ogni matrice di dati a patto che ci sia un certo grado di similarità tra gli oggetti: maggiore è questa similarità e maggiore sarà il numero delle componenti del modello e quindi la precisione dello stesso. Il modello viene creato da un *training set* di N osservazioni (oggetti, composti, etc) che consiste di  $p$  variabili (X) e di  $r$  variabili (Y), come illustrato in figura 2.16. Sulla base del modello creato dalla matrice X, si fanno predizioni sulla matrice Y. Il modello PLS creato viene giudicato "affidabile" quando supera una serie di test e solo a questo punto può essere utilizzato per le predizioni.

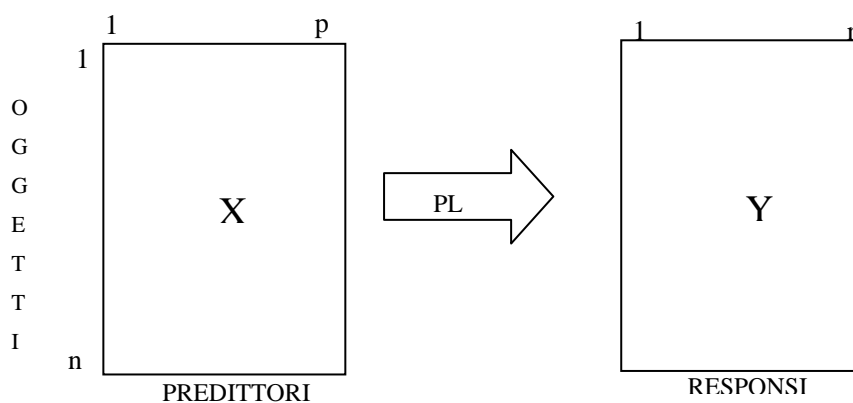


Figura 2.22 - Rappresentazione del modello utilizzato per l'analisi PLS

Un'estensione della PLS è la PLS-DA (Discriminant Analysis) il cui obiettivo è la classificazione e discriminazione di un set di dati appartenenti a gruppi o classi. La classificazione è utilizzata per predire una probabile classe per un'osservabile; la discriminazione è utilizzata per evidenziare, migliorando, la separazione tra due o più gruppi di osservabili e capire quale variabile porti l'informazione di separazione tra classi. Tale metodologia statistica rientra nei metodi di riconoscimento di patterns (PARC); sia l'analisi PCA che PLS-DA sono metodi di questo tipo. In particolare la PLS-DA si basa su un set di classi assegnate, ognuna delle quali contiene un numero di osservazioni "mappate" tra tutte le variabili, e, rende possibile classificare nuove osservabili come simili o dissimili a membri di classi esistenti. A differenza della PCA che, in un problema di riconoscimento di patterns trova, in uno spazio multivariato, la direzione che rende massima la variazione tra le osservabili (nel nostro caso campioni di caffè verde); la PLS-DA determina un modello statistico tale da separare le diverse classi a cui appartengono le osservabili in questione (diversa provenienza geografica), sulla base della matrice di variabili X. Per codificare l'identità di ogni classe utilizza una matrice di variabili artificiali Y, o latenti che descrive la classe di ogni osservazione del set di dati (training set). La variabile Y è una variabile artificiale che assume un diverso valore numerico discreto nella descrizione di ogni classe.

Ruotando le variabili latenti si ottiene la massima separazione delle classi.

Una condizione necessaria per la PLS-DA è che ogni classe non sia disomogenea e occupi un volume piccolo e definito nello spazio X. Sperimentalmente l'analisi PLS-DA è efficace quando si hanno a disposizione 2-4 classi, ma quando il loro numero diventa superiore i risultati possono diventare incomprensibili e difficili da analizzare.

L'interpretazione dello score plot e del loading plot per il modello di PLS-DA creato è la medesima di quella per la PCA. La differenza sostanziale è che i campioni in questione vengono qui considerati come appartenenti a classi su cui si costruiscono delle variabili artificiali evidenziate nel loading plot, e che contribuiscono all'analisi di clusterizzazione.

Un'ulteriore modifica è la PLS gerarchica, che semplifica l'interpretazione di molte variabili: ossia invece di ridurre il numero delle variabili, spesso elevato, le variabili vengono suddivise in blocchi, sui quali viene applicata PCA o PLS. Ogni blocco di variabili è caratterizzato da degli *scores*, che vengono a creare una nuova matrice che viene successivamente utilizzata in una nuova PLS.

## **2.2.2 Trasformata inversa di Laplace.**

In genere l'applicazione della sequenza CPMG ad un sistema multifasico (come un chicco di caffè, dove sono contemporaneamente presenti acqua e olio) dà luogo ad un segnale di decadimento multiesponenziale, la cui forma complessiva è riferibile alla sovrapposizione di n differenti popolazioni di mobilità protonica in regioni distinte della scala dei tempi.

L'espressione generale che descrive la forma della curva di decadimento NMR per un sistema di N spin, come risultato dell'applicazione ad es. della sequenza CPMG, è del tipo:

$$s(t) = \sum_{j=1}^M g_j e^{-t/T_j} \quad (\text{eq. 2.22})$$

dove M è il numero di microdomini caratterizzati da stessa densità di spin ( $g_j$ ) e costante di rilassamento ( $T_j$ ).

In genere le M popolazioni e i corrispondenti tempi di rilassamento trasversale possono essere ricavate principalmente secondo due procedure di elaborazione della curva CPMG.

La prima di queste consiste nel fitting ai minimi quadrati non lineari tramite, ad esempio l'algoritmo di Levenberg-Marquardt. Questo metodo risulta efficace in genere per un numero limitato di componenti a diversi tempi di rilassamento ( $M < 3$ ).

Quando però il numero M diventa elevato e, inoltre, le costanti di decadimento hanno valori abbastanza vicini fra loro, è possibile descrivere il sistema con un modello di distribuzione continua o quasi-continua dei tempi di rilassamento.

Quest'ultimo risulta molto spesso l'approccio più adeguato nel fitting di curve CPMG, e inoltre presenta l'ulteriore vantaggio, rispetto al metodo precedente, che non è necessaria una conoscenza a priori del numero di componenti a diverso tempo di rilassamento con cui approssimare la curva sperimentale.

Il segnale NMR di decadimento associato ad una distribuzione continua di tempi di rilassamento è spesso espresso in letteratura come trasformata inversa di Laplace:

$$\tilde{s}(t) = \int_{\alpha_{\min}}^{\alpha_{\max}} \mathbf{P}(\alpha) e^{-\alpha t} d\alpha \quad (\text{eq. 2.23})$$

dove  $\alpha$  può essere la costante ( $T_i$ ) o la velocità di rilassamento (R), e  $P(\alpha)$  la relativa distribuzione.

La trasformata di Laplace è in realtà l'estensione della (2.22) nel caso di una distribuzione continua di costanti di decadimento, e rappresenta un caso particolare della classe più generale degli integra-

li di Fredholm del primo tipo, utilizzati nella descrizione sistemi eterogenei, che hanno la seguente forma generale:

$$\vec{s}(t) = \int_{\alpha_{\min}}^{\alpha_{\max}} \mathbf{P}(\alpha) f(t, \alpha) d\alpha \quad (\text{eq. 2.24})$$

dove la funzione  $f(t, \alpha)$ , detta kernel, tiene conto della variazione di particolari proprietà fisiche del sistema (come ad esempio le dimensioni dei pori, o la frazione di acqua legata).

Nel caso della trasformata di Laplace il kernel  $f(t, \alpha)$  assume la particolare forma  $\exp(-\alpha t)$

L'inversione della trasformata di Laplace permette di ricavare, a partire dai dati sperimentali  $s(t)$ , l'incognita  $P(\alpha)$  attraverso la minimizzazione di un'espressione generale del tipo:

$$\vec{s}(t) = \mathbf{K}\vec{p} + \varepsilon \quad (\text{eq 2.25})$$

dove  $\vec{s}(t)$  è il vettore dei dati sperimentali,  $\vec{p}$  è l'approssimazione discreta di  $P(\alpha)$ ,  $\mathbf{K}$  rappresenta la funzione di kernel  $f(t, \alpha)$  ed  $\varepsilon$  indica componenti di rumore non note a priori.

L'approssimazione della funzione di distribuzione  $P(\alpha)$  con una funzione a gradini è imposta dagli algoritmi numerici di quadratura utilizzati per risolvere il problema (2.25).

Nel caso della trasformata di Laplace del segnale NMR (espressa in funzione della generica costante di rilassamento  $T$  dopo un cambio di variabili) l'approssimazione discreta della distribuzione dei tempi di rilassamento nella scala logaritmica dei tempi porta ad un'espressione generale del tipo:

$$\vec{s}(t) = \sum_{j=1}^M \int_{T_j}^{T_{j+1}} g(T) e^{-\frac{t}{T}} dT \quad (\text{eq. 2.26})$$

In cui  $g(T)$  è la distribuzione dei tempi di rilassamento.

Il campionamento discreto comporta la difficoltà di dover ricostruire la stessa funzione continua di distribuzione  $P$  a partire da un set più limitato di dati sperimentali. Di conseguenza, il problema dell'inversione così formulato come nella (2.25), risulta in tal caso indefinito, in quanto ammetterebbe uno spettro ampio di soluzioni per  $\vec{p}$ .

Pertanto è necessario stabilizzare la soluzione del problema di inversione facendo ricorso in genere a metodi di regolarizzazione.

Diversi algoritmi presenti in letteratura prevedono quindi l'utilizzo di opportuni operatori di regolarizzazione utilizzati a questo scopo [111-115].

I più comuni softwares sviluppati in questi anni basati su algoritmi di regolarizzazione del problema di inversione della trasformata di Laplace sono il Contin, sviluppato da Provencher [116] e UPEN

[114, 116-119], quest'ultimo utilizzato in questo lavoro di tesi per ricavare le distribuzioni dei tempi di rilassamento trasversale (vedi risultati).

A questo scopo vengono introdotti nell'operazione di inversione opportuni vincoli di non negatività, resi necessari dall'esigenza di conservazione del significato fisico della funzione  $p$ , che è correlata alle ampiezze di popolazione, insieme con l'introduzione di determinati operatori di regolarizzazione nella formula. In tal modo l'espressione del problema di inversione assume quindi la nuova espressione generale:

$$p^* = \operatorname{argmin} [\|s - Kp\|_2^2 + \lambda \Phi(p)] \quad (\text{eq. 2.27})$$

dove  $\Phi$  è il particolare operatore di regolarizzazione, e  $\lambda$  è una costante positiva che garantisce la non negatività della distribuzione dei tempi di rilassamento.

La minimizzazione vincolata secondo il metodo dei moltiplicatori di Lagrange della (2.27) fornisce pertanto una soluzione unica e stabile per la distribuzione dei tempi di rilassamento.

La differenza fra gli algoritmi di inversione presenti in letteratura consiste sostanzialmente nella diversa scelta della particolare espressione analitica che assume l'operatore di regolarizzazione  $\Phi$ , l'approccio di risoluzione della (6) e del fattore moltiplicativo  $\lambda$ .

Da questi fattori dipende la capacità dell'algoritmo di inversione di approssimare nella maniera più realistica possibile la distribuzione dei tempi di rilassamento.

### **Il software UPEN (*Upwin 4.01*) [114, 116-119].**

Il software UPEN inverte il segnale NMR cercando la distribuzione quasi continua di tempi di rilassamento che approssima le curve sperimentali CPMG con il minor errore di fitting, secondo l'equazione  $I(2\tau n) = \sum_i I_0(T_{2,i}) \exp(-2\tau n/T_{2,i})$ , dove  $2\tau$  è il tempo di eco,  $n$  è l'indice dell'eco della CPMG, e  $I_0(T_{2,i})$  fornisce una distribuzione di segnali per ogni  $T_{2,i}$  estrapolata a  $\tau = 0$  (rilassogramma) e campionato logicamente fra  $T_{2,\min}$  e  $T_{2,\max}$  [120].

Il nome UPEN ("Uniform PENalty") deriva dalla capacità dell'algoritmo di regressione di bilanciare il grado di smoothing dei profili ricavati dall'inversione, grazie all'applicazione uniforme di un'opportuna funzione di penalty nell'espressione dell'operatore di regolarizzazione.

In questo modo sono evitati contemporaneamente eccessivi dettagli (picchi) non richiesti dal sistema nel caso di profili allargati e, allo stesso tempo, i picchi "reali" non subiscono un eccessivo smoothing. L'effetto complessivo di questo metodo di smoothing variabile è quello di mantenere volutamente bassa la risoluzione di profili di distribuzione ottenuti.

UPEN mette a disposizione dell'utente un'ampia serie di parametri di processamento delle curve sperimentali, i quali sono raggruppati in base alla diversa frequenza statistica con cui vengono modificati.

Nel set dei principali parametri di input modificati più frequentemente dall'utente figurano:

il numero complessivo di esponenziali (MI) con cui è possibile approssimare la distribuzione (fissato ad un valore predefinito di 100), il numero di punti sperimentali rigettabili all'inizio della curva sperimentale (ND), e il parametro di *compliance* beta000 (impostato di default a 1), che governa il grado di risoluzione dei profili di distribuzione: aumentando beta000, è possibile risolvere picchi non rivelabili per default.

I messaggi di output prodotti al termine del processamento permettono inoltre di eseguire una diagnosi sui risultati trovati, dando indicazioni sulla presenza di eventuali distorsioni e problemi di vario tipo nella curva sperimentale.

Per una trattazione più dettagliata si veda l'Appendice 1 (Parametri di input e messaggi di output di UPEN) .

## **Capitolo 3. Risultati e discussione.**

### **3.1. Studio delle mobilità protoniche delle componenti presenti nel chicco verde di caffè tramite NMR nel dominio dei tempi.**

Il metodo sviluppato per la determinazione simultanea del contenuto di umidità e lipidi nei chicchi verdi di caffè è basato sull'utilizzo della sequenza spin echo (descritta nel capitolo 1.4).

Allo scopo di una corretta applicazione di questa sequenza nella determinazione simultanea del contenuto di acqua e olio è necessario definire correttamente il tempo  $\tau$  tra l'impulso di  $90^\circ$  e quello successivo di  $180^\circ$ , in modo tale che il segnale di echo al tempo  $2\tau$  sia dovuto solo all'olio presente all'interno del campione e il contributo da parte dell'umidità sia trascurabile. Perché questa condizione sia soddisfatta è necessario che i tempi di rilassamento trasversale ( $T_2$ ) dell'acqua e dell'olio siano sufficientemente distanziati. L'indagine che viene di seguito descritta ha pertanto la principale finalità di chiarire la distribuzione dei tempi di rilassamento dell'acqua e dell'olio nel chicco verde in funzione di una corretta scelta del parametro tau nella sequenza spin echo.

Data la necessità, già sottolineata nel capitolo introduttivo di questa tesi, di approfondire la conoscenza della distribuzione dell'acqua nel chicco verde, particolare attenzione in questo lavoro è stata data allo studio di questa problematica, al fine di darne un'interpretazione in termini di mobilità protoniche.

A scopo di chiarezza la presentazione dei risultati relativi all'acqua e ai lipidi vengono trattate separatamente.

#### **3.1.1. Studio della mobilità e della distribuzione dell'acqua nel chicco verde di caffè mediante NMR nel dominio dei tempi.**

Lo studio della distribuzione dell'acqua nel chicco verde di caffè è stato condotto per mezzo di esperimenti di idratazione graduale di un chicco essiccato.

L'idratazione è stata ottenuta seguendo due diverse procedure: a) per esposizione in atmosfera di umidità controllata e b) per aggiunta manuale rispettivamente di  $H_2O$  e di  $D_2O$  fino a 35% (su base secca).

Le curve di rilassamento sperimentali ottenute sono state fittate con il metodo della trasformata inversa di Laplace mediante il software Upen allo scopo di ricavare i profili di mobilità dell'acqua.

Si è trovato che fino a 10% di idratazione l'acqua manifesta una mobilità piuttosto ridotta.

L'utilizzo della D<sub>2</sub>O ha infine evidenziato il contributo del meccanismo dello scambio chimico al segnale osservato.

In questo studio sono stati utilizzati chicchi verdi della specie Arabica (origine: Africa), appartenenti allo stesso lotto commerciale, sia senza trattamento (verdi tal quali) sia essiccati, oppure essiccati e successivamente reidratati.

La disidratazione dei chicchi è stata condotta in stufa ad una temperatura non superiore a 90 °C e in condizione di vuoto blando (circa 6 mmHg) per 8 giorni, al fine di essiccare il chicco evitando sia il danneggiamento dei carboidrati sia reazioni di imbrunimento non enzimatico.

Al termine del processo di essiccamento i chicchi sono stati quindi trasferiti in essiccatore e conservati fino al momento della misura.

Due campioni della specie Coffea Arabica di origine Brasile ed un campione di origine botanica diversa (C. Canephora Conillon, Brasile), di diverso contenuto di umidità sono stati inoltre analizzati per determinare la possibile influenza della matrice.

#### *Acquisizione e strategia di elaborazione dei dati.*

Le misure sono state realizzate mediante lo spettrometro Bruker Minispec mq20.

Per mantenere la temperatura desiderata di 25 (± 0.1) °C all'interno del probe è stato collegato un termostato all'apparecchio di misura.

La costante di rilassamento trasversale T<sub>2</sub> dei campioni è stata misurata utilizzando la sequenza di impulsi Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

In tutte le misure è stato utilizzato un impulso a 90° di 2.30 μs ed un tempo di eco (τ, i.e., il tempo di attesa tra l'impulso a 90° e quello a 180°) di 0.04 ms.

È stato inoltre impiegato un valore relaxation delay (RD) di 10 s per evitare la saturazione del segnale.

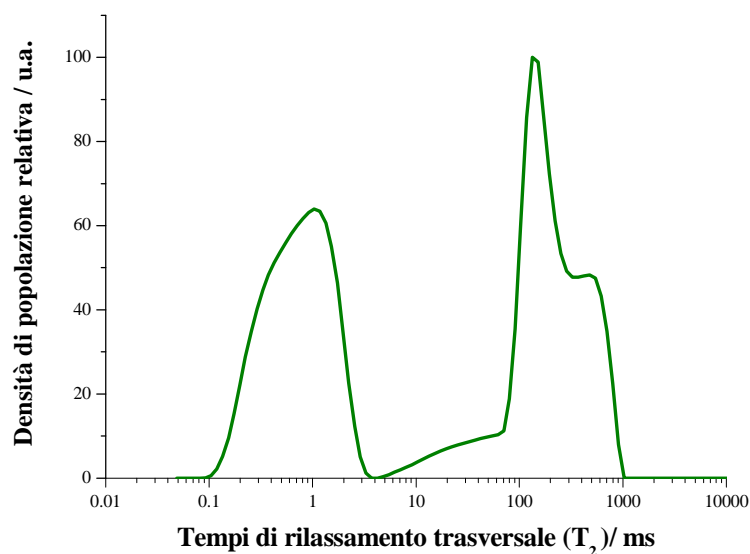
Per ogni CPMG sono stati acquisiti in totale 20000 punti, allo scopo di assicurare il decadimento asintotico della curva sperimentale.

La curva sperimentale è stata mediata su 1028 scansioni, al fine di realizzare il valore di soglia di 300 del rapporto segnale-rumore, come raccomandato per un'interpretazione realistica dei profili di rilassamento [120].

L'operazione di trasformata inversa di Laplace delle curve sperimentali è stata ottenuta mediante l'implementazione del software *Upwin 4.01* (sviluppato da P. Fantazzini e collaboratori)[114, 117-119]. I dati ottenuti sono stati ottenuti in triplicato.

Alcuni campioni sono stati riprodotti con un diverso rilassometro presso il laboratorio della prof.ssa Fantazzini al Dipartimento di Fisica dell'Università di Bologna.

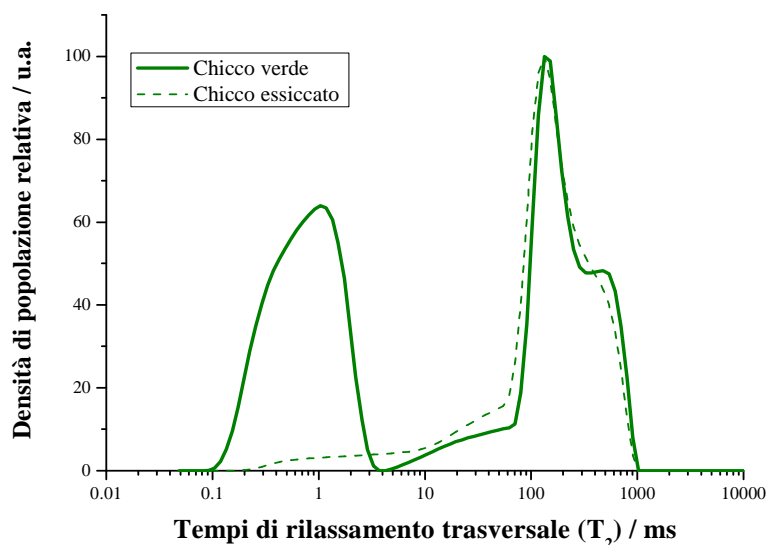
Lo studio della popolazione di mobilità protonica attribuibile all'acqua riguardante la regione dei  $T_2$  bassi viene presentata in questa sede. La regione a destra dello spettro, contenente la fase apolare (olio di caffè), viene invece descritta nel paragrafo .



**Fig. 3.1:** Distribuzione di  $T_2$  di un chicco verde.

Come si può notare in figura (sopra), il profilo complessivo risultante dall'applicazione della trasformata inversa di Laplace al chicco verde studiato è caratterizzato dalla presenza di una banda di distribuzione compresa nell'intervallo di tempi di rilassamento fra 0.1 e 3 ms circa e una seconda distribuzione, più estesa, nella regione di  $T_2$  alti (tra 30 e 1000 ms).

L'assegnazione della distribuzione di  $T_2$  relativa all'acqua è stata ottenuta confrontando il profilo ottenuto per un chicco di caffè verde con il corrispondente profilo dello stesso campione essiccato. Il risultato di questo confronto viene mostrato in figura 3.2 (sotto).



**Fig. 3.2:** Sovrapposizione del profilo Upen dei tempi di rilassamento di un chicco verde (linea continua) ed uno essiccato (linea tratteggiata).

Nella figura 3.2 si nota che la banda di distribuzione dei tempi di rilassamento compresa tra 0.1 e 3 ms risulta sensibilmente ridotta in intensità a seguito dell'essiccazione.

Questo confronto, ripetuto su una serie di chicchi verdi di lotti differenti, ha confermato le osservazioni fatte..

Il confronto fra il profilo di rilassamento del chicco verde con quello dello stesso chicco essiccato ci consente di assegnare la distribuzione di  $T_2$  nella regione tra 0.1 e 3 ms a protoni sia appartenenti a molecole d'acqua sia a protoni mobilizzati dalla presenza dell'acqua.

Infatti la sola popolazione protonica a decrescere a seguito dell'essiccazione è quella presente in questo intervallo di tempi di rilassamento.

In realtà, una più attenta analisi del rilassogramma del chicco essiccato in stufa (linea tratteggiata) mostra che a 0.2 ms il segnale è ancora visibile.

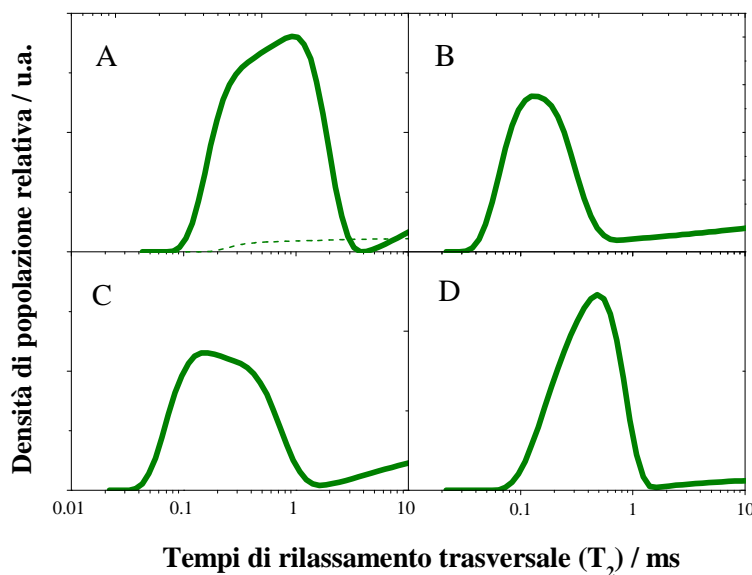
Una spiegazione possibile è che si tratti di una parte di molecole d'acqua residue non rimosse dal processo di essiccazione.

Questa ipotesi è stata verificata controllando la perdita di peso in stufa dei chicchi secchi e notando che il rilassogramma di un chicco torrefatto (che ha un contenuto acqua di circa 2%) si presenta analogo [30].

Una volta effettuata l'assegnazione della regione di rilassogramma relativa all'acqua, è stata quindi intrapresa un'indagine sistematica dei profili di distribuzione di  $T_2$  su una serie di chicchi verdi a diverso contenuto di umidità nota, scelti in base alla diversa varietà (Arabica e Robusta), sia in base alla diversa origine geografica.

Da qui in avanti viene mostrata a scopo di chiarezza solo la regione relativa all'acqua (0.01 ÷ 10 ms).

Nella figura 3.3 (sotto) sono riportati nei quattro diversi riquadri i profili di rilassamento di quattro chicchi verdi, selezionati a titolo di esempio in base al diverso contenuto di umidità, specie e provenienza geografica.



**Fig. 3.3** (sopra): Profili Upen di 4 chicchi di caffè di esempio a diverso contenuto di umidità nella regione 0.01 ÷ 10 ms.

- A (*C. arabica* Africa): 8.5%;
- B (*C. arabica* America Meridionale): 4.2%;
- C (*C. arabica* America Meridionale): 5.8%;
- D (*C. canephora* America Meridionale): 11.1%

Nel riquadro A è mostrato il profilo dello stesso chicco essiccato (linea tratteggiata)

Come si può notare in figura 3.3, i profili di distribuzione di  $T_2$  dell'acqua dei quattro chicchi di esempio appaiono abbastanza diversi fra loro. In particolare, le distribuzioni mostrate nei riquadri

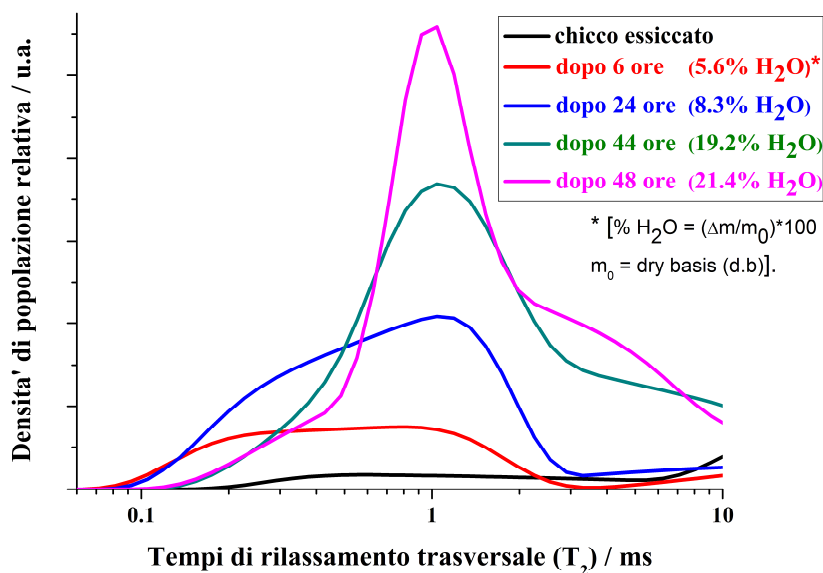
A, B e C sono più estese, mentre quella in B appare più stretta. Inoltre, soprattutto A e C manifestano una forma trapezoidale, che suggerisce la presenza di due diverse popolazioni di mobilità protonica, suggerita anche dall'analisi col programma Upen.

Allo scopo quindi di ottenere informazioni sulle mobilità protoniche all'origine dei profili delle distribuzioni di  $T_2$  osservati, e di trovare inoltre una possibile spiegazione della relazione fra questi e il corrispondente contenuto di umidità nei chicchi verdi, è stata quindi intrapresa un'investigazione basata sulla reidratazione graduale dei chicchi stessi a partire da essiccato.

La reidratazione è stata realizzata seguendo due diverse procedure.

Secondo il primo metodo di reidratazione un chicco di un lotto di origine Africa, precedentemente essiccato e pesato, è stato posto in essiccatore in presenza di una soluzione satura di  $KNO_3$  (RH 93%) per un determinato intervallo di tempo; appena prima della misura il chicco è stato accuratamente pesato e trasferito nel tubo NMR. Sono state quindi acquisite le curve sperimentali CPMG e i ricavati i corrispondenti profili della trasformata inversa di Laplace in funzione del tempo di esposizione all'umidità.

L'evoluzione dei profili di rilassamento ottenuti al passare del tempo sono mostrati in figura 3.4 (sotto).



**Fig. 3.4:** Dipendenza dei profili di rilassamento di un chicco essiccato dal tempo di esposizione in atmosfera di umidità controllata nella regione fra 0.01 e 10 ms. Il contenuto di acqua incorporata dal chicco è stata calcolato come variazione percentuale di peso rispetto al peso iniziale del secco.

Dalla figura sopra si nota che fra 0.1 e 3 ms una banda larga emerge nell'intervallo  $5 \pm 10\%$  di contenuto di umidità.

In particolare, al 5.6% di acqua adsorbita (corrispondente ad un tempo di esposizione all'umidità pari a 6 ore), questa distribuzione protonica appare come la somma di due componenti a diversa mobilità e uguale intensità (curva rossa).

Ad un livello di idratazione pari 8.3% di acqua adsorbita, ottenuto dopo un giorno intero, entrambe le componenti crescono in intensità, ma la più mobile (cioè a  $T_2$  maggiori) cresce maggiormente rispetto all'altra (curva blu).

A percentuali di acqua incorporata dal chicco superiori al 10%, realizzate rispettivamente dopo 44 e 48 ore di permanenza in essiccatore (profili verde e rosa), si nota che la banda centrata a 1 ms risulta predominante, mentre quella a  $T_2$  inferiori decresce.

Inoltre, nel profilo corrispondente ad un livello di idratazione pari a 21% di acqua compare una spalla a 4 ms.

Allo scopo di realizzare più facilmente livelli di idratazione superiori a quelli ottenuti nel precedente esperimento, ad un singolo chicco appartenente allo stesso lotto di Africa, precedentemente essiccato, è stata fatta una serie di aggiunte di quantità crescenti di acqua direttamente sulla superficie del chicco stesso.

In questo caso il processo di idratazione è stato condotto direttamente nel tubo NMR. Allo scopo di evitare possibili interferenze dell'aria durante il processo di idratazione del chicco, una bacchetta di teflon è stata inserita nel tubo stesso, e quest'ultimo è stato infine sigillato con del parafilm.

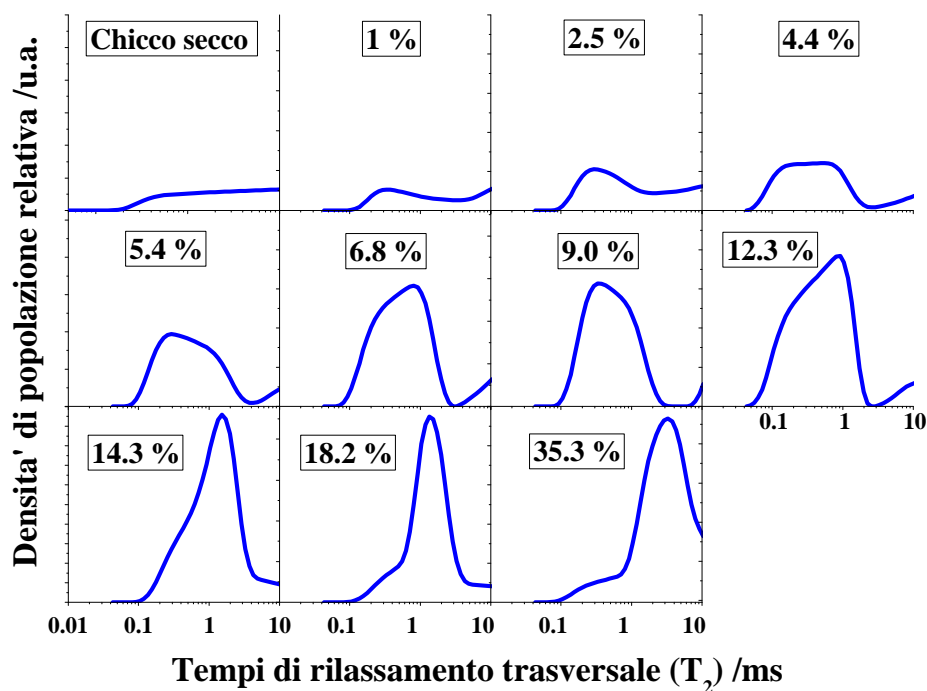
Al termine del processo di idratazione, analogamente a quanto fatto per l'esperimento di idratazione in umidità controllata, il chicco è stato accuratamente pesato e sottoposto a misura.

Il tempo minimo richiesto per il raggiungimento dell'equilibrio nel processo di idratazione è stato determinato monitorando l'intensità del segnale UPEN in funzione del tempo fino al raggiungimento di un valore costante per ciascuna percentuale di acqua aggiunta.

Un tempo di 4 ore è stato ritenuto sufficiente per tutti i livelli di idratazione realizzati.

In questa idratazione per aggiunta diretta di acqua sono state raggiunte percentuali di idratazione fino a 35% di variazione di peso su base secca.

I profili ottenuti sono mostrati nella figura sotto.



**Fig. 3.5:** Idratazione graduale per aggiunta diretta i quantità controllate di acqua ad un chicco essiccato.

Anche in questo caso, fino a 10% di contenuto d'acqua si può notare la crescita di una distribuzione di tempi di rilassamento che si estende tra 0.1 e 3 ms. Analogamente a quanto visto nell'esperimento di umificazione progressiva, la forma della distribuzione di popolazione suggerisce la presenza di due popolazioni di diversa mobilità.

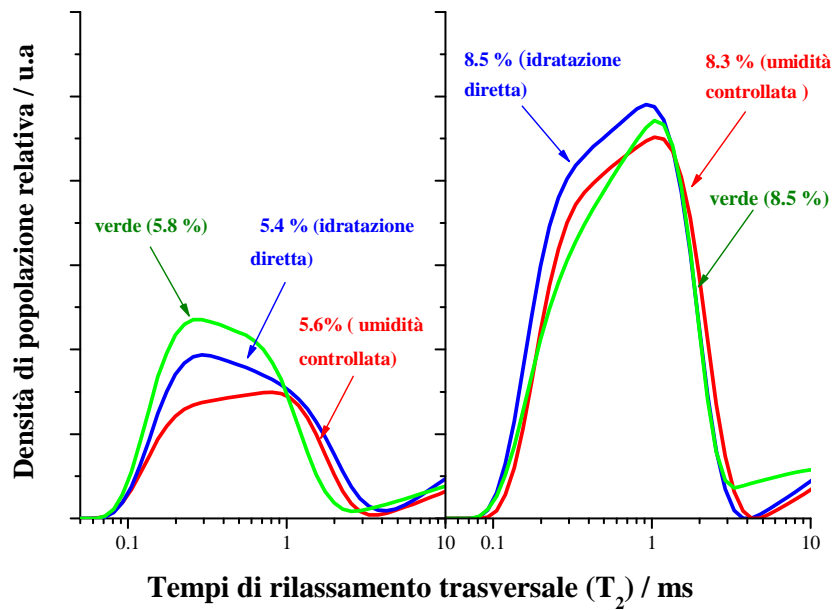
In particolare, la popolazione a rilassamento più rapido è già visibile a 2.5%, mentre una popolazione più lenta compare a 4.4% di acqua incorporata.

All'aumentare della quantità di acqua aggiunta la componente più mobile cresce in ampiezza e diventa dominante sopra il 14% di acqua.

A 35% è distinguibile una sola ampia distribuzione centrata a 3 ms. Una piccola spalla è ancora riconoscibile a  $T_2$  inferiori a 1 ms negli spettri dei livelli di idratazione 18% e 35% di acqua.

Allo scopo di valutare se la procedura di reidratazione dell'essiccato riesce a riprodurre efficacemente il chicco verde originale, una serie di chicchi a diverso contenuto di umidità sono stati confrontati con dei chicchi appartenenti allo stesso lotto essiccati e reidratati sia in umidità controllata sia per aggiunta diretta di acqua.

Nella figura 3.6 (sotto) vengono riportati due esempi dei vari confronti effettuati.



**Fig. 3.6:** Sovrapposizione dei profili ottenuti su chicchi verdi tal quali (linea verde), e reidratati rispettivamente mediante aggiunta diretta di acqua (linea blu), e per esposizione in umidità controllata (linea rossa).

Il confronto effettuato ha quindi portato alla conclusione che le distribuzioni di  $T_2$  ottenute sono sostanzialmente indipendenti dal particolare metodo di idratazione utilizzato; ciò significa che, a condizione che sia lasciato un tempo sufficiente per la completa reidratazione del chicco, l'aggiunta diretta di acqua ad un chicco preventivamente essiccato fornisce sostanzialmente lo stesso risultato dell'esposizione dello stesso all'umidità.

La paragonabilità dei profili del verde e i corrispondenti ottenuti con i due diversi metodi di idratazione permette inoltre di poter dire che la reidratazione di un chicco essiccato in generale è in grado di riprodurre efficacemente il profilo osservato nel verde.

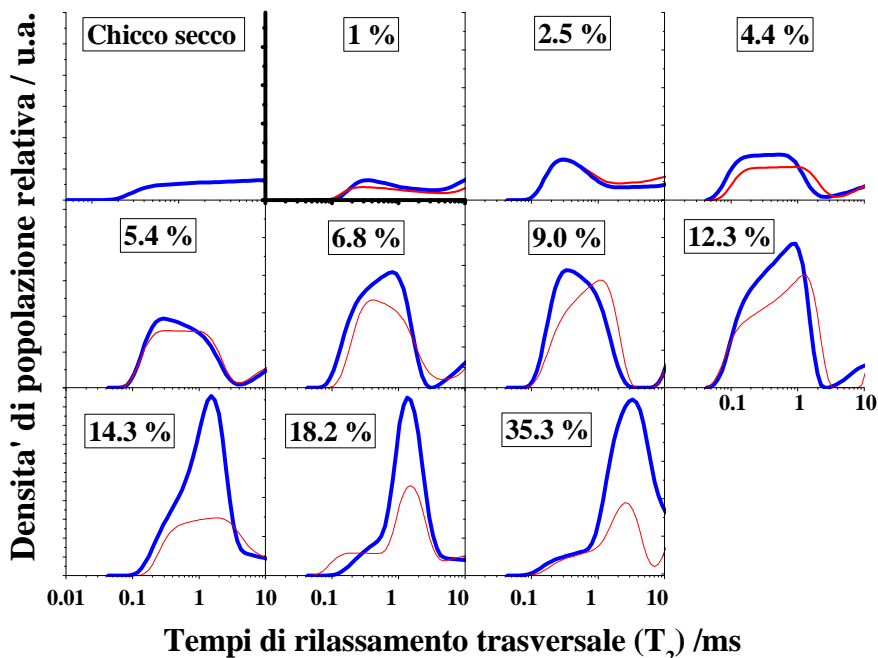
Successivamente l'esperimento di idratazione diretta è stato quindi ripetuto sostituendo l'acqua con l'acqua deuterata.

Il motivo dell'utilizzo dell'acqua deuterata è spiegabile con il fatto che a 20 MHz non dà segnale per il fatto che il deuterio non risuona a questa frequenza.

Pertanto, un eventuale comparsa di segnale potrebbe essere imputata a protoni non appartenenti a molecole di acqua.

I profili di rilassamento ottenuti con la  $D_2O$  sono stati successivamente confrontati con i corrispondenti ottenuti per aggiunta di acqua. L'equivalenza dei metodi di idratazione utilizzati, appena dimostrata, rende significativo il confronto tra l'idratazione diretta con  $H_2O$  e con  $D_2O$ .

I profili di rilassamento ricavati dall'idratazione con acqua deuterata sono stati sovrapposti a quelli dell'idratazione con acqua a scopo di facilitare il confronto (figura 3.7, sotto).



**Fig. 3.7** (sopra): Distribuzioni di  $T_2$  ottenute per idratazione di un chicco essiccato rispettivamente con  $H_2O$  (linea blu) e  $D_2O$  (linea rossa).

Nella fig. 3.7 e' possibile osservare che i profili ottenuti con la  $D_2O$  sono piuttosto simili ai corrispondenti ottenuti con  $H_2O$  a tutti i livelli di idratazione.

Inoltre, a valori inferiori a 10% di  $D_2O$  incorporata anche le ampiezze osservate sono decisamente confrontabili con quelle ottenute idratando con acqua.

Ciò indica che la  $D_2O$  è in grado di mobilitare una popolazione protonica simile rispetto all'acqua. A percentuali di idratazione maggiori le ampiezze ottenute con la  $D_2O$  sono inferiori a quelle trovate per reidratazione con acqua.

Questa evidenza suggerisce il fatto che non avvengono altri cambiamenti a carico dei protoni della matrice, e che quindi l'aumento del segnale è dovuto ai protoni dell'acqua aggiunta.

### *Discussione.*

L'analisi dei profili UPEN ricavati dagli esperimenti di idratazione graduale dei chicchi essiccati fornisce informazioni sulle mobilità delle diverse popolazioni protoniche presenti nel chicco.

I protoni visibili a seguito della reidratazione con acqua provengono in parte dall'acqua stessa, ma in parte sono rappresentati anche protoni della matrice solida, quest'ultima resa mobile sia per solubilizzazione di composti a basso peso molecolare che per mobilizzazione dei polisaccaridi.

Nel caso della D<sub>2</sub>O è possibile inoltre un meccanismo di scambio chimico.

In particolare, spostandoci da sinistra a destra in ogni rilassogramma, le popolazioni sono caratterizzate da mobilità protoniche crescenti. Le due componenti osservate dunque potrebbero rappresentare entità molecolari associate con diversa interazione alla matrice solida.

I nostri dati mostrano che la componente a rilassamento più lento cresce prima dell'altra più veloce, la quale compare al 4.4% di acqua inglobata.

Quest'ultima componente predomina sopra il 14% di idratazione, mentre fra 5 e 14% di acqua incorporata sono presenti entrambe.

Pittia e coll. hanno mostrato che nei chicchi di caffè l'acqua manifesta un effetto sia di antiplasticizzazione che di plasticizzazione in funzione del grado di idratazione [28].

In particolare, a valori inferiori ad un certo valore di attività  $A_w$ , in corrispondenza del quale si ha una transizione di fase, si nota un effetto di antiplasticizzazione.

Al contrario, sopra tale soglia di idratazione l'acqua presente nella matrice agisce da plasticizzante.

Nel caso dei chicchi verdi Pittia e coll. hanno trovato che l'intervallo critico di  $A_w$  è compreso tra i valori di 0.538 e 0.760, che corrispondono, rispettivamente, a 5% e 12.5% di contenuto d'acqua.

I nostri risultati indicano che, nel range citato, le componenti di popolazione protonica osservate sono presenti entrambe, mentre al di fuori di questo intervallo solo una di esse è visibile.

In accordo con le conclusioni di Pittia e coll, possiamo arguire che la componente a rilassamento veloce possa essere associata all'effetto macroscopico dell'antiplasticizzazione, mentre la componente a rilassamento lento si possa correlare all'effetto di plasticizzazione.

L'assegnazione delle popolazioni di mobilità protonica ad entità o ambienti molecolari specifici in relazione a proprietà meccaniche impartite dalla quantità di acqua presente nella matrice è tuttavia un argomento complesso.

Secondo quanto riportato in letteratura [29, 121], l'effetto di antiplasticizzazione è un fenomeno complicato dal concorso di diversi fattori correlati fra loro.

Seow e coll. concludono che, nel range di antiplasticizzazione, l'acqua è associata alla matrice polimerica.[121].

A basso contenuto di acqua (e.g. 2.5%), la mobilità ridotta della matrice solida e la presenza di protoni non derivanti dal solido può essere razionalizzata con la formazione di legami idrogeno supplementari fra le molecole di H<sub>2</sub>O e le pareti cellulari. Questo effetto, oltre che ridurre la mobilità del polimero, limiterebbe ancora la mobilità delle molecole d'acqua, che mostrano valori di T<sub>2</sub> appena sopra 0.1 ms.

A livelli di idratazione superiori, la banda che appare centrata a 3 ms si può giustificare con lo swelling delle pareti cellulari. Infatti, una volta che tutti i siti di idratazione disponibili sono stati occupati ed è stato completato un primo monolayer di molecole di H<sub>2</sub>O (che Pittia et al. hanno trovato in corrispondenza del 4.3%), le molecole di acqua iniziano a riempire gli spazi interfibrillari del reticolo polimerico, causando il rigonfiamento progressivo delle pareti cellulari e aumentano di conseguenza la propria mobilità rotazionale in ragione dei spazi maggiori resi disponibili.

All'aumentare dell'idratazione le molecole d'acqua del monolayer vengono incorporate in un ambiente più mobile e l'intensità della banda corrispondente decresce in intensità.

In questo intervallo di percentuale di umidità parte delle molecole presumibilmente concorrono nell'idratazione del citoplasma che in seguito all'essiccamento è parzialmente collassato, secondo quanto riportato in letteratura.

Quando il contenuto di acqua incorporata nel chicco raggiunge quello del chicco nativo, i profili di T<sub>2</sub> del chicco reidratato e del chicco nativo corrispondono.

Sopra il valore critico di 15% l'acqua ha un effetto plasticizzante, che risulta in uno shift a T<sub>2</sub> maggiori.

L'utilizzo della D<sub>2</sub>O ci ha permesso di confermare alcune conclusioni. L'efficacia della D<sub>2</sub>O è che, essendo inattiva all'NMR, il contributo di protoni della matrice può essere evidenziato per effetto dello scambio protonico o della mobilizzazione.

I profili ottenuti per idratazione rispettivamente con H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O sono decisamente sovrapponibili fino a 10% di idratazione, indicando che il tempo di equilibratura tra l'aggiunta della D<sub>2</sub>O e la misura è sufficiente per completare lo scambio protonico fra i protoni dell'acqua e quelli labili delle macromolecole della matrice.

La D<sub>2</sub>O è in grado di formare popolazioni di mobilità protonica attraverso lo scambio chimico, la solubilizzazione e/o lo swelling, analogamente all'acqua. Una volta terminati i protoni richiamati dalla matrice il segnale resta invariato.

I profili UPEN dei chicchi verdi (mostrati in figura) mostrano tutti una singola distribuzione a 0.5 ms, con alcune differenze nell'ampiezza e nella simmetria delle distribuzioni stesse.

Chicchi con contenuti di umidità più alti mostrano distribuzioni più ampie, anche se la correlazione non è così stringente.

Risulta interessante inoltre l'osservazione che campioni di varietà diverse e anche differenti specie manifestano lo stesso comportamento. Questo è in linea col fatto che le isoterme di adsorbimento della specie Arabica e Robusta sono paragonabili [28].

### **3.1.2. Cenni allo studio della mobilità e della distribuzione dei lipidi nel chicco verde di caffè mediante NMR a bassa risoluzione.**

L'assegnazione della restante regione del rilassogramma, ovvero quella compresa tra ~ 30 e 1000 ms in Fig. è stata ottenuta sia confrontando tra loro i profili ottenuti a seguito dell'essiccazione, e dell'essiccazione seguita da reidratazione con i rispettivi spettri del chicco tal quale, sia confrontando la distribuzione di mobilità ottenuta per il chicco verde con il relativo rilassogramma a temperatura ambiente ricavato dall'olio estratto dallo stesso campione.

Gli oli di caffè studiati sono stati estratti con il metodo Soxhlet.

I campioni di olio per le misure CPMG sono stati quindi preparati per sgocciolamento diretto nel tubo NMR senza ulteriore trattamento. I campioni introdotti nei tubi sono stati infine sottoposti ad una termalizzazione preliminare prima dell'esecuzione della misura allo scopo di cancellare la storia termica.

Analogamente a quanto fatto nello studio dell'acqua, i rilassogrammi sono stati ricavati dalla trasformata inversa di Laplace delle curve CPMG col software Upen.

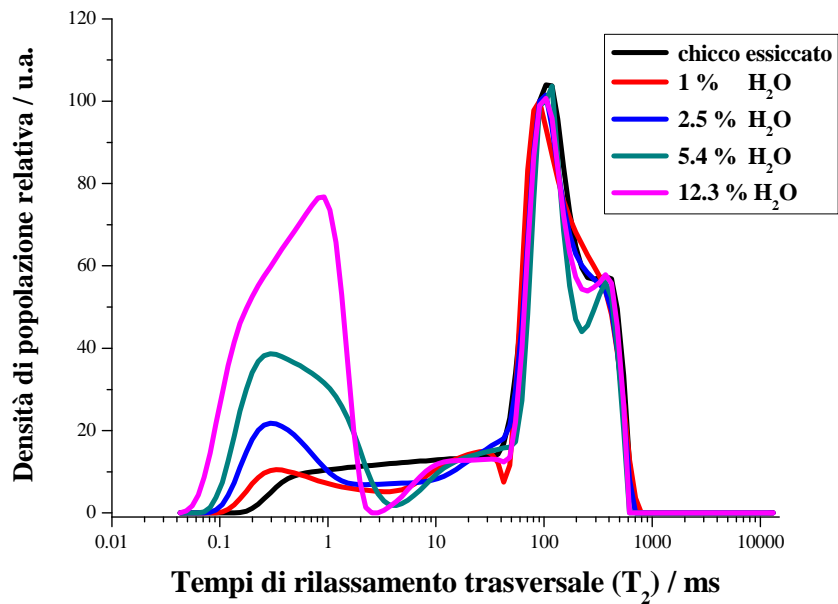
Le curve sperimentali ottenute per applicazione della sequenza CPMG sono state mediate su 64 scansioni; un recycle delay di 2 s è stato scelto per evitare la saturazione del segnale.

E' stato infine deciso di utilizzare un  $\tau$  di 0.08 ms per garantire l'andamento asintotico della curva limitando al contempo il più possibile la diffusione.

Nel primo tipo di esperimento per l'assegnazione della distribuzione di  $T_2$  della fase lipidica, un chicco, dello stesso lotto usato nei precedenti esperimenti sulla distribuzione dell'acqua, è stato essiccato nel modo consueto, ed è stato quindi reidratato manualmente fino ad ottenere diverse percentuali di acqua incorporata. Per ogni livello di idratazione la CPMG del chicco è stata invertita con UPEN.

Le condizioni di acquisizione delle CPMG sono analoghe a quanto visto nello studio delle mobilità protoniche dell'acqua.

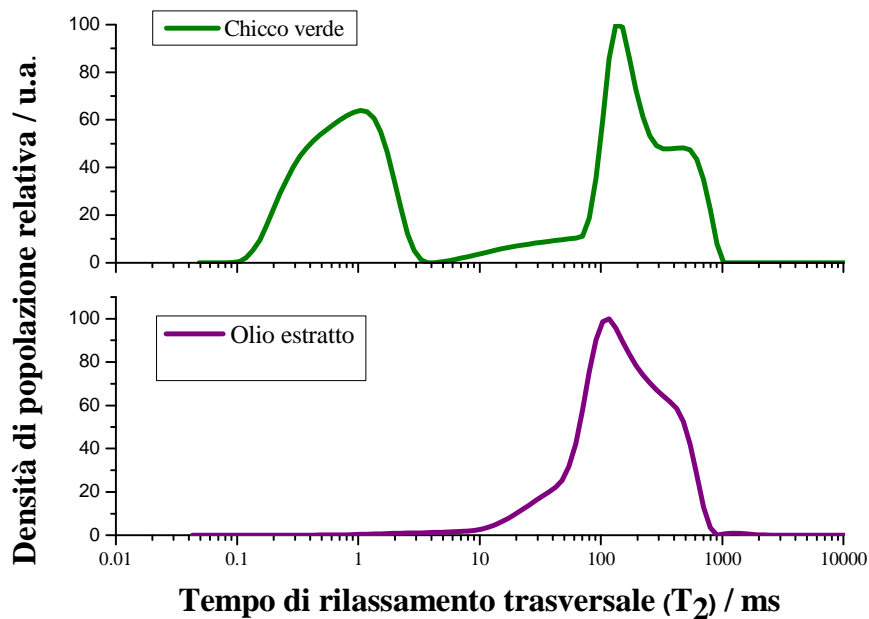
La sovrapposizione delle distribuzioni di  $T_2$  relative a ciascun livello di idratazione sono mostrate sotto (fig.3.8).



**Fig. 3.8** (sopra): Sovrapposizione degli spettri di  $T_2$  relative a ciascun livello di idratazione. Si nota che il profilo della parte destra del rilassogramma rimane sostanzialmente invariato a tutti i livelli di idratazione.

In fig. 3.8 (sopra) si può notare che le distribuzioni di  $T_2$  e le ampiezze dei profili nella regione terminale dello spettro, cioè compresa fra 10 ms ed 1000 ms, per ciascun livello di idratazione, sono paragonabili. Pertanto è stato ipotizzato che questa regione del rilassogramma sia assegnabile alla popolazione di mobilità protonica della fase lipidica del chicco.

In un esperimento alternativo a quello appena descritto il profilo di un chicco verde è stato confrontato con il rilassogramma ricavato dal corrispondente olio estratto (fig. 3.9 sotto)



**Fig. 3.9** (sopra): Profili di distribuzione di  $T_2$  rispettivamente del chicco verde ( riquadro superiore) e dell'olio fresco estratto dallo stesso campione ( riquadro inferiore).

Dalla figura sopra si può notare che la forma complessiva della distribuzione di  $T_2$  del chicco verde e dell'olio estratto sono confrontabili. La distribuzione di  $T_2$  dell'olio compare leggermente spostata a tempi inferiori. Ciò si può spiegare col fatto che, essendo il tau utilizzato nella misura dei lipidi (0.08 ms) leggermente maggiore di quello utilizzato per l'analisi del chicco verde, la conseguente influenza maggiore della diffusione può rendere conto perciò di questa lieve differenza di  $T_2$ .

Il risultato del confronto appena descritto rafforza pertanto la conclusione fatta in precedenza, secondo cui la popolazione di mobilità protonica da 10 a 1000 ms è riferibile alla fase lipidica.

L'evidenza che lo spettro del chicco verde e quello dell'olio estratto da esso manifestino tempi di rilassamento confrontabili risulta inoltre interessante. Infatti, sapendo che i lipidi si trovano compartimentati in vescicole (lipidosomi) delle dimensioni medie di  $\sim 1 \mu\text{m}$  [16], ci si potrebbe aspettare

che, per la maggiore capacità rotazionale delle molecole libere, i valori di  $T_2$  dell'estratto siano in genere più alti.

Le distribuzioni di  $T_2$  ottenute fanno quindi supporre che il cammino medio dei trigliceridi in una vescicola di un  $\mu\text{m}$ , non risenta del confinamento.

I nostri dati sono tuttavia in accordo con quanto sostenuto da Le Botlan ed Hèlie, secondo cui i profili di rilassamento TD-NMR nei semi vegetali e nei corrispondenti oli estratti sono generalmente caratterizzati dagli stessi  $T_2$  [122].

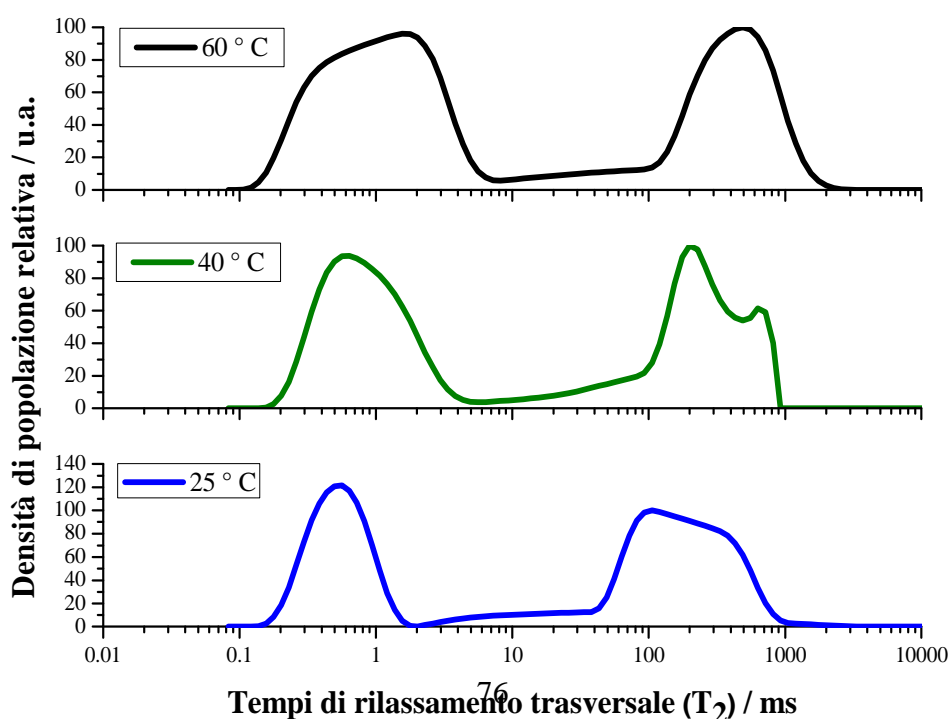
La seconda osservazione interessante è rappresentata inoltre dal fatto che la distribuzione di  $T_2$  trovata mostra un andamento sostanzialmente trimodale, che suggerisce la presenza di due principali mobilità protoniche distinte (rispettivamente a 110 e a 430 ms) ed una spalla, quest'ultima riscontrabile a tempi di rilassamento inferiori ( $\sim 30$  ms).

Allo scopo di confermare la veridicità dei profili multimodali dei lipidi, osservato sia nel chicco integro che nell'olio estratto, è stata indagata la dipendenza di entrambi dalla temperatura.

Le distribuzioni di  $T_2$  sia del chicco verde che dell'olio estratto sono state pertanto misurate a tre diverse temperature (25°C, 40°C e 60°C).

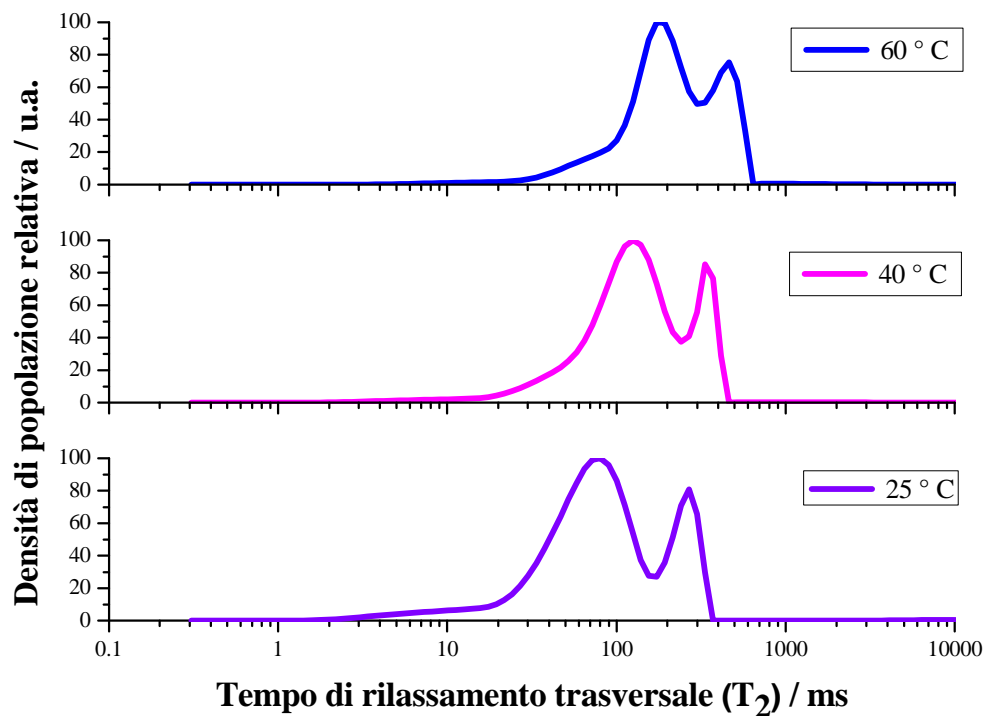
Prima di ogni misura i campioni sono stati preliminarmente equilibrati alle temperature desiderate in un apposito blocco termico; il termostato del probe è stato inoltre impostato alla stessa temperatura del blocco termico.

I risultati ottenuti per il chicco verde sono mostrati in figura 3.10, mentre lo studio termico del corrispondente olio di caffè estratto è illustrato nella figura 3.11.



**Fig. 3.10** (sopra): dipendenza dalla temperatura della distribuzione di mobilità protonica del chicco verde.

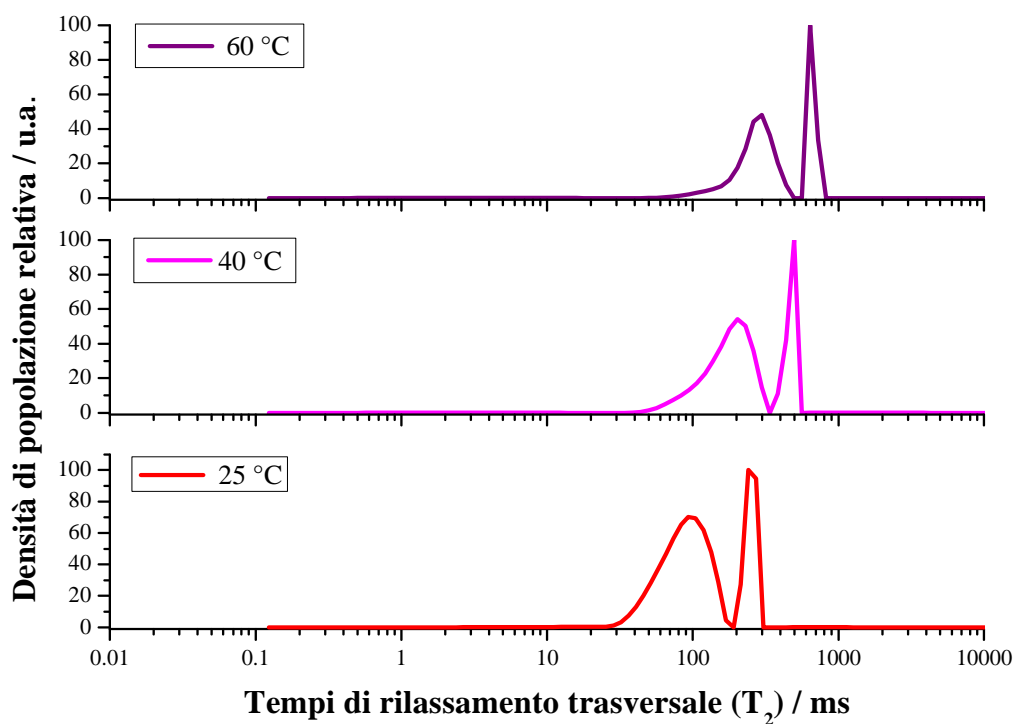
Nella figura sopra si può notare che la banda di  $T_2$  fra 0.1 e 3 ms relativa all'acqua mostra un profilo più stretto rispetto a quello di Fig., in quanto il tempo di echo di 0.08 ms (utilizzato in questo caso per ragioni di uniformità con le analisi degli oli) non è in grado di cogliere l'intero contributo della mobilità protonica. Il  $\tau$  maggiore ha inoltre l'effetto di spostare i  $T_2$  trovati a valori inferiori a quelli trovati con  $\tau = 0.04$  ms



**Fig. 3.11** (sopra): dipendenza dalla temperatura della distribuzione di mobilità protonica dell'olio di caffè estratto dallo stesso campione di Fig. 3.10.

Sono stati infine studiati, a scopo di confronto, i profili di mobilità degli oli estratti da altri lotti commerciali di caffè, e di altri oli vegetali in funzione della temperatura.

I dati ottenuti sono stati confrontati con la letteratura disponibile. Di seguito è riportato a titolo di esempio lo studio in temperatura dell'olio di oliva.



**Fig. 3.12:** studio in temperatura delle mobilità protoniche nell'olio di oliva.

La forma sostanzialmente bi- o tri-esponenziale con cui appare la popolazione lipidica sia nel chicco verde di caffè sia in tutti gli oli vegetali studiati rappresenta un'osservazione interessante e trova riscontro in alcuni lavori di letteratura.

Hèlie e Le Botlan affermano che generalmente gli oli vegetali presentano due principali tempi di rilassamento trasversale [122].

Nel caso particolare dell'olio di oliva a temperatura ambiente i valori di  $T_2$  da noi osservati sono inoltre in buon accordo con quanto riportato da questi stessi autori, secondo cui l'oliva a temperatura ambiente è caratterizzato da due componenti di rilassamento trasversale rispettivamente a 70 e 150 ms

Essendo il programma di elaborazione utilizzato non esente da possibili artefatti, è stato necessario in tutti questi esperimenti assicurarsi un livello massimo possibile di attendibilità dei dati sperimentali di partenza e analizzare con attenzione i messaggi di output su possibili anomalie di elaborazione prodotti da UPEN (cfr. Appendice II, Descrizione del software Upen).

Lo studio termico condotto sul chicco verde e sugli oli evidenziano sostanzialmente che la dipendenza dalla temperatura delle distribuzioni di rilassamento sono in accordo con quanto previsto da considerazioni teoriche, secondo cui il logaritmo naturale del  $T_2$  dipende linearmente dall'inverso della temperatura [122].

Le Botlan attribuisce all'origine del comportamento multiesponenziale della curva di rilassamento della magnetizzazione trasversale dei lipidi, sia negli oli liberi che nei semi, la presenza di differenti tipi di impaccamenti molecolari, a loro volta indotti dalla presenza e l'entità delle insaturazioni nelle catene dei trigliceridi. Secondo questi autori, nel caso di oli vegetali con una distribuzione omogenea delle catene degli acidi grassi esiste inoltre una correlazione lineare della velocità di rilassamento trasversale  $R_2$  ( $R_2 = 1/T_2$ ) con il numero di insaturazioni (NI) per molecola di trigliceride.

Il comportamento multimodale della distribuzione dei  $T_2$  nei lipidi è stato osservato e confermato infine anche da Chaland e Mariette nelle matrici casearie [123].

### **3.2. Sviluppo e applicazione di un metodo per la determinazione simultanea del contenuto di umidità e lipidi nel caffè verde mediante NMR nel dominio dei tempi.**

In questo paragrafo vengono descritte le prove sperimentali effettuate per la messa a punto del metodo proposto, ed i risultati ottenuti dall'applicazione del metodo stesso su una serie di 500 lotti di caffè verde.

Ai fini di un inquadramento di questo lavoro in un contesto industriale più ampio è utile specificare che, nonostante la metodologia descritta in questa sede sia stata progettata e finalizzata principalmente alla determinazione del contenuto di acqua e olio in campioni costituiti da chicchi di caffè verde, tuttavia ciò non preclude una possibile estensione della tecnica a matrici alimentari come semi vegetali di varia natura di interesse commerciale, aventi caratteristiche di composizione chimica e dimensioni particellari simili a quelle trattate.

In tal senso pertanto la matrice caffè verde, oltre a rappresentare il target prefissato dell'indagine, è stata utilizzata come modello chimico-fisico di riferimento e di confronto.

Con la stessa tecnica sono stati pertanto analizzati semi di soya, di vinaccioli e

I risultati ottenuti negli esperimenti condotti su questi semi vengono presentati a titolo di confronto nel paragrafo .

#### *Descrizione generale del metodo.*

La tecnica è stata realizzata mediante lo spettrometro Bruker minispec Mq20, equipaggiato con un probe per misure assolute da 18 mm (cfr. Appendice I, Descrizione del Minispec).

Il segnale NMR di ogni campione è stato ottenuto tramite l'applicazione della sequenza spin echo, già descritta nel paragrafo 1.4.1.

Come descritto in precedenza, per un  $\tau$  (tempo di attesa fra l'impulso a  $90^\circ$  e quello a  $180^\circ$ ) sufficientemente lungo (in questo caso 3.5 ms), le ampiezze dei segnali S1 ed S2 della curva sperimentale prodotta dalla sequenza spin echo possono essere considerate proporzionali rispettivamente alla quantità di protoni liquidi totali e protoni appartenenti alla fase olio; di conseguenza, la differenza (S1-S2) può essere attribuita alla quantità di protoni totali dell'acqua.

Il metodo prevede l'utilizzo di due distinte curve di calibrazione per determinare le percentuali di acqua e olio incognite nei campioni analizzati. Inoltre, alcuni campioni sono stati utilizzati come test set per prove di valutazione della performance del metodo.

Le due calibrazioni sono state realizzate nel seguente modo:

- a) *calibrazione per l'acqua*: è stata ottenuta diagrammando le intensità (S1-S2) specifiche (= segnale per unità di peso) di 8 lotti, scelti come standard, in funzione delle corrispondenti percentuali di umidità ottenute per gli stessi campioni mediante la procedura del calo peso secondo la metodica ISO 6673 ( );
- b) *calibrazione per l'olio*: i valori S2 specifici di 13 lotti, scelti come campioni di riferimento, sono stati diagrammati contro le percentuali di olio estrapolate per questi stessi campioni con il metodo delle aggiunte standard.

I campioni utilizzati nello sviluppo del metodo sono costituiti in chicchi integri di caffè verde sia della specie Arabica che di Robusta, appartenenti ai lotti commerciali contrassegnati coi seguenti codici:

a) Per la determinazione contenuto di olio:

- campioni utilizzati per la calibrazione:
  - ✓ “prima serie”: 1 ÷ 8
  - ✓ “seconda serie”: (4 lotti del Brasile e uno dell’India): 119432 ; 920325; 120543; 123107; 123507);
- test set della determinazione dell’olio (tutti lotti del Brasile) 124139; 123733; 124561; 124595; 124232;

b) per la determinazione contenuto di umidità:

- campioni per la calibrazione:
  - ✓ terza serie: 2; 4 ÷ 8; 119432; 920325; 120543; 123107;
- test-set per le determinazioni di umidità: 3; 123507; 124139; 124561; 124232;

#### Procedura generale delle misure.

Per ogni campione una quantità di chicchi (~ 3.5 g), accuratamente pesata, è stata introdotta nel tubo di misura e questo collocato nello spazio campione della sonda tra i poli del magnete. L’applicazione Bruker utilizzata per l’implementazione della sequenza spin echo è “*m\_o\_norm.app*”(cfr. appendice Descrizione Minispec).

Parametri di acquisizione.

Il set di parametri di acquisizione adottati per questi esperimenti è il seguente:

- NS (numero di scansioni) = 16
- RD = 2 s,
- RG = 60 dB
- DS = 0.

La curva sperimentale dei campioni analizzati è stata riportata direttamente su foglio elettronico Excel (selezionando “Copy as data” nella maschera di controllo) e i valori S1 ed S2 sono mediati nei seguenti intervalli di campionamento nella scala dei tempi:

- Intervallo di campionamento di S1:  $0.0475 \div 0.0525$  ms
- Intervallo di campionamento di S2:  $6.975 \div 7.025$  ms

Fase preliminare dello sviluppo del metodo: ottimizzazione dell'apparato strumentale e scelta delle condizioni di lavoro.

Determinazione dell'altezza di posizionamento del tubo NMR e della quantità ottimale di campione

La determinazione dell'altezza di posizionamento del tubo di misura è stata necessaria allo scopo di fare coincidere il più possibile il campione con il centro del magnete, in modo da effettuare le misurazioni nelle condizioni di massima sensibilità strumentale (Fig. ).

Per stabilire il limite entro il quale la misura può essere considerata quantitativa e' stato invece valutato l'intervallo di linearità del segnale strumentale.

Per questo particolare tipo di misure è stato utilizzato del caffè verde macinato, allo scopo di ridurre gli spazi interstiziali nel volume occupato dal campione. Come segnale NMR di riferimento è stata utilizzata l'intensità a  $50 \mu\text{s}$  (S1).

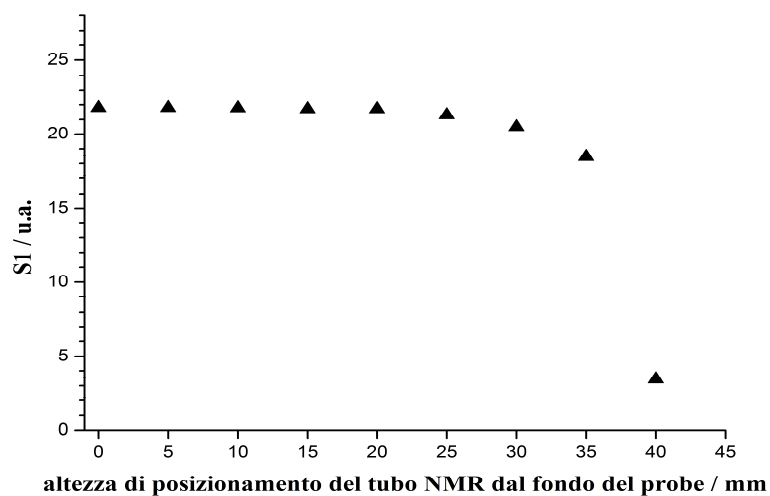
Le stesse prove, indispensabili per il probe assoluto da 18 mm in quanto di recente acquisizione, sono state ripetute per il probe relativo da 10 mm (utilizzato per misure di rilassometria). A scopo di confronto vengono pertanto descritte in questa sezione le prove di ottimizzazione eseguite per entrambi i probes.

In entrambi i test di ottimizzazione del set up strumentale sono stati adottati i seguenti parametri:

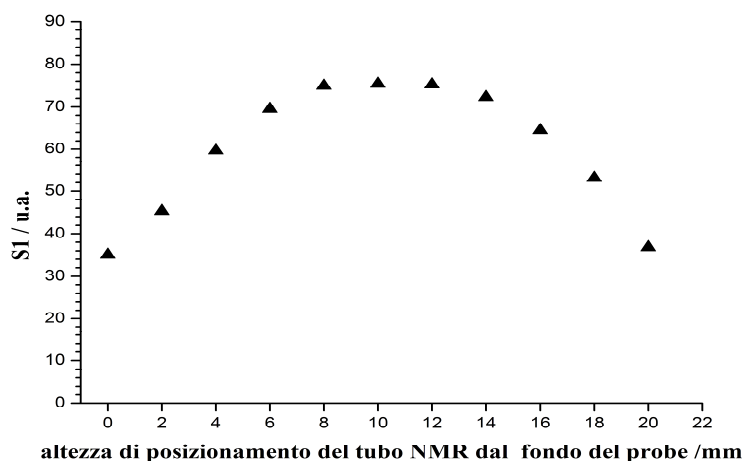
- NS (numero di scansioni effettuate) = 16
- RD (*Recycle Delay*) = 2 s;
- RG (*Receiver Gain*, amplificazione del segnale che raggiunge il ricevitore) = 60 dB
- DS (numero di scansioni a vuoto) = 0;

Per la determinazione dell'altezza di posizionamento del tubo NMR nel probe relativo è stata usata una quantità di campione pari ad un riempimento di 10 mm di caffè verde macinato; nel caso del probe assoluto per realizzare la stessa quantità di campione è stato sufficiente un riempimento corrispondente ad un'altezza di 5 mm.

Nelle Figure () e () sono riportati valori del segnale S1 in funzione della quota di posizionamento del tubo a partire dalla base dell'alloggiamento per i ciascuno dei due probes.



**Fig. 3.13:** Dipendenza del segnale S1 dall'altezza di posizionamento del tubo NMR dal fondo del probe da 18 mm (misure assolute)



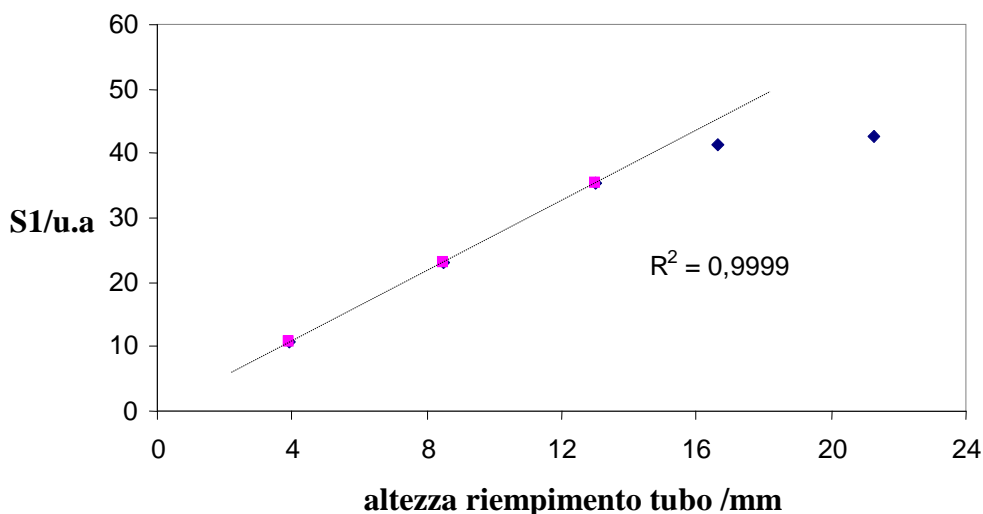
**Fig. 3.14:** Dipendenza del segnale S1 dall'altezza di posizionamento del tubo NMR dal fondo per il probe da 10 mm (misure relative)

Come si può notare dai grafici, nel caso del probe relativo il segnale raggiunge un massimo per un'altezza del tubo che va da 8 a 12 mm; nel probe assoluto il segnale S1 è costante fino ad una quota di 25 mm, oltre la quale subisce un sensibile calo.

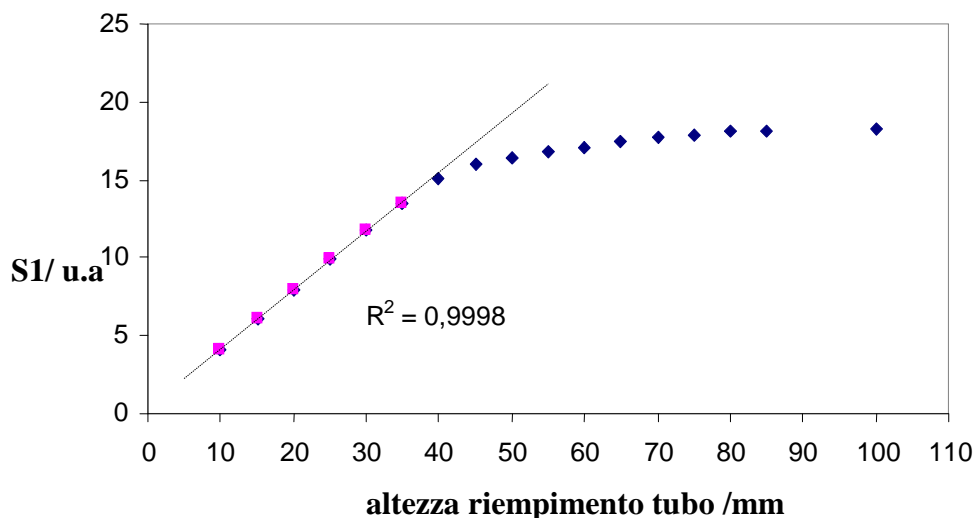
Questi dati hanno portato a stabilire un'altezza di posizionamento di 9 mm dal fondo dell'alloggiamento per il probe relativo, mentre nel caso del probe assoluto da 18 mm il tubo NMR è stato collocato direttamente sul fondo.

Una volta stabilite le altezze di posizionamento del tubo di misura per ciascun probe, è stata verificata la quantità massima di riempimento di campione in grado di produrre una risposta lineare del segnale NMR.

Questa prova è stata effettuata monitorando l'intensità del segnale S1 in funzione dell'altezza di riempimento del tubo NMR. I dati ottenuti da questo secondo test sono mostrati nelle figure () e ().



**Fig. 3.15:** Dipendenza del segnale S1 in funzione della quantità di campione per il probe relativo a 9 mm dalla base dell'alloggiamento.



**Fig. 3.16:** Andamento del segnale in funzione della quantità di campione (probe assoluto).

Per il probe relativo si nota una dipendenza lineare tra l'intensità di S1 dall'altezza del campione tra 0 e circa 13 mm. Il comportamento lineare nel caso del probe assoluto è invece registrato tra 0 e 40 mm.

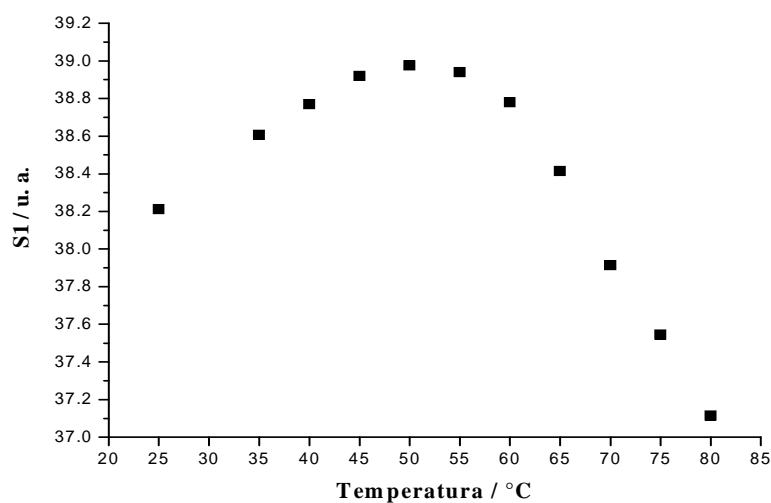
*Scelta della temperatura di lavoro per il probe assoluto.*

L'obiettivo della quantificazione dell'olio con questa tecnica ha reso necessaria la determinazione preliminare della temperatura a cui effettuare le misure.

Da letteratura è noto infatti che nei chicchi di caffè una frazione lipidica (detta "coffee wax", che ammonta a circa % del totale della frazione lipidica) è presente come cera superficiale, allo stato solido a temperatura ambiente (cfr. Introduzione).

Affinchè il segnale prodotto dall'olio comprenda anche questo contributo di lipidi è necessario capire quindi a quale temperatura viene mobilizzato il coffee wax.

A questo scopo è stato condotto uno studio della dipendenza del segnale S1 dalla temperatura (riportato sotto nella figura ).



**Fig. 3.17:** dipendenza del segnale S<sub>1</sub> dalla temperatura. L'aumento del segnale da 25 a 50 °C potrebbe indicare la mobilizzazione delle cere superficiali conosciute come "coffee wax".

Come si può notare nella figura , il segnale NMR presenta un massimo a circa 50°C. Una possibile interpretazione è che fino a tale temperatura l'andamento della curva sia principalmente determinato dalla progressiva mobilizzazione delle cere superficiali; oltre i 50° il calo della curva può essere spiegabile con l'effetto predominante di evaporazione dell'acqua del chicco.

L'esito di questa indagine tuttavia ha determinato la decisione di effettuare le misure a temperatura ambiente, nonostante questo implichi una riduzione del segnale S1 del 2%.

A fronte di tale perdita di segnale si riducono tuttavia in questo modo i tempi di analisi, in quanto a temperatura ambiente non è richiesta una termostatazione preliminare del campione.

È stato verificato che una variazione di temperatura di  $\pm 5$  °C causerebbe un errore intorno allo 0.5%, ritenuta non tale da compromettere l'accuratezza della determinazione.

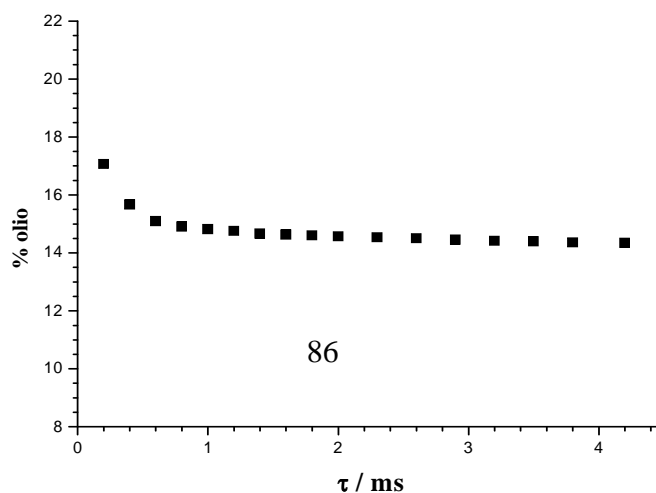
#### *Determinazione del $\tau$ ottimale per l'applicazione della sequenza spin-echo.*

Come è già stato precisato, affinché la determinazione simultanea del contenuto di acqua e olio con la sequenza spin-echo sia corretta è necessario definire il tempo  $\tau$  di separazione tra l'impulso di 90° e l'impulso di 180°, in modo tale che al tempo  $2\tau$  il segnale sia dovuto solo all'olio presente all'interno del campione e il contributo da parte dell'umidità sia trascurabile.

A questo proposito, i risultati ottenuti nell'indagine svolta sulla distribuzione dei tempi di rilassamento nei chicchi verdi di caffè, descritti nel precedente paragrafo (), hanno portato alla conclusione che nel chicco di caffè l'intervallo di distribuzione dell'acqua si estende da 0.1 a circa 1 ms. In base a tali esperimenti, per essere certi che la magnetizzazione trasversale dovuta all'acqua sia trascurabile sarebbe sufficiente un tempo  $\tau$  di poco maggiore a 1 ms.

Come ulteriore conferma, di seguito viene riportato un utile esperimento per capire il valore del minimo  $\tau$  adatto da utilizzare nella sequenza spin echo.

In questo esperimento, realizzato per mezzo della stessa sequenza di spin echo, una serie di curve di calibrazione è stata costruita a diversi  $\tau$  aggiungendo quantità crescenti di olio puro di caffè su del cotone; il contenuto di olio di un campione di caffè verde (a concentrazione di umidità e olio note) è stato poi determinato per regressione inversa dell'intensità dell'echo (S2) ai diversi valori di  $\tau$  per mezzo delle curve di taratura ottenute. Dal grafico mostrato in fig si può notare che, per valori di  $\tau$  inferiori a 1.6 ms, il segnale rifocalizzato dell'echo risulta sovrastimato per il contributo dell'acqua presente nel campione.



**Fig. 3.18:** dipendenza della percentuale di olio in funzione del  $\tau$  utilizzato.

L'esito dell'esperimento, insieme con i risultati ottenuti per la distribuzione dei  $T_2$  di acqua e olio, ha pertanto determinato la decisione di utilizzare un  $\tau$  di 3.5 ms.

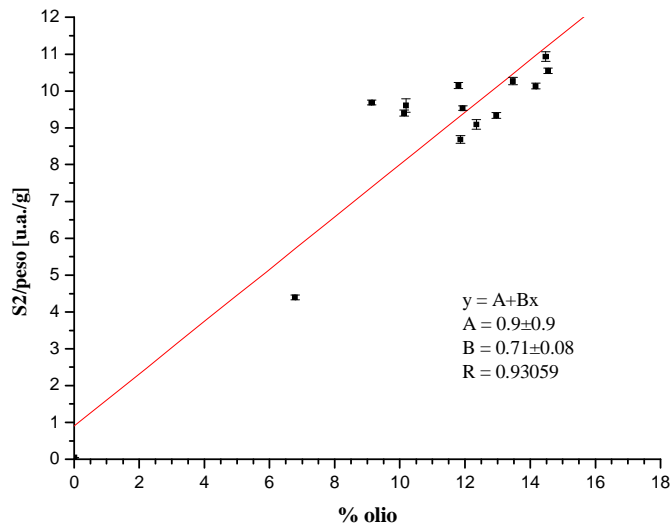
### **Costruzione della retta di calibrazione per il contenuto di olio.**

Una prima calibrazione per l'olio è stata costruita con 13 lotti di caffè la cui percentuale di olio è stata misurata dalla ditta committente per determinazione gravimetrica dopo estrazione Soxhlet.. per questa nuova calibrazione sono stati utilizzati inizialmente i lotti appartenenti alla prima e seconda serie (cfr. )

### **Selezione preliminare dei campioni.**

In Fig. è mostrata la curva di calibrazione ottenuta utilizzando inizialmente tutti i tredici campioni appartenenti alla prima e seconda serie.

Per ogni lotto sono stati misurati cinque diversi campioni costituiti da circa 3.5 g di chicchi di caffè (corrispondenti a ~ 30 mm di altezza nel tubo NMR). Il segnale prodotto da un tubo vuoto è stato usato come origine nella retta di taratura



**Fig. 3.19:** curva di calibrazione ottenuta utilizzando tutti i 13 campioni a contenuto noto di olio della prima e seconda serie fornite dall'azienda.

Il coefficiente di correlazione (R) non soddisfacente (in quanto inferiore al valore di 0.95, raccomandato ai fini di una corretta calibrazione della retta ottenuta ha condotto alla formulazione di due ipotesi circa la causa:

- il metodo è sensibile alla natura del chicco;
- le percentuali di olio dichiarate per alcuni standard non sono corrette.

Al fine di verificare la prima ipotesi, sono stati indagate le distribuzioni dei tempi di rilassamento trasversale con UPEN; in questa indagine non sono state riscontrate differenze significative nei  $T_2$  di questi lotti.

Questo risultato ha fatto decadere quindi la prima ipotesi.

L'evidenza che i campioni 1,2,3,4 e 6 si discostano notevolmente dalla curva di calibrazione fa decadere allora la prima delle ipotesi formulate e supporre che non tutte le percentuali di olio fornite siano corrette.

Al fine dunque di verificare questa seconda ipotesi per ogni campione è stata preparata una curva di calibrazione attraverso la procedura del *weight variation* (cfr Appendice III).

La scelta di adottare tale strategia è stata dettata dal fatto che essa si presta particolarmente bene ad individuare rapidamente un eventuale valore non corretto nelle percentuali dichiarate. Secondo il *weight variation*, per ogni lotto considerato, il segnale  $S_2$  ottenuto dallo strumento normalizzato per una massa di riferimento  $m_R$ , viene diagrammato in funzione della quantità crescente di campione

moltiplicata per la percentuale di olio nota (quest'ultima ottenuta con un metodo di riferimento standard).

Ricordando che il segnale strumentale  $S_2$  è funzione della percentuale di olio realmente contenuta nel chicco, si può scrivere:

$$\text{segnale olio} = k_s \cdot \frac{m_i \cdot H_{VERA}}{m_R} \quad (\text{eq. 3.1})$$

dove  $k_s$  è una costante strumentale,  $m_R$  è una massa intermedia presa come riferimento e  $H$  è contenuto di olio vero del campione, come percentuale in massa.

Di conseguenza, il coefficiente angolare della retta risultante ( $\Delta y/\Delta x$ ) assume la forma:

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{k_s \cdot \frac{\Delta m_i \cdot H_{VERA}}{m_R}}{\frac{\Delta m_i \cdot H_{DICHIARATA}}{m_R}} \quad (\text{eq. 3.2})$$

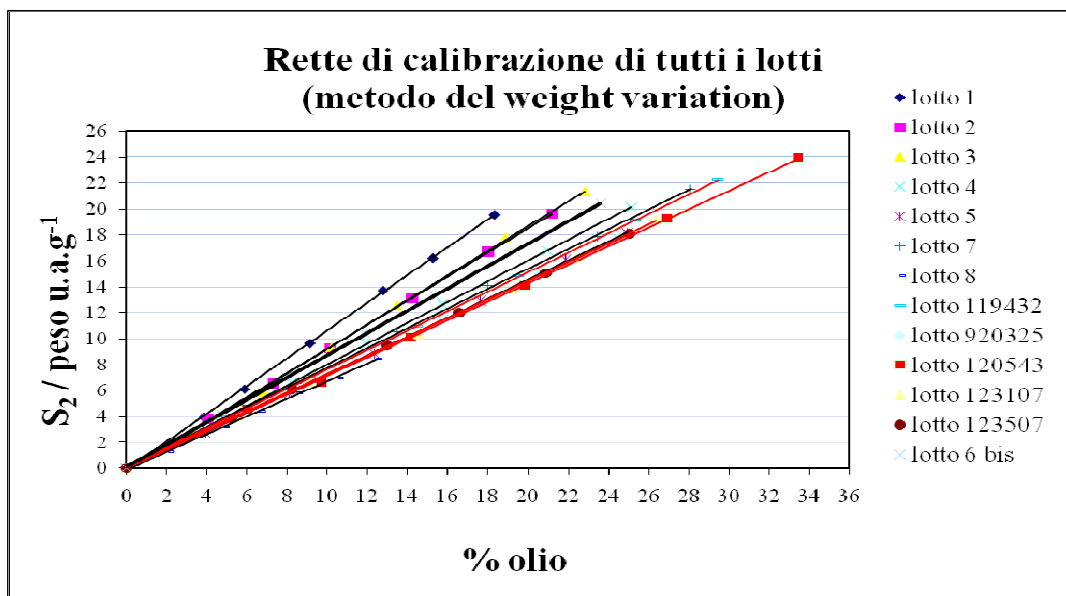
dove  $H_{DICHIARATA}$  è contenuto di olio dichiarato, come percentuale in massa, del campione di calibrazione, determinato con il metodo di riferimento.

Se la percentuale vera e quella dichiarata coincidono si comprende che la pendenza si riduce ad una costante del valore di  $k_s$ , uguale per ogni lotto.

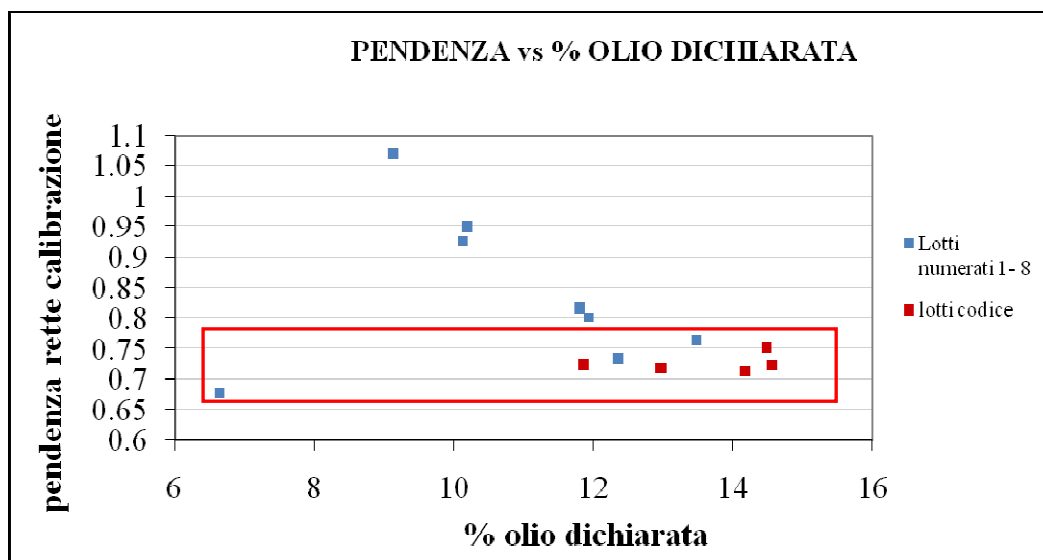
Qualora non vi siano errori nelle percentuali dichiarate, ci si aspetta quindi che le pendenze delle curve di calibrazione ricavate siano uguali tra loro.

Una percentuale di olio dichiarata maggiore di quella vera causa una diminuzione della pendenza osservata, mentre una sottostima del contenuto di olio determina un aumento di tale pendenza.

In figura sono riportate le 13 curve di calibrazione ottenute con tale metodo, effettuando sei aggiunte per ogni campione.



**Fig. 3.20 (sopra):** calibrazione ottenute utilizzando il metodo weight variation. I lotti della seconda serie (rette di calibrazione rosse) mostrano pendenze confrontabili tra loro mentre le curve di calibrazione dei campioni della prima serie (in nero) presentano un intervallo di pendenze molto ampio.

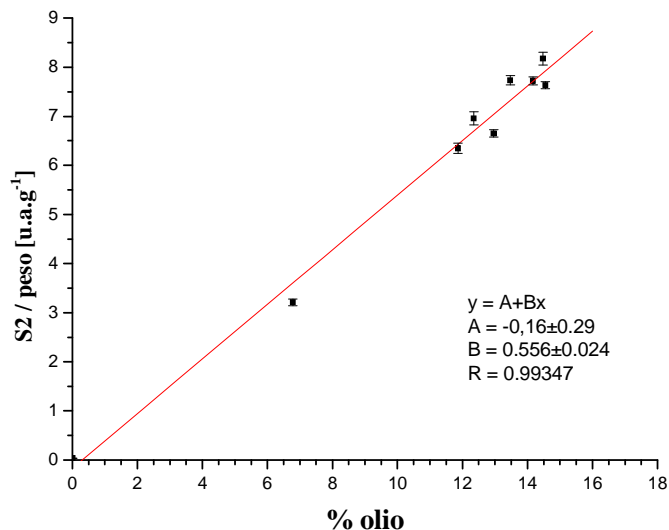


**Fig. 3.21 (sopra):** plot delle pendenze del fascio di rette ricavate con il metodo del weight variation; in blu sono mostrati i lotti della prima serie (numerati da 1 a 8), in rosso quelli della seconda serie (lotti con codice: 119432, 920325, 120543, 123107, 123507). Il rettangolo rosso evidenzia e raggruppa le pendenze confrontabili.

L'analisi dei diagrammi costruiti ha portato a selezionare otto fra i tredici lotti di caffè per la costruzione di una nuova curva di calibrazione: i campioni 5, 7, 8 appartenenti alla prima serie, insieme con tutti i campioni della seconda serie (119432, 920325, 120543, 123107, 123507).

**Curva di calibrazione con gli otto lotti selezionati.**

Una nuova curva di calibrazione (riportata in Fig.3.21) è stata pertanto costruita utilizzando gli otto lotti selezionati a seguito dell'indagine appena descritta.



**Fig. 3.22:** retta di calibrazione costruita diagrammando le medie delle intensità dei segnali  $S_2$  normalizzate per il peso degli otto lotti scelti contro le relative percentuali di olio dichiarate. Ciascun punto rappresenta la media di 5 misure su quantità di campione di circa 3.5 g.

### Determinazione del contenuto di olio nei campioni del test set con la retta costruita con gli otto lotti selezionati.

CAMPIONE	% OLIO DICHIARATA (da estrazione Soxhlet)	ERRORE DICHIARATO	% OLIO Minispec	ERRORE
124139	14.4	0.1	14.5	0.4
123733	12.9	0.1	12.5	0.4
124561	14.9	0.1	14.6	0.4
124595	14.1	0.1	14.2	0.4
124232	14.2	0.3	13.8	0.4

**Tabella3.1:** valori di percentuale olio ottenuti mediante la curva di calibrazione.

### Controllo della ripetibilità della calibrazione in funzione del tempo

Il valore della pendenza della retta di taratura è stato sottoposto a controlli settimanali per tre settimane tenendo fisse tutte le condizioni di acquisizione. I risultati sono riportati in Tabella 3.

TEMPO TRASCORSO	PENDENZA	ERRORE	INTERCETTA	ERRORE
<i>tempo zero</i>	<b>0.535</b>	0.026	-0.2	0.3
<i>7 giorni</i>	<b>0.534</b>	0.025	-0.2	0.3
<i>14 giorni</i>	<b>0.532</b>	0.027	-0.2	0.3
<i>21 giorni</i>	<b>0.534</b>	0.025	-0.2	0.3

**Tabella 3.2:** parametri delle curve di calibrazione costruite nelle quattro sessioni di misura condotte in funzione del tempo.

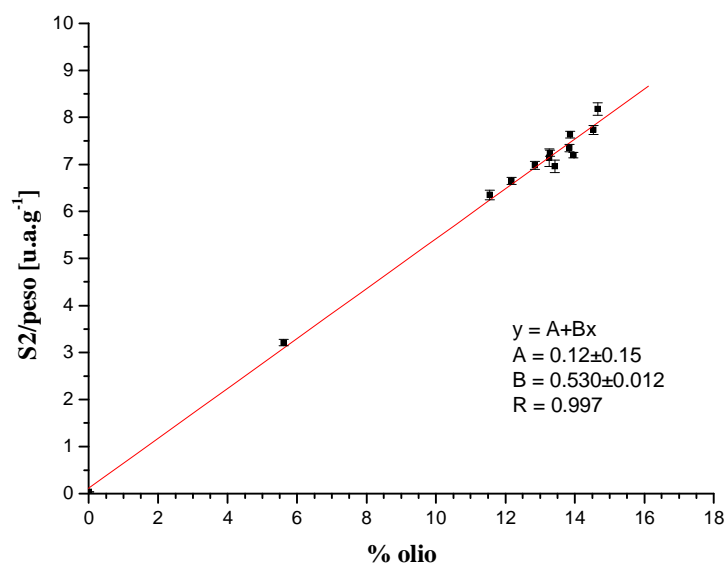
**Secondo tipo di calibrazione: retta di calibrazione in funzione delle percentuali di olio estrapolate mediante aggiunte standard.**

Allo scopo di sviluppare un metodo di calibrazione indipendente dalle percentuali di olio ricavate dall'estrazione Soxhlet, per ciascuno dei lotti della prima e seconda serie sono state effettuate cinque aggiunte di olio di caffè direttamente sui chicchi verdi. Le percentuali di olio estrapolate con il metodo delle aggiunte standard per i tredici i campioni delle serie in questione (Tabella ) sono state quindi utilizzate come nuovi valori di ascissa nella costruzione di questo nuovo tipo di curva di calibrazione (illustrata in Fig.). Il campione 3 è stato scartato in base al test statistico di Dixon per gli outliers (*Miller and Miller*).

CAMPIONE	% OLIO DICHIARATA (da estrazione Soxhlet)	ERRORE DICHIARATO	% OLIO (aggiunte standard)	ERRORE
<i>1</i>	9.1	0.4	13.28	0.28
<i>2</i>	10.1	0.6	12.86	0.21
<i>3</i>	10.2	0.2	13.26	0.27
<i>4</i>	11.9	0.1	13.96	0.23
<i>5</i>	12.4	0.3	13.43	0.21
<i>6</i>	11.8	0.1	13.84	0.26
<i>7</i>	13.5	0.2	14.54	0.29

8	6.8	n.d.	5.61	0.06
119432	14.5	0.1	14.7	0.3
920325	11.9	0.2	11.6	0.3
120543	14.2	0.1	13.24	0.29
123107	14.6	0.2	13.9	0.3
123507	13.0	0.1	12.18	0.21

**Tabella 3.3:** confronto tra i valori di percentuale di olio ottenuti per estrazione e con il metodo delle aggiunte standard.



**Fig. 3.23** (sopra): curva di calibrazione ottenuta in funzione dei valori estrapolati mediante aggiunte standard utilizzando 12 campioni.

### Determinazione del contenuto di olio nei campioni del test set con la curva di calibrazione in funzione delle aggiunte standard.

Nella tabella sotto riportata sono mostrate le percentuali di olio per i cinque campioni incogniti ricavate utilizzando la curva di calibrazione con i dodici punti di figura 3.23.

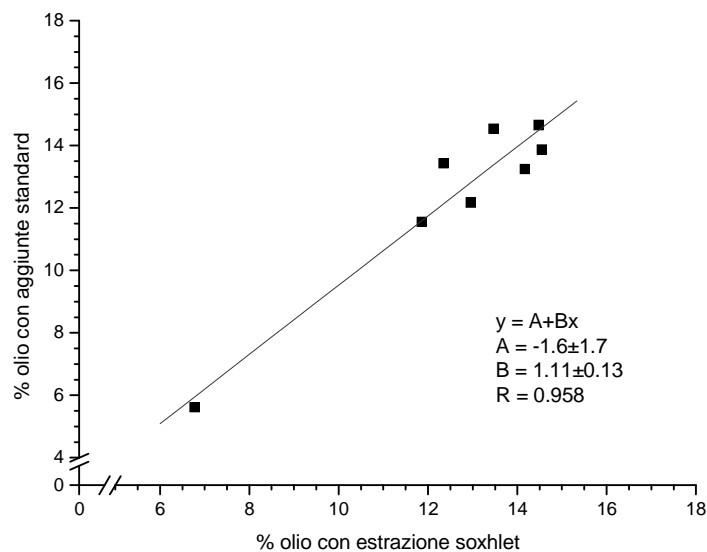
CAMPIONE	% OLIO DI-CHIARATA (da estrazione Soxhlet)	ERRORE DI-CHIARATO	% OLIO (ricavata con calibrazione con valori Soxhlet)	ERRORE	% OLIO (ricavata con calibrazione con valori aggiunte standard)	ERRORE
124139	14.4	0.1	14.5	0.4	14.71	0.29
123733	12.9	0.1	12.5	0.4	12.65	0.26

124561	14.9	0.1	14.6	0.4	14.81	0.30
124595	14.1	0.1	14.2	0.4	14.38	0.28
124232	14.2	0.3	13.8	0.4	13.93	0.27

**Tabella 3.4:** confronto tra i dati ottenuti con le due diverse curve di calibrazione e con il metodo di estrazione Soxhlet.

La tabella evidenzia l'equivalenza dei valori ottenuti con le due calibrazioni. Si riscontra un errore leggermente inferiore con il metodo delle aggiunte standard.

Per ulteriore verifica dell'equivalenza dei valori ottenuti per estrazione Soxhlet e mediante calibrazione in funzione dei valori estrapolati con le aggiunte standard, le percentuali trovate sono state diagrammate in figura (sotto).



**Fig. 3.24:** grafico di verifica dell'equivalenza dei metodi di estrazione Soxhlet e retta di taratura in funzione dei valori estrapolati da aggiunte standard.

### Determinazione del contenuto di umidità

#### Preparazione dei campioni a contenuto noto di umidità

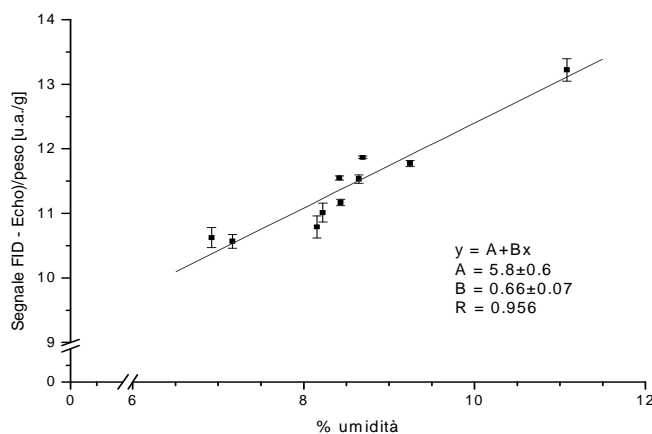
Il contenuto di umidità di riferimento è stato ottenuto determinando l'umidità dei dieci campioni della terza serie mediante calo peso, in accordo con la metodica ufficiale contemplata nella norma ISO 6673. I risultati sono riportati in Tabella .

<i>CAMPIONE</i>	<i>% UMIDITA'</i>	<i>ERRORE</i>
<b>2</b>	8.4	0.3
<b>4</b>	8.69	0.15
<b>5</b>	8.42	0.05
<b>6</b>	7.17	0.08
<b>7</b>	6.92	0.04
<b>8</b>	11.1	0.4
<b>119432</b>	8.16	0.13
<b>920325</b>	9.25	0.11
<b>120543</b>	8.65	0.09
<b>123107</b>	8.23	0.06

**Tabella 3.5:** valori di umidità ottenuti per i dieci campioni mediante essiccazione in stufa. Per ogni campione sono state eseguite tre determinazioni.

### Costruzione della curva di calibrazione per l'umidità.

La curva di calibrazione ottenuta diagrammando la differenza  $S_1-S_2$  dei segnali specifici ponderati per il peso dei campioni (u.a./g) contro le percentuali di umidità dei dieci lotti appartenenti alla terza serie (Fig. 11).



**Fig. 3.25** (sopra): curva di calibrazione ottenuta utilizzando i dieci campioni. Per ogni campione sono state analizzate cinque diverse aliquote contenenti ognuna circa 3.5 g di chicchi di caffè.

La retta ottenuta non passa per l'origine. La spiegazione di ciò può risiedere nel fatto che il segnale  $S_1-S_2$  è sensibile a tutto il contenuto di acqua presente nel campione, mentre la determinazione dell'umidità per essiccazione in stufa è in grado di rilevare solo l'acqua più accessibile.

### **Determinazione del contenuto di umidità nei campioni del test set.**

L'affidabilità della curva di calibrazione è stata verificata attraverso un test set, determinando il contenuto di umidità di cinque campioni sia mediante essiccazione in stufa per 16 ore a 105 °C, sia mediante Minispec (Tabella).

I valori di umidità ottenuti mediante NMR sono stati ricavati utilizzando la curva di calibrazione di figura.

<b>CAMPIONE</b>	<b>% UMIDITÀ<sup>a</sup> calo peso</b>	<b>ERRORE</b>	<b>% UMIDITÀ<sup>a</sup> Minispec</b>	<b>ERRORE</b>
<i>3</i>	9.45	0.23	10.52	0.30
<i>123507</i>	8.86	0.21	8.26	0.25
<i>124139</i>	8.08	0.11	8.11	0.25
<i>124561</i>	7.35	0.27	7.37	0.26
<i>124232</i>	7.48	0.08	7.54	0.26

**Tabella 3.6:** confronto tra i dati ottenuti con la calibrazione al Minispec e quelli ottenuti per essiccazione in stufa.

### **Studio dell'effetto della composizione dell'olio usato nelle aggiunte standard.**

Nel metodo appena descritto le percentuali di olio usate come valori di ascissa per la retta di calibrazione sono state ottenute operando delle aggiunte standard sui tredici lotti scelti per la calibrazione. Per effettuare tali aggiunte è stato usato dell'olio estratto fresco da un campione di caffè appartenente ad un lotto differente da quelli utilizzati come standard.

Sapendo che il segnale NMR è linearmente dipendente dalla quantità di protoni totali, e di conseguenza il segnale di echo S2 dipende dalla composizione chimica della fase lipidica, si può dunque comprendere che, effettuando su uno stesso campione aggiunte standard con oli di diversa composizione, il dato estrapolato di conseguenza potrebbe variare.

Allo scopo di stimare l'entità di tale eventuale variazione, su di uno stesso lotto di chicchi verdi di caffè appartenenti al lotto 119432 (dal contenuto in olio di 14.48 %) sono state fatte una serie di cinque aggiunte standard con oli di diversa natura vegetale.

Il segnale NMR S2 è stato quindi diagrammato in funzione delle quantità aggiunte.

Il contenuto di olio ottenuto in ciascun caso è stato infine confrontato col dato di percentuale di olio dichiarata. I risultati di questo test sono riportati nella tabella sottostante:

<b>Tipologia di olio vegetale</b>	<b>Valore estrapolato medio*</b>	<b>Dev std</b>
<b>Olio di caffè (lotto 120960)</b>	14.38	0.8
<b>Olio di caffè (lotto 700858)</b>	14.94	0.2
<b>Olio di caffè (lotto 123507)</b>	14.75	0.1
<b>Olio di mais</b>	13.78	0.2
<b>Olio di girasole</b>	13.33	0.4
<b>Olio di soya</b>	13.45	0.1

(\*Valori ottenuti come media di tre determinazioni)

**Tabella3.7:** Valori medi di % olio ottenuti per estrapolazione col metodo delle aggiunte standard su uno stesso lotto di caffè usando oli diversi.

I dati riportati in tabella indicano che usando oli di semi vegetali diversi dal caffè il risultato ottenuto è, in media, inferiore di un unità rispetto alla percentuale dichiarata.

I valori estrapolati utilizzando alcuni oli di caffè appartenenti a lotti commerciali e origini geografiche diverse rientrano invece in un range di scarto inferiore rispetto al valore ricavato dall'estrazione (con l'unica eccezione del lotto 120960, che è associato ad un errore maggiore).

Allo scopo di chiarire la composizione media in acidi grassi è stata inoltre condotta un'analisi gascromatografica su alcuni campioni fra i lotti a disposizione (cfr. Appendice IV, analisi gascromatografica dell'olio di caffè).

### Applicazione del metodo per la determinazione simultanea di acqua e olio a semi diversi dal caffè.

Nella tabella sottostante vengono riportati i risultati dell'applicazione del metodo a semi di interesse commerciale.

Campione	dimensioni (Ø mm)	olio			umidità			errore	
		% olio dichiarata	errore % olio dichiarata	% olio trovata <sup>1</sup>	% umidità dichiarata	errore umidità dichiarata	% umidità trovata <sup>1</sup>	errore %	umidità trova- ta
A	5 ÷ 7	14.4	0.1	14.7	0.3	8.6	n.d	8.2	0.5
B	5 ÷ 7	12.9	0.1	12.6	0.3	9.0	n.d	8.3	0.5
C	5 ÷ 7	14.9	0.1	14.8	0.3	8.5	n.d	7.4	0.5
D	5 ÷ 7	14.1	0.1	14.4	0.3	n.d	n.d	10.5	0.5
E	5 ÷ 7	14.2	0.3	13.9	0.3	6.9	n.d	7.5	0.5
Semi di vinaccioli	1 ÷ 3	16.0	n.d	16.7	0.3	n.d	n.d	3.1	0.5
Mais	3 ÷ 5	4.2	n.d	3.6	0.2	n.d	n.d	8.3	0.5
Soya gialla	~ 5	13.1	n.d	19.9	1.0	n.d	n.d	13.0	1.2

(<sup>1</sup> media di 3 determinazioni)

**Tabella3.7:** valori percentuali ottenuti per matrici diverse dai chicchi di caffè verde.

**Risultati della determinazione simultanea delle percentuali di acqua e olio di 500 lotti di caffè verde di diversa provenienza geografica continentale.**

La determinazione del contenuto percentuale di acqua e olio è stata effettuata su 500 campioni di diversa origine geografica; le percentuali ottenute sono state mediate sulla base della provenienza geografica continentale e sottoposte ad ANOVA secondo i due differenti metodi di Tukey e Fischer, i cui risultati sono riportati rispettivamente nelle tabelle 3.8a e 3.8b, mostrate sotto.

In entrambi i casi i test sono stati condotti con un livello di confidenza  $\alpha = 95\%$ . Inoltre, per la vasta estensione geografica il Brasile è stato considerato alla pari di un continente.

<b>Categoria: provenienza geografica</b>		<b>Gruppi</b>	
<b>Africa</b>	<b>14.547</b>	<b>A</b>	
<b>Brasile</b>	<b>13.519</b>	<b>B</b>	
<b>Sud America</b>	<b>13.381</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Oceania</b>	<b>13.377</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Centro America</b>	<b>12.995</b>		<b>C</b>
<b>Asia</b>	<b>11.758</b>		<b>D</b>

**Tabella 3.8 (a).** Risultati dell'ANOVA sulle percentuali di olio ottenute dall'analisi dei 500 campioni (Tukey test, valore critico 4.03).

<b>Categoria: provenienza geografica</b>		<b>% olio media</b>	<b>Gruppi</b>	
<b>Africa</b>	<b>14.547</b>	<b>A</b>		
<b>Brasile</b>	<b>13.519</b>	<b>B</b>		
<b>Sud America</b>	<b>13.381</b>	<b>B</b>		
<b>Oceania</b>	<b>13.377</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	
<b>Centro america</b>	<b>12.995</b>		<b>C</b>	
<b>Asia</b>	<b>11.758</b>			<b>D</b>

**Tabella 3.8 (b):** risultati ottenuti con gli stessi dati della tabella 3.8a dell'ANOVA con il test di Fischer.

Le tabelle riportate sopra mostrano che in ciascuna delle due varianti di ANOVA adottate (metodo di Tukey e di Fischer) la percentuale di olio ricavata con il metodo sviluppato è in grado di fornire una buona clusterizzazione delle diverse provenienze geografiche su base continentale.

In particolare si può notare che, indipendentemente dalla particolare variante del test utilizzato nell'ANOVA, i campioni di Africa ed Asia, essendo caratterizzati da percentuali di olio sensibilmente differenti, vengono attribuiti a gruppi distinti (A e D); i campioni provenienti da Brasile, Sud America e Oceania, caratterizzati da una percentuale intermedia rispetto ad Africa ed Asia possono, a seconda del tipo di test utilizzato, essere raggruppati in B o C. Il modello di ANOVA con il test di Fischer in particolare fornisce una discriminazione piuttosto netta fra tutti i continenti.

### **3.3. Determinazione dell'origine geografica del caffè verde mediante NMR ad alta risoluzione.**

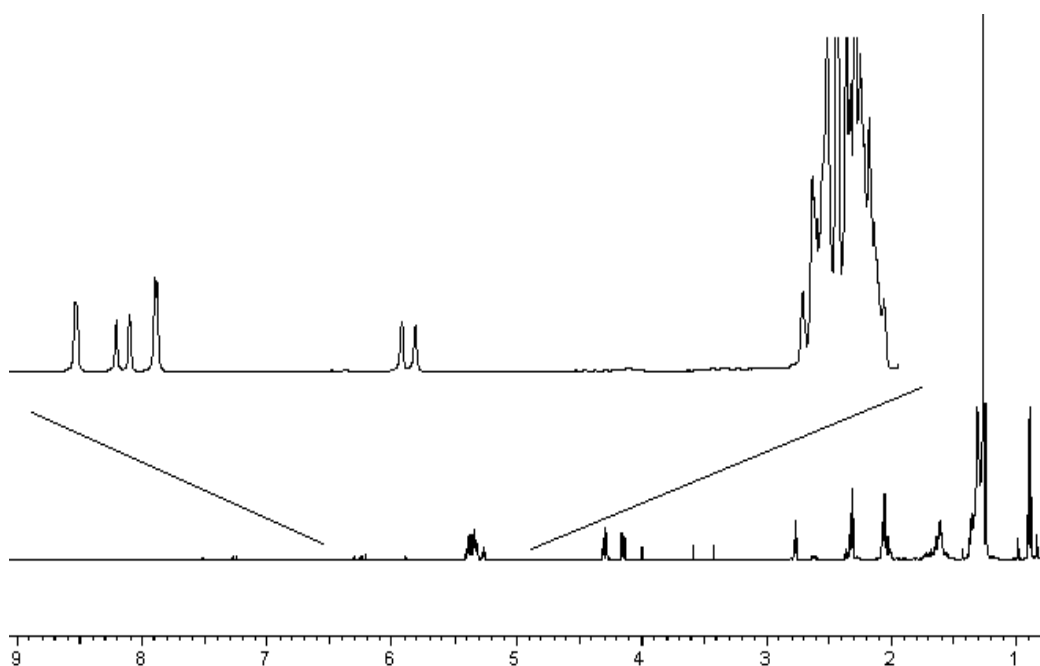
In questo lavoro sono stati analizzati, mediante la tecnica di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), gli estratti in cloroformio e gli estratti acquosi di caffè verde proveniente da diverse parti del mondo. Degli estratti organici sono stati acquisiti e studiati sia gli spettri protonici che quelli al carbonio mentre della fase acquosa sono stati considerati gli spettri al protone.

#### **3.3.1. Assegnazione degli spettri della fase organica.**

Molti studi recenti si sono concentrati sull'analisi, mediante risonanza magnetica nucleare, dei trigliceridi presenti in oli vegetali; in particolare sull'analisi degli acidi grassi nonché sulla loro distribuzione tra le varie posizioni della catena del glicerolo. Lo spettro protonico dell'estratto organico del caffè presenta intensi segnali degli acidi grassi e segnali meno intensi di componenti minoritari (figura). L'assegnazione delle risonanze degli spettri monodimensionali al  $^1\text{H}$  e al  $^{13}\text{C}$  è stata possibile grazie a dati di letteratura (Sacchi, 1997, Vlahov, 1999, Mannina, 1999 e Bosco, 1999) e tramite delle aggiunte di trigliceridi standard quali trioleina, trilinoleina e trilinolenina.

##### **3.3.1.1. Assegnazione dello spettro $^1\text{H}$ in $\text{CDCl}_3$**

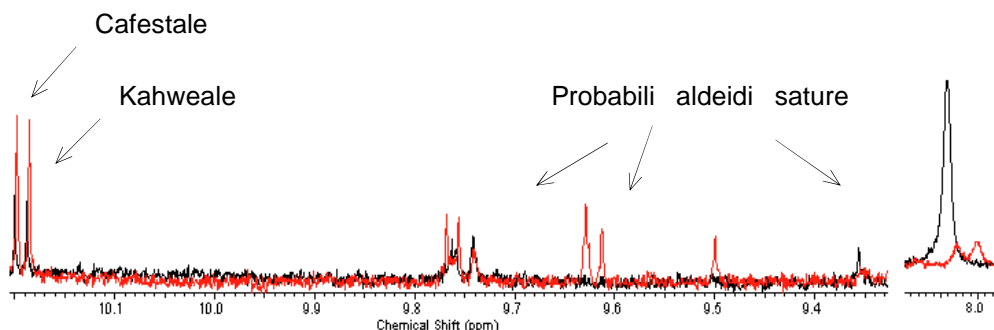
In figura 4.1 è riportato lo spettro monodimensionale di un estratto in cloroformio con espansione della zona tra 5 e 6 ppm.



**Figura.3.26:** Spettro  $^1\text{H}$  completo dell'estratto in cloroformio con relativa espansione tra 6.24 e 5 ppm

Per una assegnazione precisa dividiamo lo spettro in diverse zone.

1 – Zona aldeidica tra 10.20 ppm e 8 ppm



**Figura 3.27:** Espansione della regione tra 9.30 e 10.20 ppm per l'estratto in cloroformio di due campioni di diversa provenienza geografica

In questa regione cadono dei segnali attribuibili alle aldeidi derivate dal cafestolo e kahweolo oltre che ad altre aldeidi probabilmente sature.

2 – Zona tra 7.60 ppm e 5.5 ppm

In questa zona i picchi più intensi sono attribuibili a due diterpeni molto comuni nel caffè: il cafestolo e il kahweolo, le cui strutture sono riportate nelle figure 3.28 e 3.29. L'assegnazione delle ri-

sonanze è mostrata in figura 3.30. Il segnale a 7.55 ppm è attribuibile al protone aromatico della caffeina (fig 1.5), mentre gli altri appartengono a componenti minoritari.

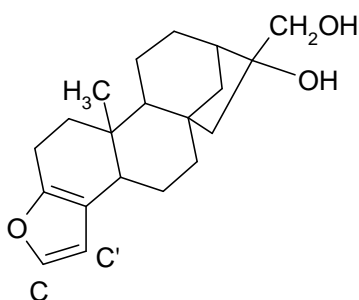


Figura 3.28: Cafestolo

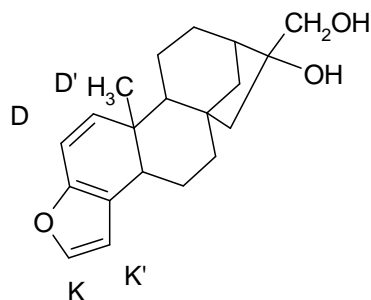


Figura 3.29: Kahweolo

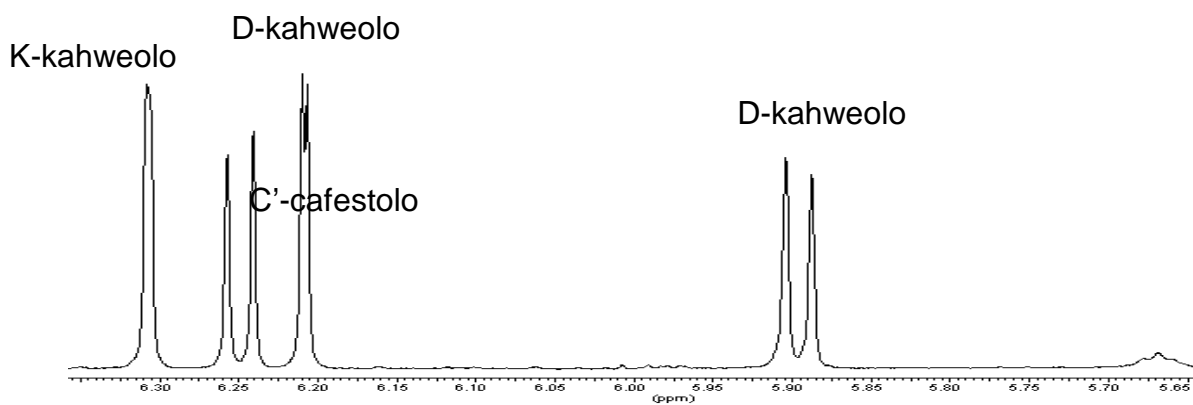
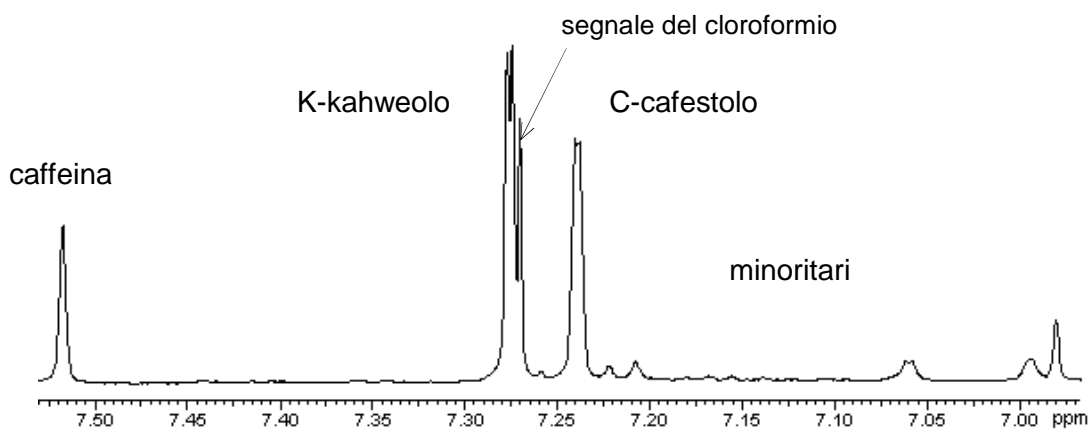
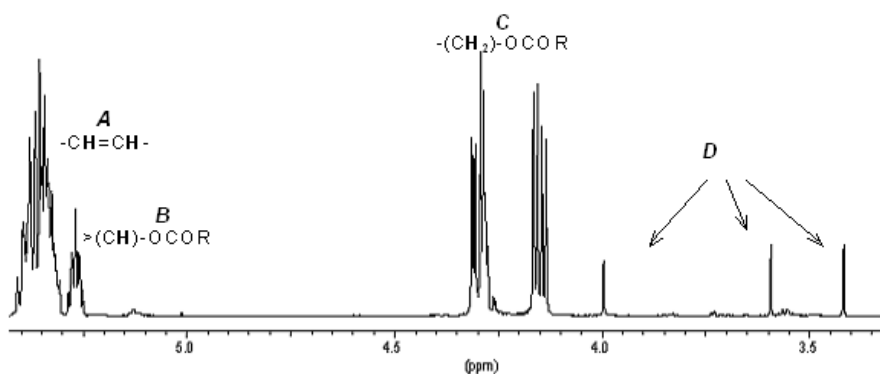


Figura 3.30: Espansioni delle regioni 7.50-6.70 ppm e 6.35-5.65 dell'estratto in cloroformio.

### 3 – Zona tra 5.4 e 3.3 ppm

La figure riporta l'espansione della regione tra 3.5 e 5.45 ppm, nella quale possono essere individuate le risonanze tipiche dei protoni dello scheletro del glicerolo e i protoni metilici della caffeina



**Figura 3.30:** zona da 5.50 e 3.30 ppm dell'estratto in cloroformio

L'assegnazione è la seguente:

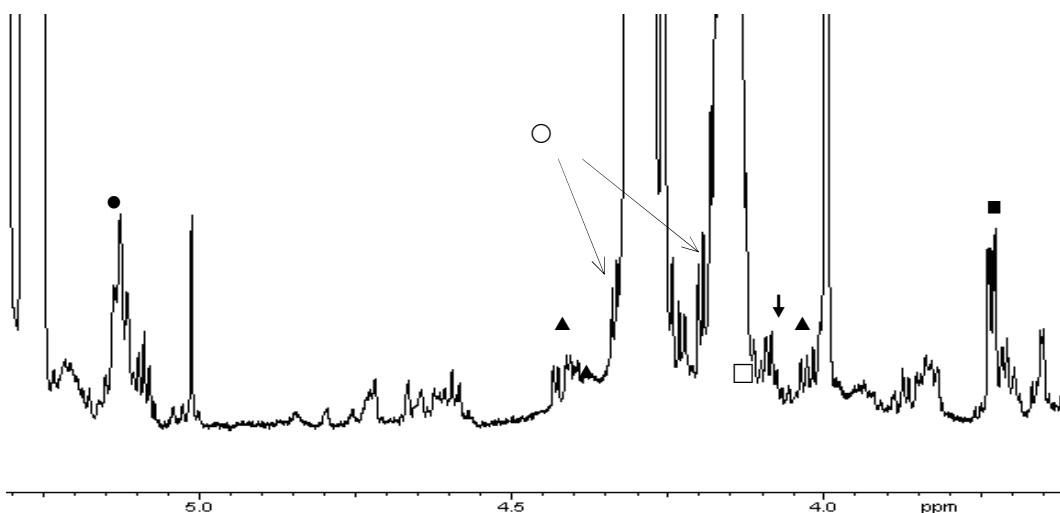
A = protoni olefinici di tutte le catene insature, a 5.40 e 5.30 ppm circa

B = protoni in posizione *sn*-2 dei trigliceridi, a 5.30 e 5.25 ppm circa

C = protoni in posizione *sn*-1,3 dei trigliceridi a 4.30 e 4.15 ppm circa

D = protoni dei tre gruppi metilici della caffeina, a 4.00, 3.59 e 3.41 ppm .

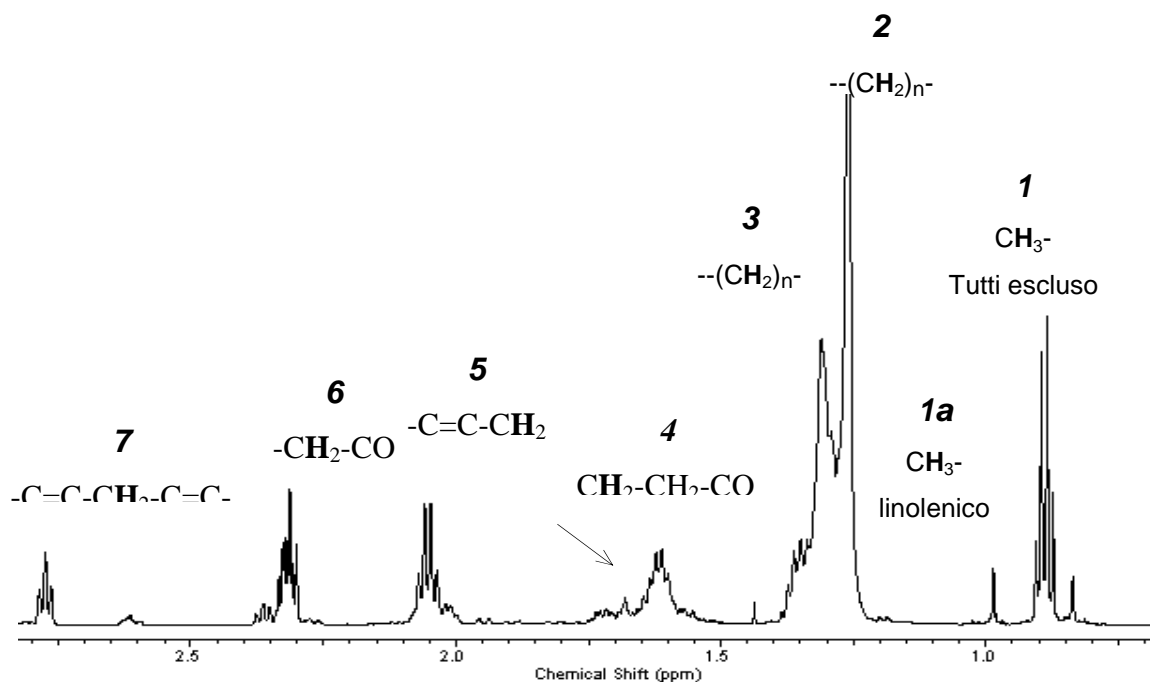
Espandendo la zona (Figura 3.31) è possibile osservare i segnali  $^{13}\text{C}$  satellite dei protoni in posizione *sn*1,3 dei trigliceridi evidenziati da un triangolo pieno. A 5.1 ppm sono indicati con un cerchio pieno i CH degli *sn*-1,2 digliceridi, mentre con un cerchio vuoto sono evidenziati gli  $\square\square$  CH<sub>2</sub> degli *sn*-1,2 digliceridi, rispettivamente a 4.29 e 4.17 ppm circa. A 4.07 ppm risuonano i CH degli *sn*-1,3 digliceridi ( $\square$ ), a 4.06 ppm i CH<sub>2</sub> degli *sn*-1,3 digliceridi ( $\downarrow$ ) e a 3.71 ppm gli  $\square'$  CH<sub>2</sub> degli *sn*-1,2 digliceridi ( $\blacksquare$ ).



**Figura 3.31:** Espansione della zona da 5.50 e 3.30 ppm dell'estratto in cloroformio

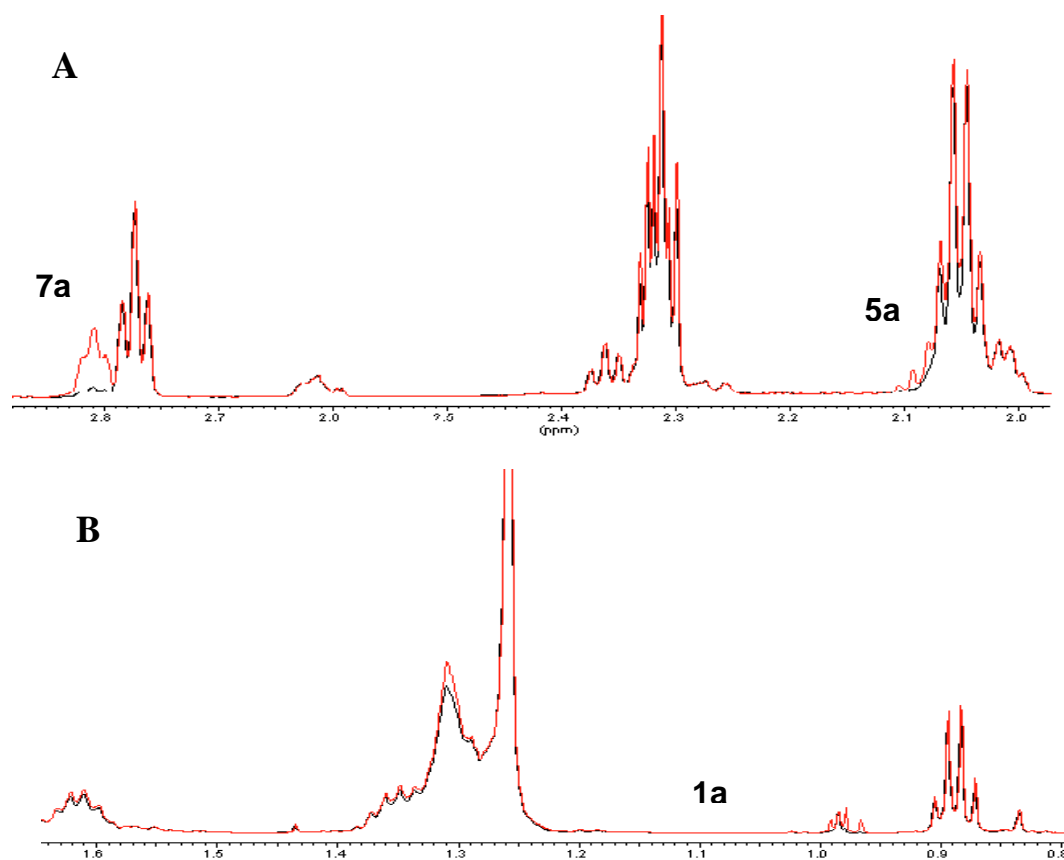
4 – Zona tra 2.90 ppm a 0.5 ppm

In questa zona cadono principalmente i segnali dei gruppi bisallilici (7), allilici (5), metilenici (6-4-3-2), metilici (1), e delle catene degli acidi grassi, identificati per mezzo delle aggiunte di standard di trigliceridi, e alcuni segnali appartenenti a composti minoritari come nella zona tra 2.60 ppm e 2.30 ppm; e tra 1.40 ppm e 1.10 ppm. L'assegnazione dei segnali degli acidi grassi è visualizzata nella figura seguente (figura 3.32):



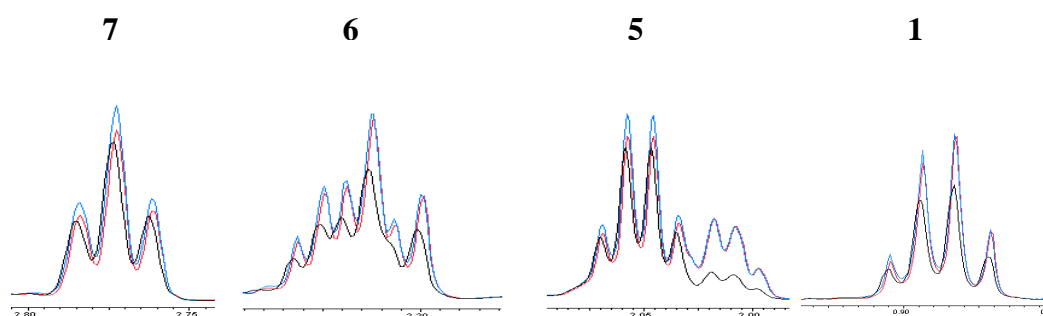
**Figura 3.32:** Ingrandimento della zona tra 2.90 e 0.70 ppm per l'estratto in cloroformio.

Di seguito viene mostrata, come esempio, l'effetto dell'aggiunta di trilinolenina: in nero è riportato lo spettro originario e in rosso quello ottenuto dopo l'aggiunta di 2 $\mu$ l di trilinolenina.



**Figura 3.33** : Sovrapposizione di spettri prima (nero), e dopo (rosso) l'aggiunta di trilinolenina. **A** ) Espansione della zona 2.8-2.0 ppm. **B**) Espansione della zona 1.65-0.8 ppm.

Le porzioni di spettro in figura 3.34 mostrano invece l'effetto di aggiunte di 2  $\mu$ l di trioleina (in rosso) e successivamente di 2 $\mu$ l di trilinoleina (in blu)



**Figura 3.34 (sopra):** Sovrapposizione di spettri ottenuti con aggiunta di trioleina (rosso), trilinoleina (blu), e prima delle aggiunte ( nero).

L'assegnazione completa ottenuta con questo metodo è schematizzata nella tabella seguente:

	<i>1-1 a*</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7-7 a*</i>
Oleico	0.88 ppm	-	1.3 ppm	1.6 ppm	2.0 ppm	2.30 ppm	-
Linoleico	0.88 ppm	-	1.3 ppm	1.6 ppm	2.5 ppm	2.30 ppm	2.78 ppm
Linolenico	1 ppm	-	1.3 ppm	1.6 ppm	2.09 ppm	2.30 ppm	2.81 ppm

Tabella A: i numeri si riferiscono ai picchi di figura 3.34 (la colonna 2 è riferita ai protoni metilenici degli acidi grassi saturi).

Nella regione compresa tra 0.5 e 0.7 ppm sono individuabili i segnali relativi ai C<sub>18</sub> metilici degli steroli (Segre *et al.*, 1997): β-sitosterolo e/o campesterolo a 0.68 ppm (\*), e stigmasterolo a 0.71 ppm (■) (Figura 3.35).

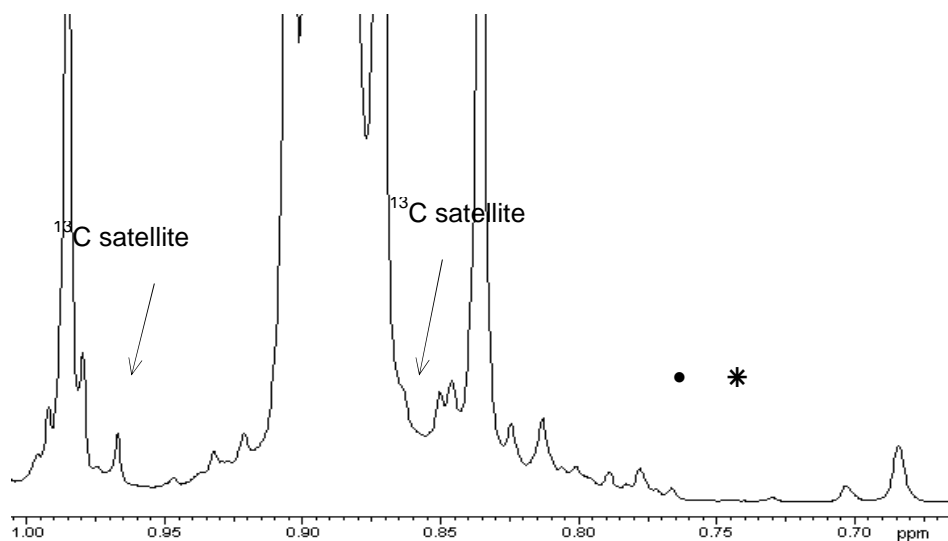


Figura 3.35. Espansione della regione 0.66-1.00 ppm

### 3.3.1.2. Assegnazione dello spettro <sup>13</sup>C in CDCl<sub>3</sub>

Lo spettro protonico dell'estratto organico offre il vantaggio di contenere sia informazioni sui componenti minoritari che sugli acidi grassi. Tuttavia i segnali di quest'ultimi si presentano molto sovrapposti. La distinzione più precisa dei diversi acidi grassi si ottiene dagli spettri al  $^{13}\text{C}$ , dai quali è anche possibile avere informazioni sulla distribuzione degli acidi grassi nelle diverse posizioni del glicerolo (figura 3.36). Questo è un parametro da prendere in considerazione per la discriminazione dei campioni analizzati in base alla provenienza geografica poiché è legato a fattori genetici e a condizioni pedoclimatiche.

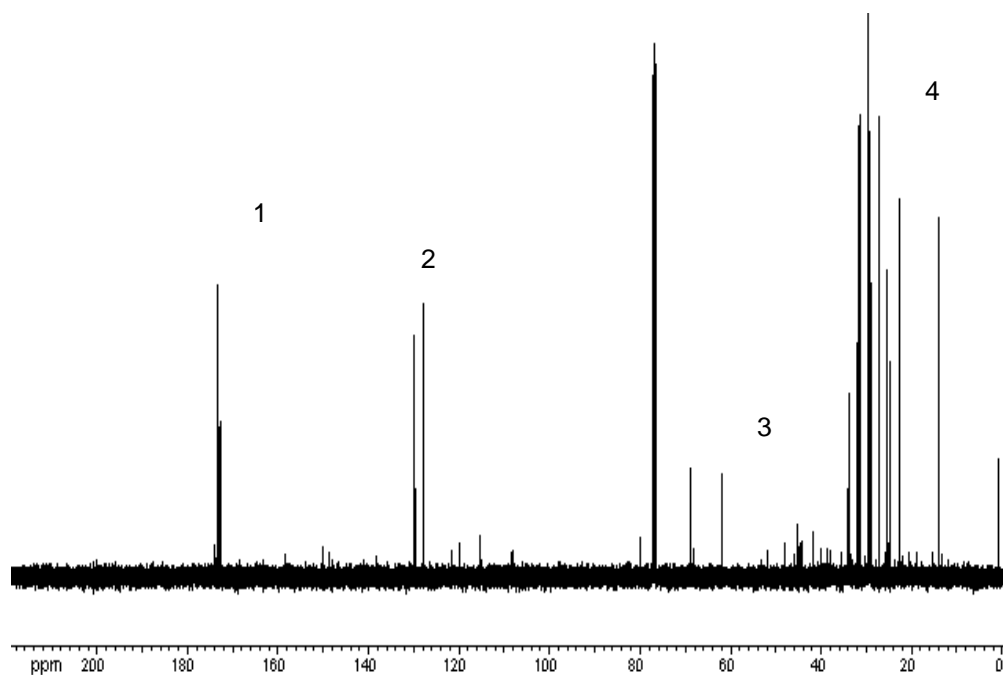
Lo spettro dell'estratto di caffè verde può essere suddiviso in diverse zone:

*1 regione carbonilica*

*2 regione olefinica*

*3 regione del glicerolo*

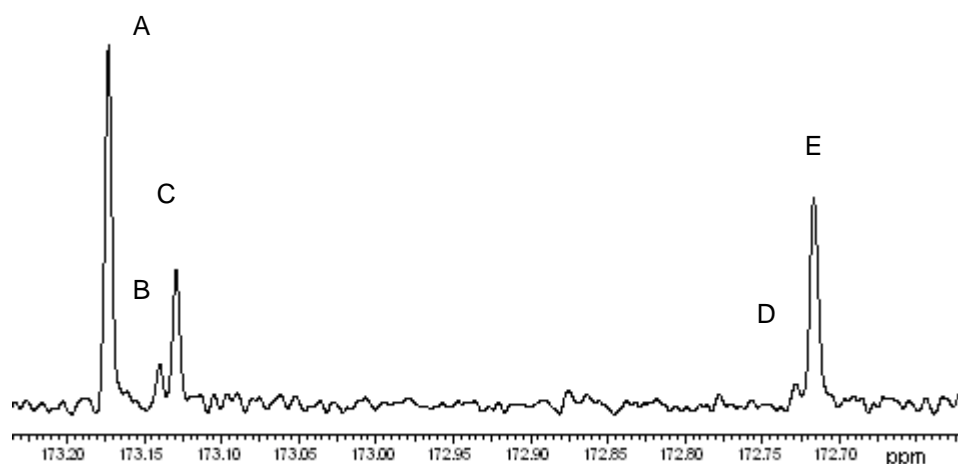
*4 regione allilica, bis allilica, metilenica e metilica*



**Figura 3.36:** spettro  $^{13}\text{C}$  dell'estratto in cloroformio di caffè verde

*1-regione carbonilica (173.3 e 172.6 ppm)*

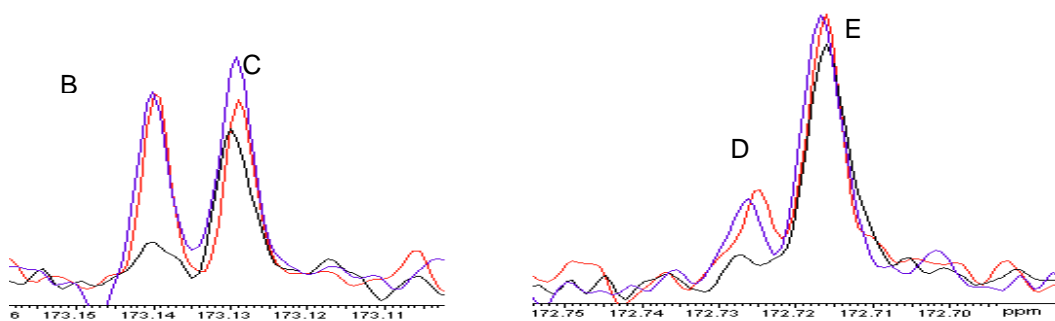
La zona dei carboni carbonilici relativi alle catene degli acidi grassi legati al glicerolo (figura 3.36) si presenta divisa in due gruppi a seconda che le catene siano esterificate in posizione 2 oppure 1,3 del glicerolo. Questa differenza nei *chemical shift* dipende dal fatto che il gruppo C=O che nella posizione 2 del glicerolo risente di due interazioni  $\gamma$ -gauche, a differenza del carbonile in posizione 1,3 per il quale ne è possibile solo una. Pertanto i carbonili in posizione 2 risultano più schermati e si risuonano a ppm più bassi.



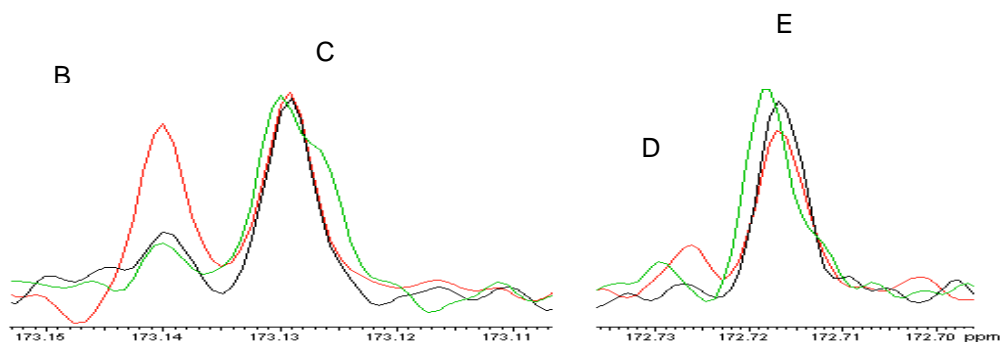
**Figura 3.36:** espansione regione carbonilica

Eventuali spostamenti di *chemical shift* rispetto ai dati di letteratura sono attribuiti alla diversa concentrazione dei trigliceridi in esame (Mannina, 2000).

Calibrando lo spettro sul segnale del carbonile in posizione *sn*-1,3 dell'acido oleico a 173.14 ppm, l'assegnazione è stata ottenuta tramite aggiunte di trioleina, trilinoleina e trilinolenina (figure 3.37 e 3.38).



**Figura 3.37:** espansione della zona dei carbonili. In nero lo spettro di un campione tal quale, in rosso dopo aggiunta di trioleina, e in blu dopo aggiunta anche di trilinoleina.



**Figura 3.38:** espansione della zona dei carbonili. In nero lo spettro di un campione tal quale, in verde dopo aggiunta di trilinolenina, in rosso dopo aggiunta di trioleina.

I segnali in *sn*-1,3 dopo le aggiunte di trioleina e trilinoleina presentano un incremento di intensità doppia rispetto a quelli del carbonile in posizione *sn*-2 poiché i trigliceridi standard sono esterificati ugualmente nelle tre posizioni del glicerolo. Come è evidente in figura 3.38 il campione in questione (spettro nero) presenta quantità lievemente maggiori di acido oleico in posizione *sn*-1,3 rispetto a *sn*-2; si riscontra una situazione opposta invece per l'acido linoleico.

I segnali relativi all'acido linolenico dei carboni carbonilici sono sovrapposti a quelli del linoleico in entrambe le posizioni (figura 3.38) e pertanto non distinguibili (Vlahov, 1999), quindi le loro frequenze saranno considerate le medesime. Tuttavia le aggiunte evidenziano un leggero shift, dell'ordine dei millesimi di ppm, del linolenico rispetto al linoleico come mostrato (figura 3.39).

I dati ottenuti si possono riassumere nella seguente tabella:

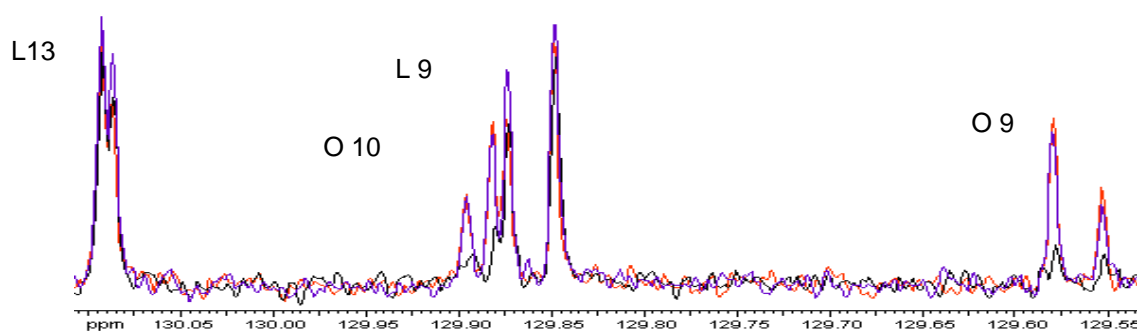
Picco	Assegnazione	Posizione	$\delta$ (ppm)
A	C <sub>1</sub> SATURI	<i>sn</i> -1,3	173.173
B	C <sub>1</sub> O	<i>sn</i> -1,3	173.14
C	C <sub>1</sub> L+Ln	<i>sn</i> -1,3	173.126
D	C <sub>1</sub> O	<i>sn</i> -2	172.72
E	C <sub>1</sub> L+ Ln	<i>sn</i> -2	172.716

**Tabella B:** assegnazione della zona carbonilica dello spettro <sup>13</sup>C

Nello spettro, per gli acidi grassi saturi, sono presenti solo i segnali in posizione *sn*-1,3 del glicerolo in accordo con il processo biosintetico che li interessa.

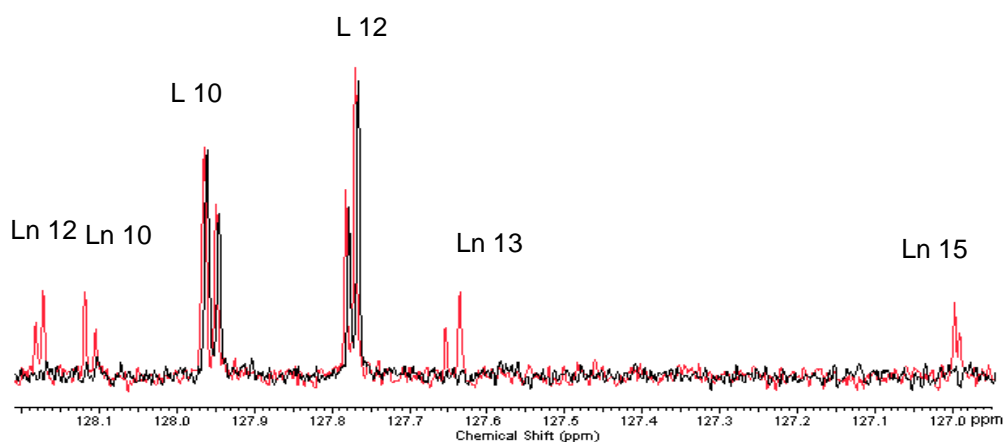
## 2 - Regione olefinica (134 - 124 ppm).

I carboni olefinici sono due per la catena oleica, quattro per la linoelica e sei per la linolenica (figura 3.39). I segnali sono due per ogni carbonio olefinico dal momento che sono distinti per *chemical shift* quelli in posizione *sn*-2 e *sn*-1,3 del glicerolo. Pertanto in questa zona ci sono 4 segnali per l'acido oleico, 8 per l'acido linoleico e 12 per l'acido linolenico.



**Figura 3.39:** espansione della regione olefinica di uno spettro tal quale e dopo aggiunte di trioleina (rosso) e trilinoleina (blu).

La quantità di acido linolenico presente nel campione in esame è sotto il limite di rilevabilità, come mostrato dalla figura 3.40, che evidenzia i segnali caratteristici delle tre insaturazioni. Tutte le risonanze sono riportate in tabella:



**Figura 3.40:** segnali dell'acido linolenico nella zona olefinica.

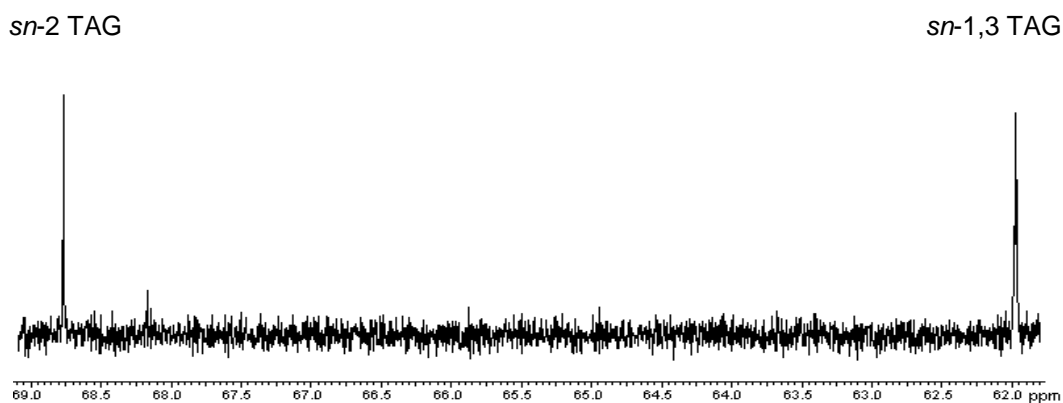
$\delta$ (ppm)	Assegnazione acido oleico e linoleico	$\delta$ (ppm)	Assegnazione acido linolenico
130.092	C 13 L sn-2	131.828	C 16 sn-1,3 /sn- 2
130.086	C 13 L sn-1,3	130.10	C 9 sn-1,3
129.891	C 10 O sn-2	130.076	C 9 2
129.880	C 10 O sn-1,3	128.182	C 12 sn-2
129.873	C9 L sn-1,3	128.171	C 12 sn-1,3
128.840	C 9 L sn-2	128.117	C 13 sn-1,3
129.557	C 9 O sn-1,3	128.105	C 13 sn-2
129.551	C 9 O sn-2	127.65	C 10 sn-2
127.951	C 10 L sn-2	127.635	C 10 sn-1,3
127.935	C 10 L sn-1,3	126.997	C 15 sn-1,3
127.768	C 12 L sn-1,3	126.991	C 15 sn-2
127.756	C 12 L sn-2		

**Tabella C** : assegnazione della zona olefinica dello spettro al  $^{13}\text{C}$

### 3 - Regione dei carboni del glicerolo (60 - 72 ppm).

In questa zona (figura 3.41) si individuano i segnali relativi ai trigliceridi (TAG), digliceridi (DAG) e monogliceridi (MAG). Studi precedenti (Mannina, 1999) hanno dimostrato che il *chemical shift* dei carboni della catena del glicerolo non sono influenzati dalla lunghezza e dal grado di insaturazione delle catene aciliche legate al glicerolo. Normalmente in un olio il contenuto di trigliceridi supera enormemente quello degli altri derivati per cui ci si aspetta di trovare solo i segnali di questi ultimi. In effetti le risonanze relative agli sn-1,2 DAG si osservano solo quando vi è un'incompleta biosintesi dei trigliceridi ad opera degli enzimi esterasi o quando vi è un'azione, limitata, delle lipasi (Cappella *et al.*, 1997), mentre gli sn-1,3 DAG compaiono quando l'olio è mal conservato. In particolare, oli freschi hanno un elevato rapporto sn-2 DAG/sn-1,3 DAG, mentre il contenuto degli sn-

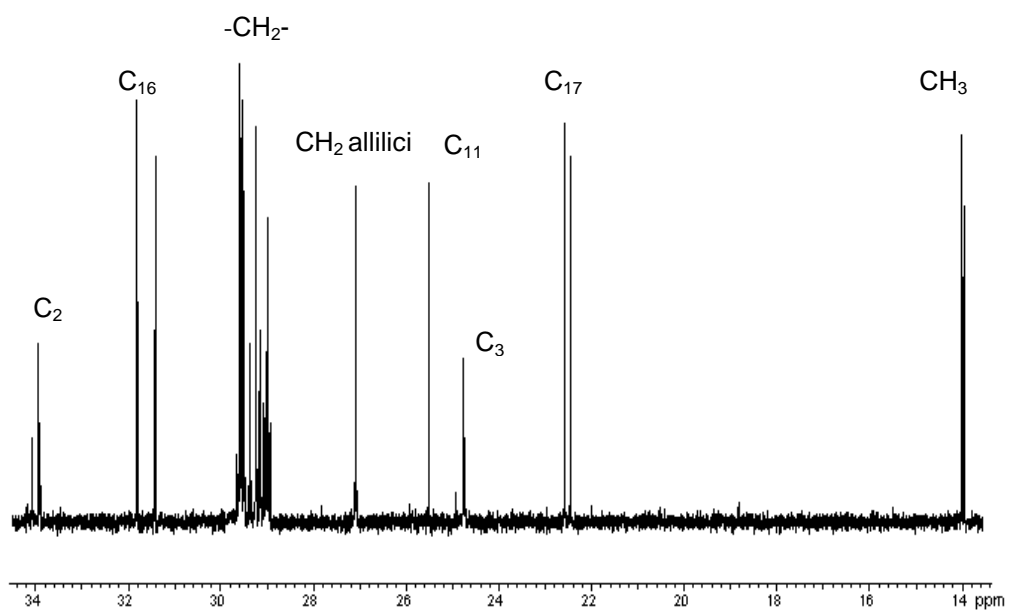
1,3 DAG aumenta a seguito dell'invecchiamento e dello stress termico a causa di trasposizioni intramolecolari e fenomeni lipolitici (Sacchi, 1996). In questa regione sono individuabili solo i segnali dei carboni in posizione *sn*-2 (68.768 ppm) e quelli in posizione *sn*-1,3 (61.98 e 61.99 ppm) dei trigliceridi. I segnali a 68.16 probabilmente corrispondono a di gliceridi.



**Figura 3.41:** espansione della zona dei carboni del glicerolo.

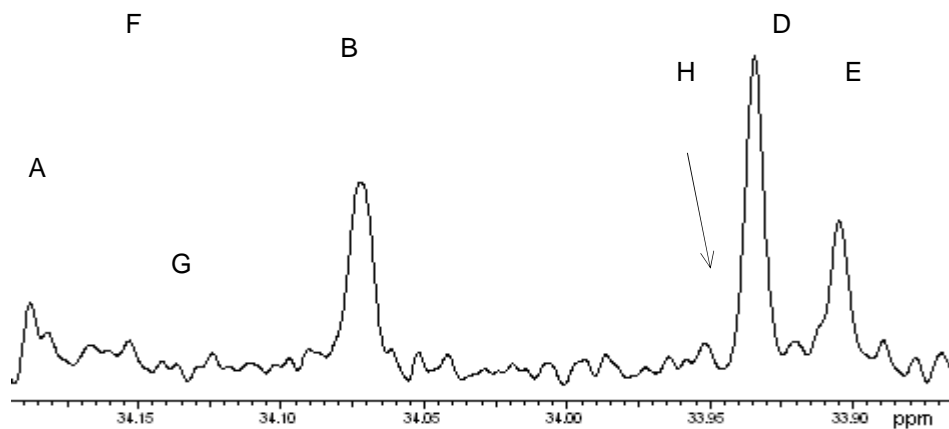
#### *4 - Regione dei carboni allilici, bis-allilici, metilenici e metilici (35- 10 ppm).*

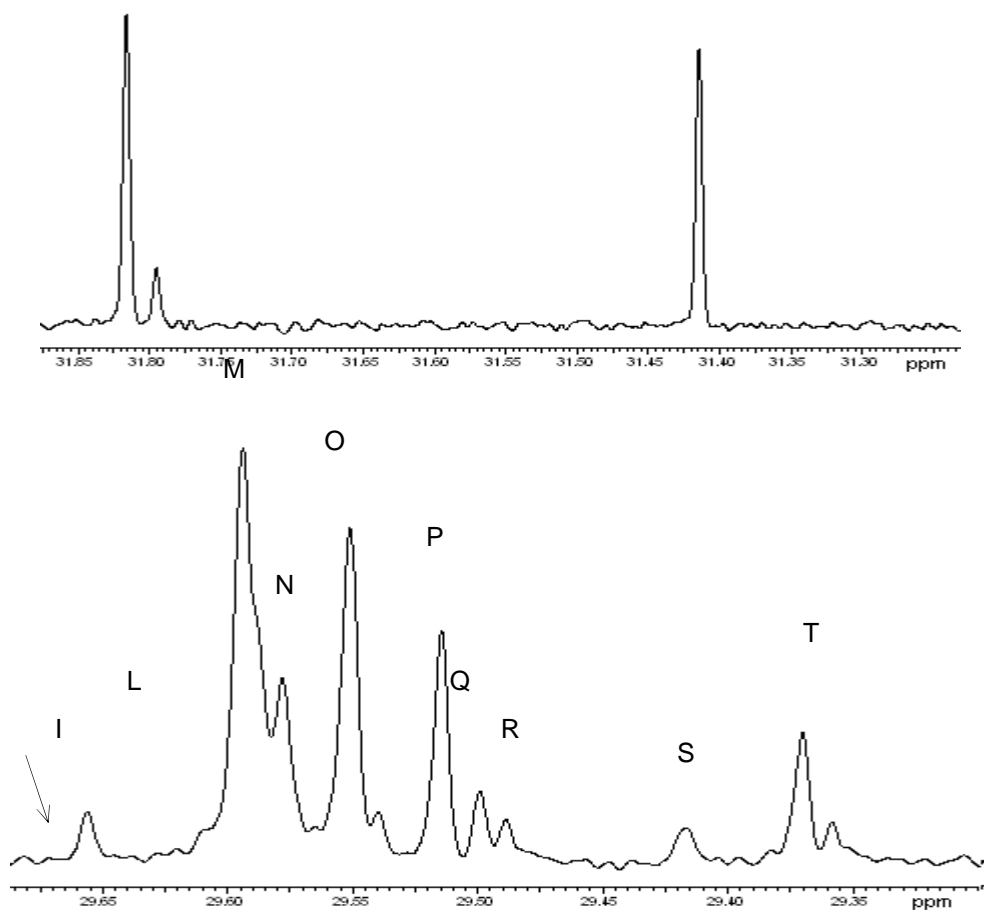
In questa regione sono presenti tutti i carboni rimanenti della frazione organica (figura 3.42). I carboni metilenici sono risolti a seconda della loro posizione nella catena e nella struttura base del glicerolo e a seconda del tipo di acido grasso a cui appartengono e per questo motivo ci possono essere più picchi per lo stesso tipo di carbonio.



**Figura 3.42:** espansione zona tra 34 e 14 ppm

Le regioni espanse degli spettri verranno di seguito analizzate separatamente. L'assegnazione sarà evidenziata in tabelle relativamente ad ogni figura.

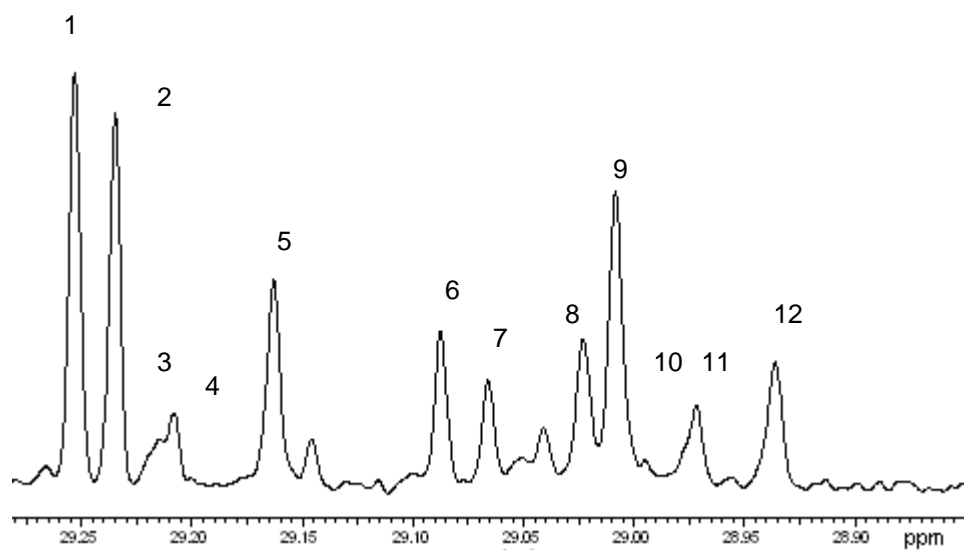




**Figura 3.43:** espansioni della zona tra 34.20 e 29.3 ppm

	$\Delta$ (ppm)	Assegnazione		$\delta$ (ppm)	Assegnazione
A	34.188	C- saturo	L	29.60	C-7 <i>sn</i> -1,3/ <i>sn</i> -2 O
B	34.072	C-2 <i>sn</i> -2 L+O	M	29.588	C-11 C12 S
C	33.934	C-2 <i>sn</i> -1,3 S	N	29.572	C-10 S
D	33.911	C-2 <i>sn</i> -1,3 O	O	29.545	C-9 e C-8 S +C-14 O?
E	33.904	C-2 <i>sn</i> -1,3 L	P	29.51	C-7 <i>sn</i> -1,3 S
F	31.809	C-16 <i>sn</i> -1,3 S	Q	29.49	C-7 <i>sn</i> -2 L
G	31.788	C-16 <i>sn</i> -1,3/ <i>sn</i> -2 O	R	29.483	C-5 <i>sn</i> -1,3 S
H	31.40	C-16 <i>sn</i> -1,3/ <i>sn</i> -2 L	S	29.41	C-13-15 <i>sn</i> -1,2,3 O
I	29.65	C-12 <i>sn</i> -1,3/ <i>sn</i> -2 O	T	29.364	C-13 <i>sn</i> -1,3 S

**Tabella D:** assegnazione della zona tra 34.2 e 29.3 ppm



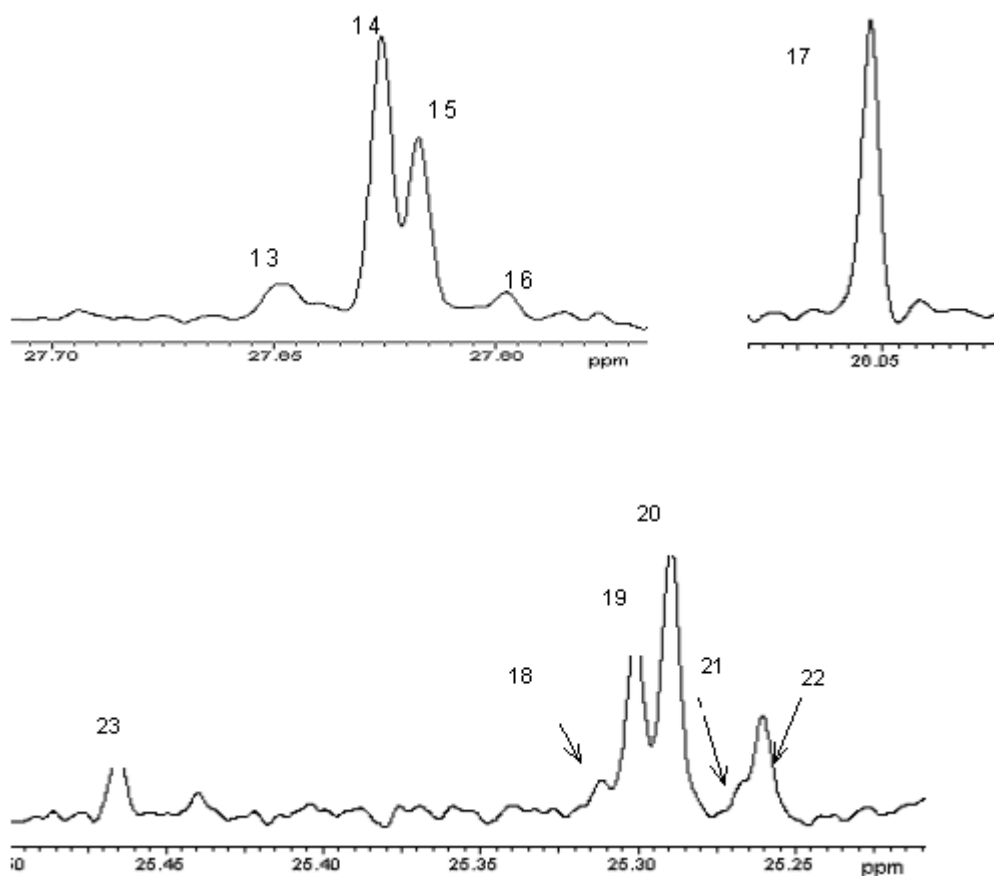


Figura 3.44 espansione della zona tra 29.3 e 24.7 ppm

	$\delta$ (ppm)	Assegnazione		$\delta$ (ppm)	Assegnazione
1	29.248	C-15 Stearico	12	28.93	C-4 sn-1,3 L
2	29.23	C-5 sn-2 L	13	27.104	C-11 sn-1,3/sn-2 O
3	29.211	C-5 sn-1,3 L+ C-5-sn2 O	14	27.083	C-14 sn-1,3/sn-2 L
4	29.2	C-5 sn-1,3 O	15	27.075	C-8 sn-1,3/sn-2 L
5	29.158	C-6 S	16	27.056	C-8 sn1,3/sn2 O
6	29.08	C-6 sn-1,3 O + C-6 sn-2 L	17	25.51	C-11 sn-1,3/sn-2 L+Ln
7	29.067	C-6 sn-1,3 L	18	24.77	C-3 sn-2 O

8	29.017	C-4 S	19	24.758	C-3 <i>sn</i> -2 L
9	29	C-4 <i>sn</i> -2 L	20	24.749	C-3 S
10	28.975	C-4 <i>sn</i> -2 O	21	24.725	C-3 <i>sn</i> -1,3 O
11	28.965	C-4 <i>sn</i> -1,3 O	22	24.717	C-3 <i>sn</i> -1,3 L
			23	25.45	saturo

**Tabella E** : assegnazione della zona tra 29.3 a 24.7 ppm



**Figura 3.45:** espansione della zona tra 22.6 e 13.9 ppm

	$\delta$ (ppm)	Assegnazione		$\delta$ (ppm)	Assegnazione
A	22.57	C-17 C-15 <i>sn</i> -1,3 S	D	14	C-18 S
B	22.566	C-17 <i>sn</i> -1,3/ <i>sn</i> -2 O	E	13.99	C-18 O
C	22.457	C-17 <i>sn</i> -1,3/ <i>sn</i> -2 L	F	13.952	C-18 L

**Tabella F** : assegnazione della zona tra 22.6 e 14 ppm

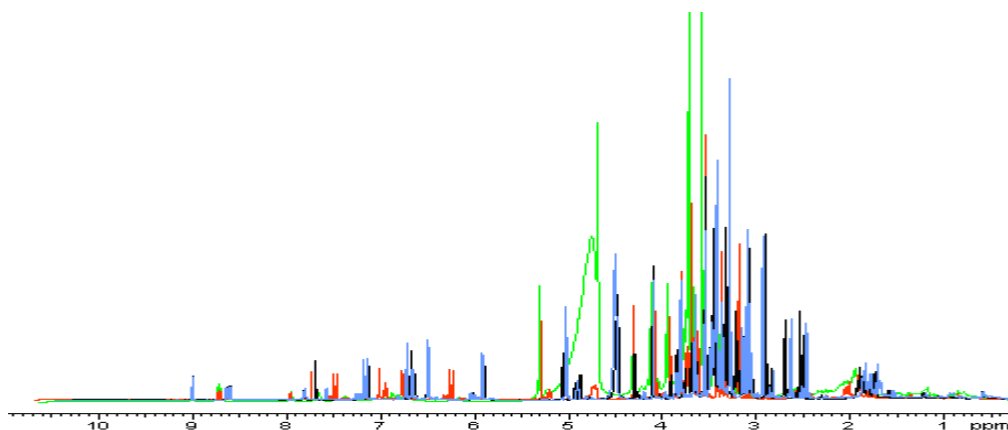
### 3.3.2. Analisi degli spettri della fase acquosa.

#### 3.3.2.1 Scelta del solvente.

La scelta del solvente da utilizzare nella procedura di estrazione della fase acquosa si è basata confrontando i profili degli spettri monodimensionali dello stesso campione ottenuti con quattro differenti solventi (come spiegato nel capitolo 3):

1. D<sub>2</sub>O neutra (verde)
2. D<sub>2</sub>O acida (nero); pH 0.8 circa
3. D<sub>2</sub>O neutra + CD<sub>3</sub>OH (rosso)
4. D<sub>2</sub>O acida + CD<sub>3</sub>OH (blu); pH 0.8 circa

In figura 3.46 è rappresentata la sovrapposizione degli spettri calibrati sul segnale a 9 ppm della trigonellina



**Figura 3.46:** spettri sovrapposti delle quattro estrazioni acquose.

È stata quindi valutata la capacità estraente di ciascun solvente in termini di intensità del segnale, e la risoluzione spettrale delle soluzioni così ottenute. Come si può vedere dalla figura 3.46 e dall'espansione riportata in figura 3.47, la capacità estraente della soluzione acquosa neutra è alta per le sostanze zuccherine ma non ottimale per le altre sostanze. Risultati analoghi sono stati ottenuti con la soluzione di D<sub>2</sub>O neutra + CD<sub>3</sub>OH. La capacità estraente è notevolmente migliorata acidi-

ficando fortemente il solvente (figura 3.47). La soluzione di D<sub>2</sub>O acida in particolare dava risultati modestamente migliori ma è stata scelta come solvente per motivi di semplicità.

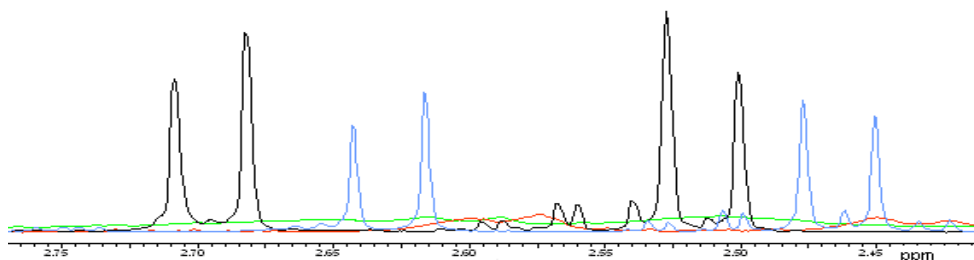


Figura 3.47: espansione dello spettro tra 2.40 e 2.75 ppm

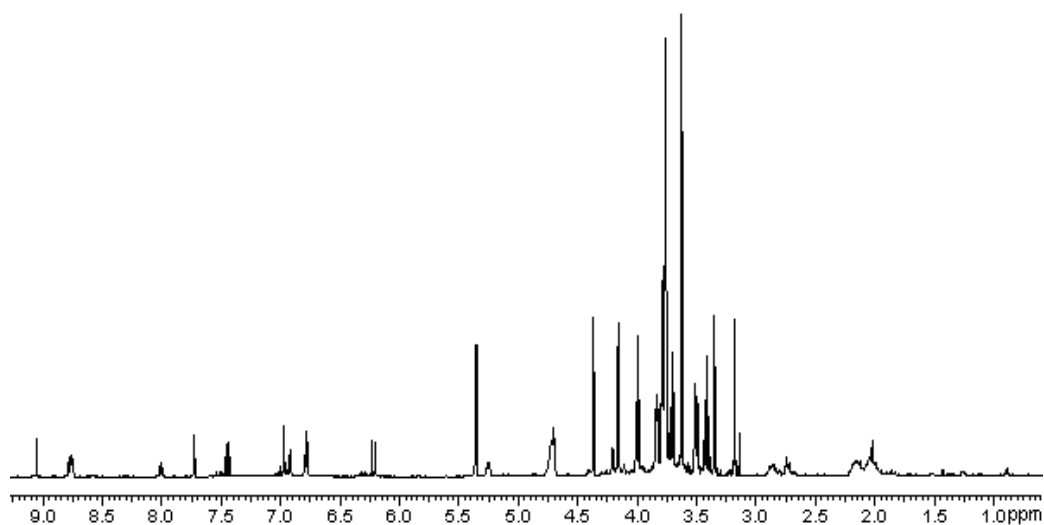
### 3.3.2.2 Riproducibilità dell'estrazione.

Per una verifica degli errori commessi (casuali e strumentali) è stata necessaria un'analisi della ripetibilità degli esperimenti effettuati. Sono state eseguite tre prove di estrazione sullo stesso lotto di caffè considerando lo spettro protonico dell'estratto acquoso. L'integrazione è stata eseguita su alcuni segnali dello spettro ponendo la somma degli integrali pari a mille. L'errore relativo massimo ottenuto è del 10.9%.

Segnale (ppm)	integrale			DEV.ST	MEDIA	DEV.ST/ MEDIA*100
	prova 1	prova 2	prova 3			
[1.42 .. 1.44]	5.64E-01	4.97E-01	5.17E-01	0.034437	4.03E-01	8.54
[2.76 .. 2.90]	6.97E+00	6.58E+00	6.80E+00	0.194957	5.14E+00	3.79
[3.13 .. 3.15]	1.40E+00	1.17E+00	1.28E+00	0.114512	9.88E-01	11.58
[3.33 .. 3.36]	5.81E+00	5.46E+00	5.52E+00	0.186693	4.25E+00	4.39
[3.37 .. 3.44]	9.81E+00	9.28E+00	9.54E+00	0.262268	7.22E+00	3.63
[3.48 .. 3.52]	1.05E+01	1.01E+01	1.02E+01	0.206756	7.74E+00	2.67
[3.61 .. 3.64]	1.77E+01	1.72E+01	1.72E+01	0.27184	1.31E+01	2.07
[3.97 .. 4.02]	9.26E+00	9.70E+00	9.38E+00	0.224335	7.14E+00	3.14
[4.09 .. 4.12]	1.22E+00	1.34E+00	1.26E+00	0.061391	9.68E-01	6.34
[4.14 .. 4.18]	7.60E+00	7.80E+00	7.62E+00	0.11175	5.78E+00	1.93
[4.35 .. 4.41]	5.36E+00	5.81E+00	5.64E+00	0.228189	4.26E+00	5.35
[5.22 .. 5.29]	2.14E+00	2.29E+00	2.29E+00	0.085888	1.70E+00	5.04
[5.33 .. 5.38]	8.02E+00	8.11E+00	8.04E+00	0.047442	6.05E+00	0.78
[6.17 .. 6.32]	1.98E+00	2.30E+00	2.31E+00	0.185291	1.70E+00	10.92

[6.73 .. 6.80]	2.57E+00	2.60E+00	2.75E+00	0.098555	2.00E+00	4.91
[7.70 .. 7.75]	1.40E+00	1.43E+00	1.44E+00	0.02036	1.07E+00	1.90
[7.98 .. 8.04]	1.15E+00	1.23E+00	1.20E+00	0.041411	9.05E-01	4.57
[8.73 .. 8.79]	2.76E+00	2.78E+00	2.79E+00	0.01318	2.09E+00	0.63
[9.03 .. 9.07]	1.58E+00	1.60E+00	1.58E+00	0.013713	1.19E+00	1.15

### 3.3.2.3. Assegnazione degli spettri della fase acquosa.

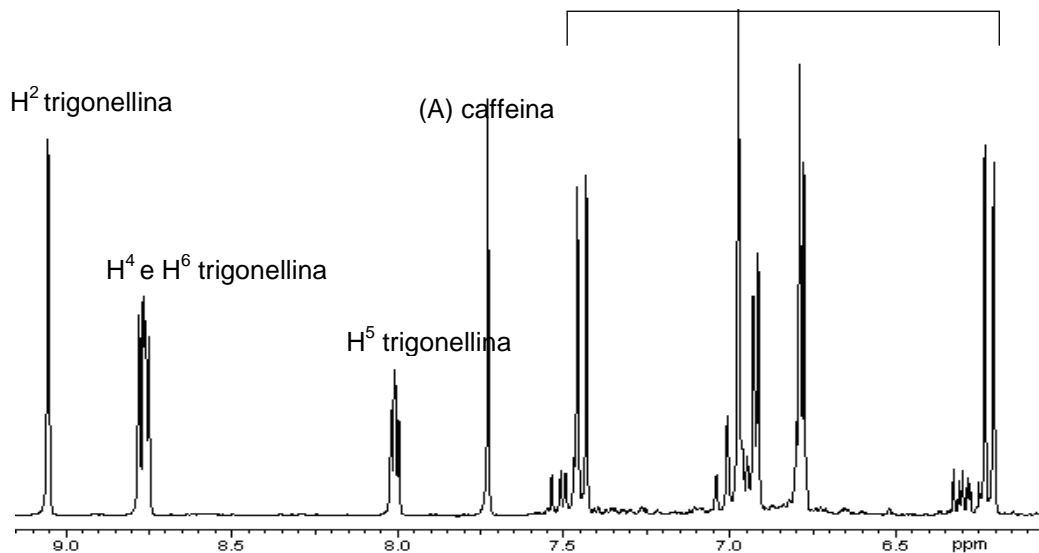


**Figura 3.48:** spettro monodimensionale protonico dell'estratto acquoso

Lo spettro appare molto più complesso di quelli dell'estratto in cloroformio, in particolare nella zona tra i 3.0 e i 4.0 ppm dove si osserva una notevole sovrapposizione di segnali che rende difficile l'attribuzione. L'assegnazione dei picchi è stata possibile grazie a dati di letteratura (Tavares e altri, 2006; Le Galle e altri, 2004; Bosco e altri, 1999;; Belton e altri, 1996) e mediante spettri bidimensionali omocorrelati (TOCSY e NOESY). Per poter assegnare meglio i picchi lo spettro è stato diviso in tre zone: tra 9.2 e 6.0 ppm, tra 5.4 a 3.0 ppm e tra 3.0 e 0.5 ppm.

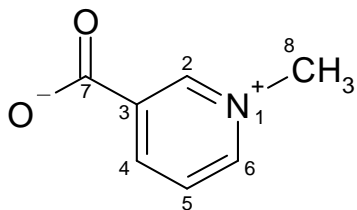
## 1. Zona tra 9.2 e 6.0 ppm

Isomeri dell'acido clorogenico, parte caffeica

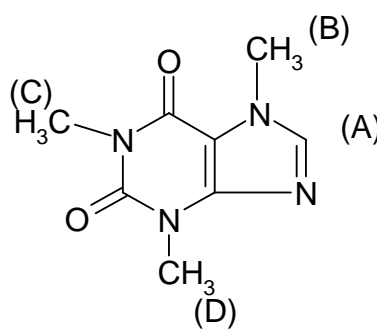


**Figura 3.49:** espansione dello spettro

In questa regione (figura 3.49) si notano dei segnali particolarmente intensi che possono essere attribuiti alla trigonellina (figura 3.50) e alla caffeina (figura 3.51).

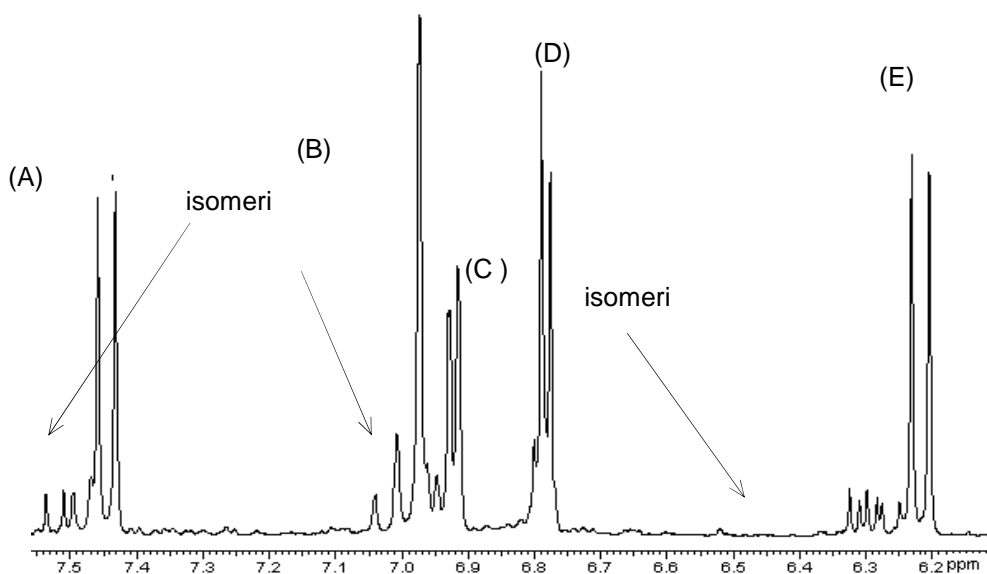


**Figura 3.50.** Trigonellina



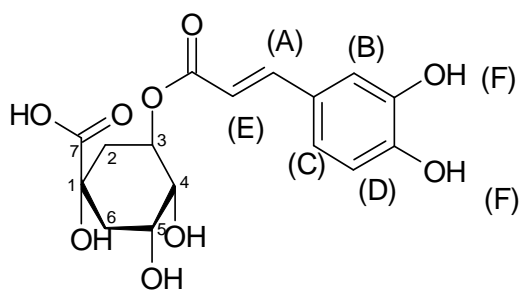
**Figura 3.51.** Caffeina

L'immagine successiva mostra un ingrandimento della zona attribuibile ai segnali dei protoni della parte caffeica dell'acido clorogenico (figura 3.52).

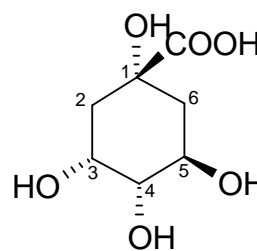


**Figura 3.52:** espansione dello spettro

I segnali intensi corrispondono ai protoni della parte caffeica dell'acido clorogenico predominante per concentrazione. I doppietti nella zona intorno a 7.5 e 6.3 ppm appartengono sicuramente ad altrettanti isomeri dello stesso acido che si distinguono per il sostituente e per il grado di sostituzione.



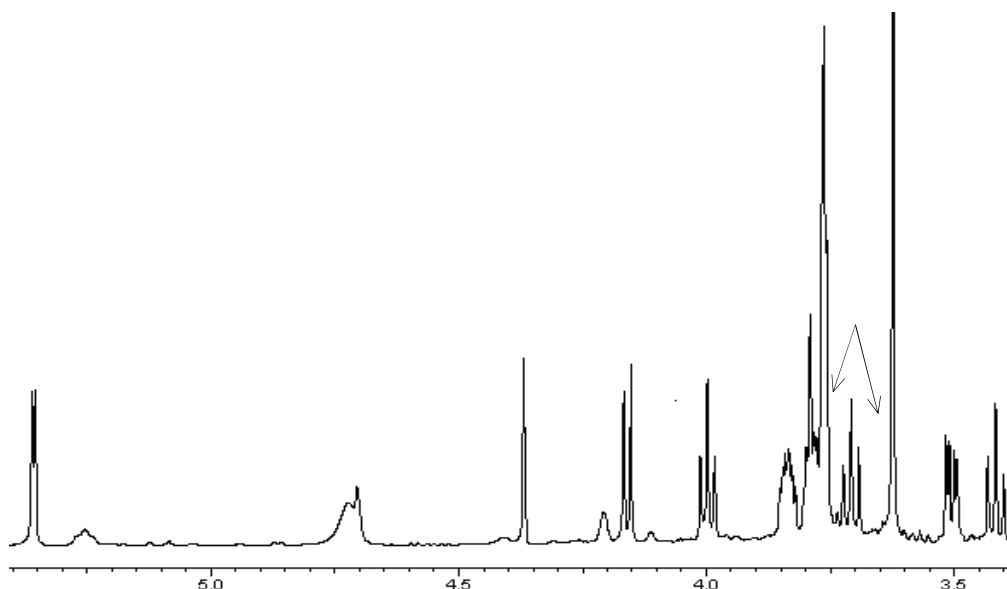
**Figura 3.53:** Acido clorogenico



**Figura 3.54:** Acido chinico libero

## 2. Zona tra 5.40 e 3 ppm

Nella figura 3.55 è riportata un'espansione della zona compresa tra i 5.4 e i 3.0 ppm.



**Figura 3.55:** espansione dello spettro.

In questa zona cadono i segnali relativi alla parte chinica dell'acido clorogenico insieme ai segnali dell'acido chinico libero, e ai segnali metilici della trigonellina. I segnali molto intensi sono attribuibili al saccarosio, dimero di glucosio e fruttosio.

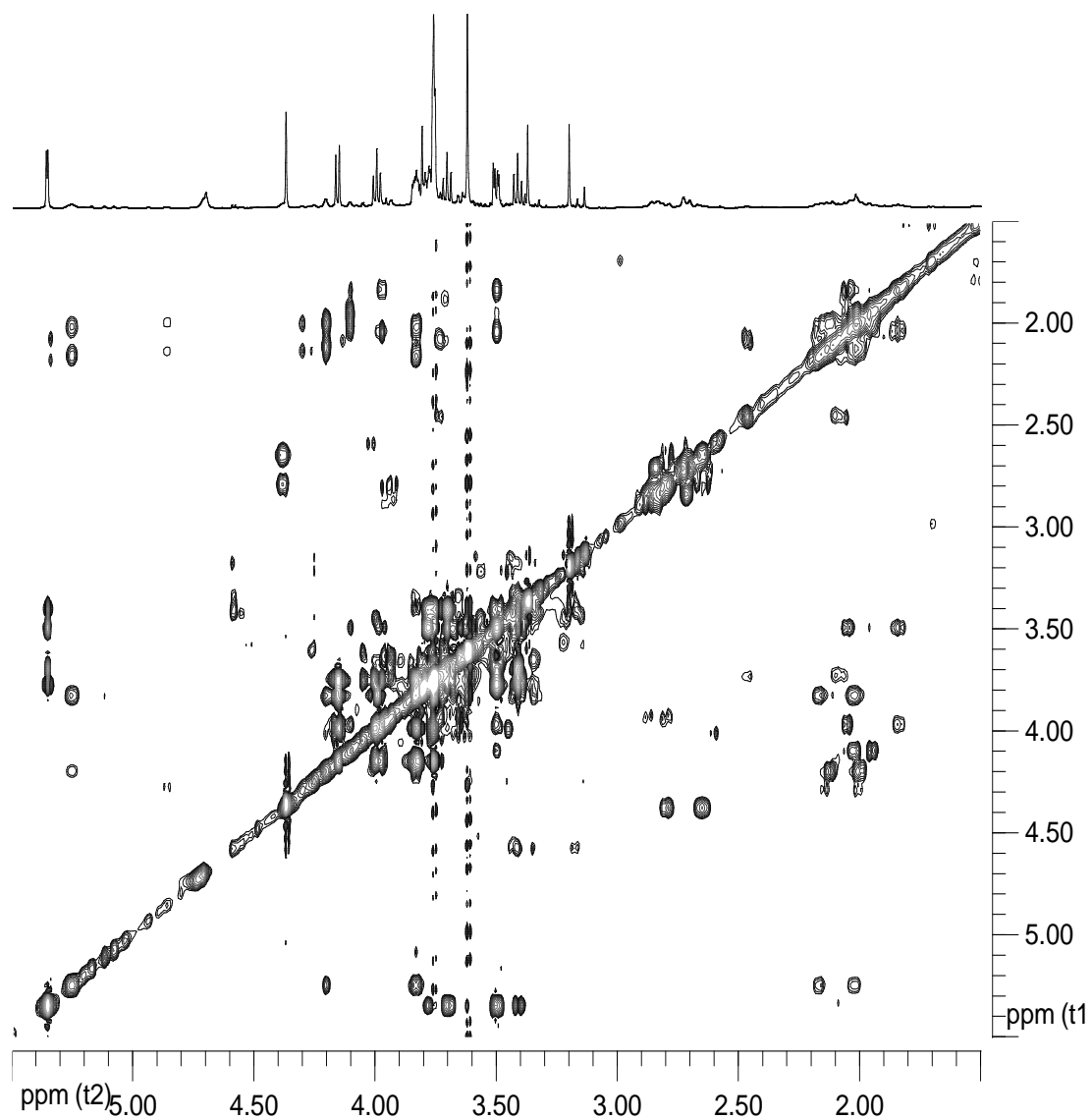
Gli altri segnali, meno intensi, appartengono a isomeri dell'acido clorogenico, e a zuccheri presenti in piccole concentrazioni.

L'assegnazione di questa zona è pertanto molto complicata. La correlazione tra i picchi minoritari attraverso un esperimento TOCSY ha portato all'identificazione dei seguenti sistemi di spin :

composto	ppm				
$\beta$ glucosio	4.60	3.36	3.20		
$\alpha$ glucosio	5.17	3.34	3.5	3.37	3.84
Acido ferulico	3.64	3.67	3.93		
A	5.10	3.78	3.65	3.51	3.35
B	2.2	2.57	2.36		
C	4.05	3.76	3.60		
D	5.20	4.18	3.82		
E	4.85	4.29	4.26		

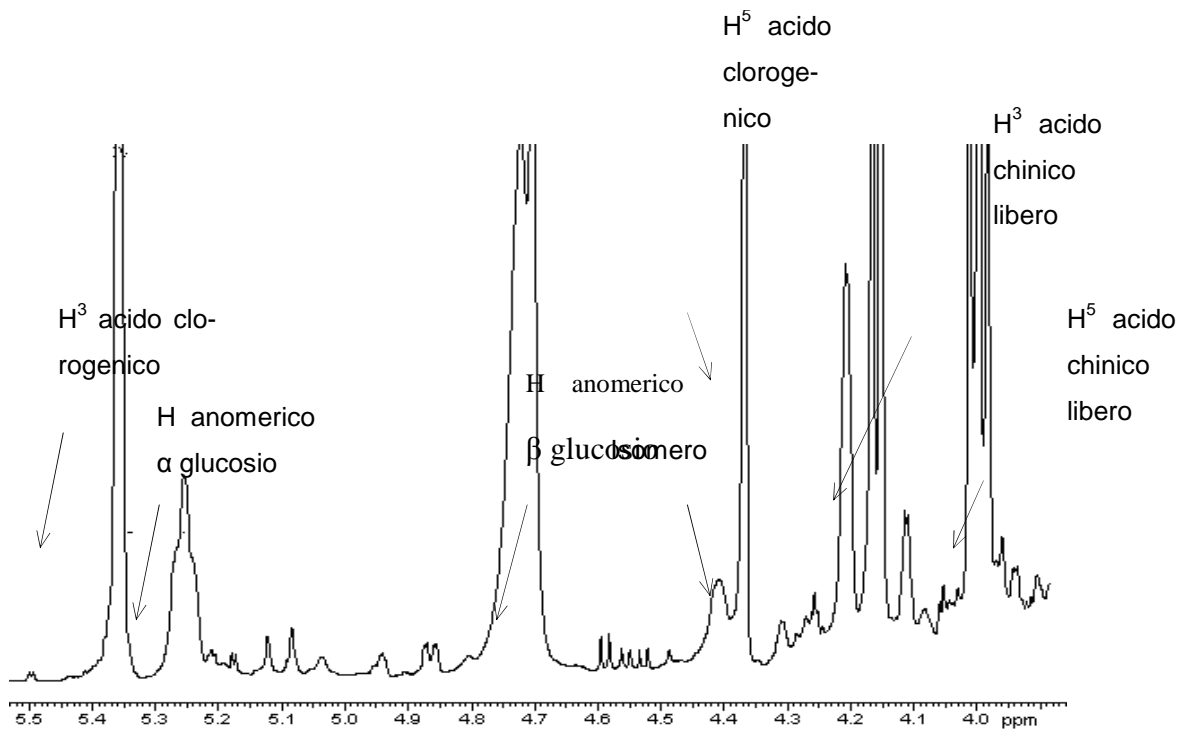
**Tabella G:** correlazioni evidenziate dal TOCSY.

I sistemi non identificati appartengono probabilmente a isomeri dell'acido clorogenico o a zuccheri minoritari.

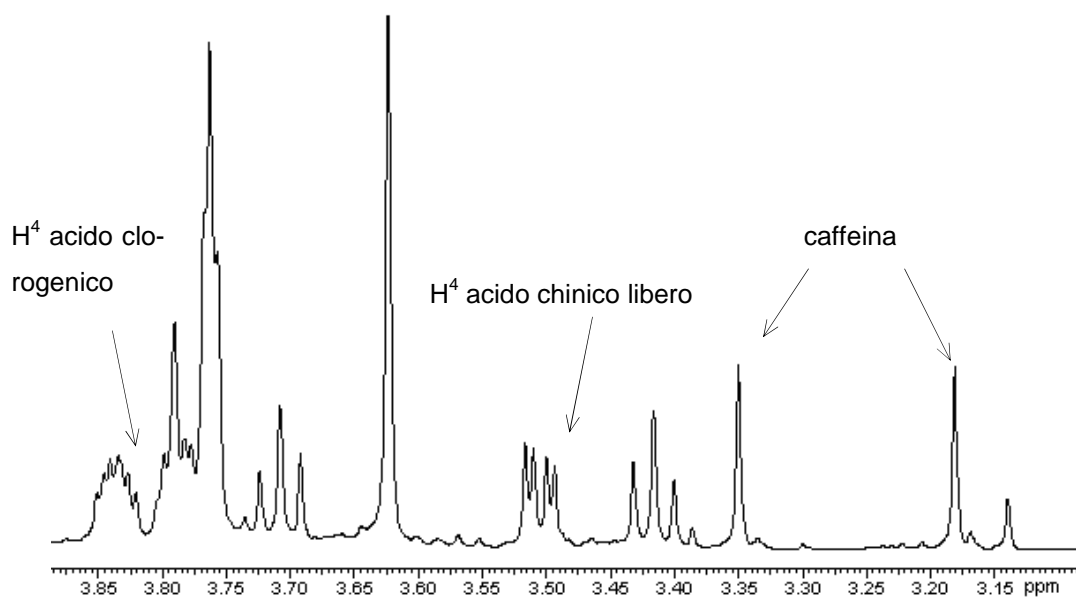


**Figura 3.56 : TOCSY**

L'ingrandimento della zona tra 5.5 e 3.90 ppm mostra le risonanze dei protoni degli zuccheri minoritari. I segnali della parte chinica dell'acido clorogenico e dell'acido chinico non esterificato mostrano frequenze differenti.

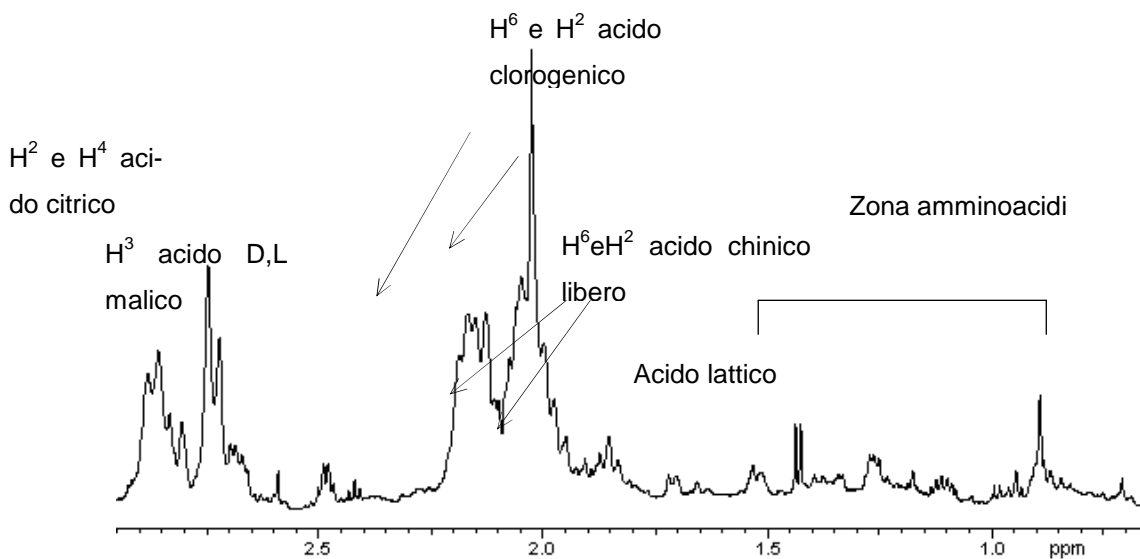


**Figura 3.57:** espansione dello spettro



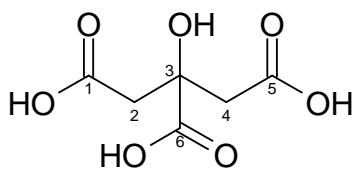
**Figura 3.58:** espansione dello spettro tra 3.90 e 3.10 ppm

### 3. zona tra 3 e 0.5 ppm

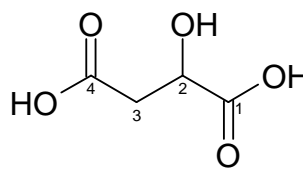


**Figura 3.59:** espansione dello spettro

In questa zona, oltre alle risonanze tipiche dell'acido chinico libero, acido clorogenico e isomeri, sono presenti altri picchi attribuibili ai protoni in posizione 2 e 4 dell'acido citrico (figura 3.60) e ai protoni in posizione 3 dell'acido malico (figura 3.61).



**Figura 3.60.** Acido citrico



**Figura 3.61.** Acido malico

Tabella riassuntiva delle risonanze dell'estratto acquoso:

Composto	Protone	<sup>1</sup> H ppm	molteplicità	Composto	Protone	<sup>1</sup> H ppm	molteplicità
Trigonellina	2	9.05	s	saccarosio		5.35	d
	4	8.77	d			4.16	d
	5	8	t			4	t
	6	8.76	d			3.83	m
	8	4.37	s			3.78	m
caffaina	A	7.73	s			3.70	dd
	CH <sub>3</sub>	3.80	s			3.623	s
	CH <sub>3</sub>	3.36	s			3.51	dd
	CH <sub>3</sub>	3.2	s			3.41	dd
Acido clorogenico (parte caffeica)	A	7.46	d		Acido clorogenico (parte chinica)	3	5.26
	B	6.96	s	5		4.20	m
	C	6.92	dd	4		3.83	dd
	D	6.78	d	6		2.16	dd
	E	6.22	d	2		2.0	dd
Acido chinico libero	3	4.10	dd	Acido citrico		2.94	d
	5	3.96	ddd			2.81	d
	4	3.48	dd	Acido malico		2.9	
	6	2.10	ddd			2.77	
	2	1.95	dd e dd	5-(idrossimetil)-2-furaldeide		7.5	
	6	1.85	dd			6.7	
Isomeri glucosio	α	5.17		Isomeri acido clorogenico		5.10	
	β	4.60				3.65	
		3.84				3.51	
		3.50				3.78	
		3.37				4.04	
		3.34				3.76	
				3.60			

**Tabella H:** composti identificati nell' estratto acquoso

### 3.3.2.4 Confronto tra gli spettri dell'estratto acquoso

Dalla sovrapposizione degli spettri protonici dei campioni analizzati si evincono subito delle differenze di chemical shift relative ai segnali della caffeina. Nella figura seguente (4.38) vengono mostrati i segnali di due gruppi metilici della molecola.

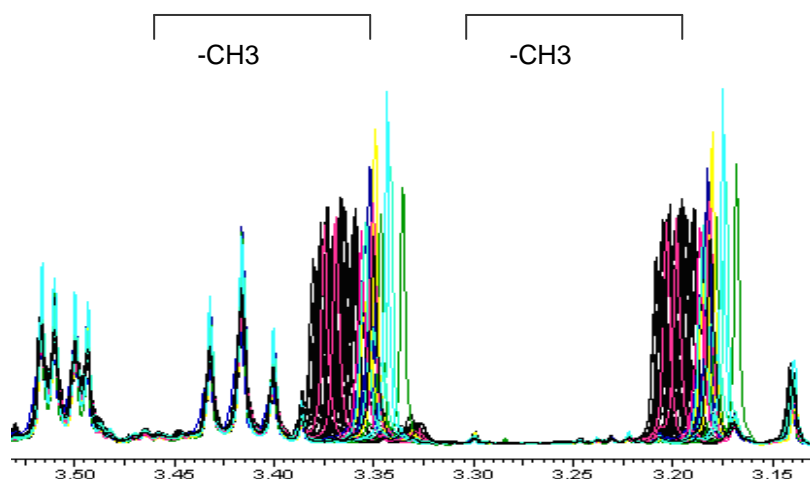


Figura 3.62.: espansione dello spettro tra 3.52 e 3.13 ppm

In particolare i campioni che presentano delle differenze significative nei valori di questo spostamento sono quelli di caffè Africano e del Brasile come mostrato nell'ingrandimento (figura 3.63).

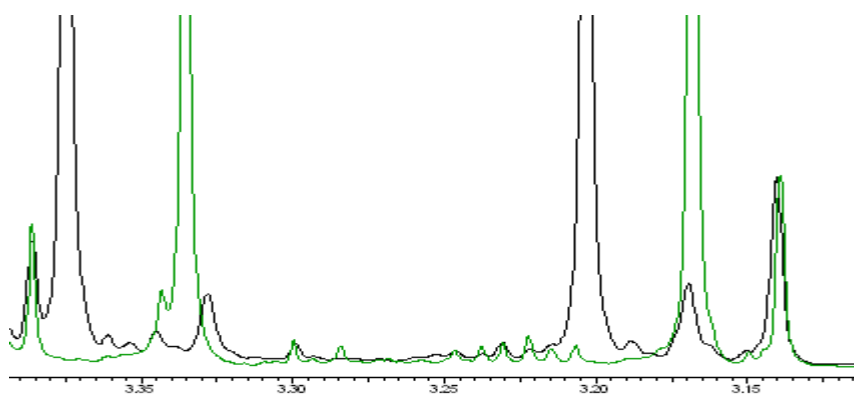


Figura 3.63: ingrandimento della zona relativa a due metili della caffeina di un campione brasiliano (in nero) e di un campione africano (in verde).

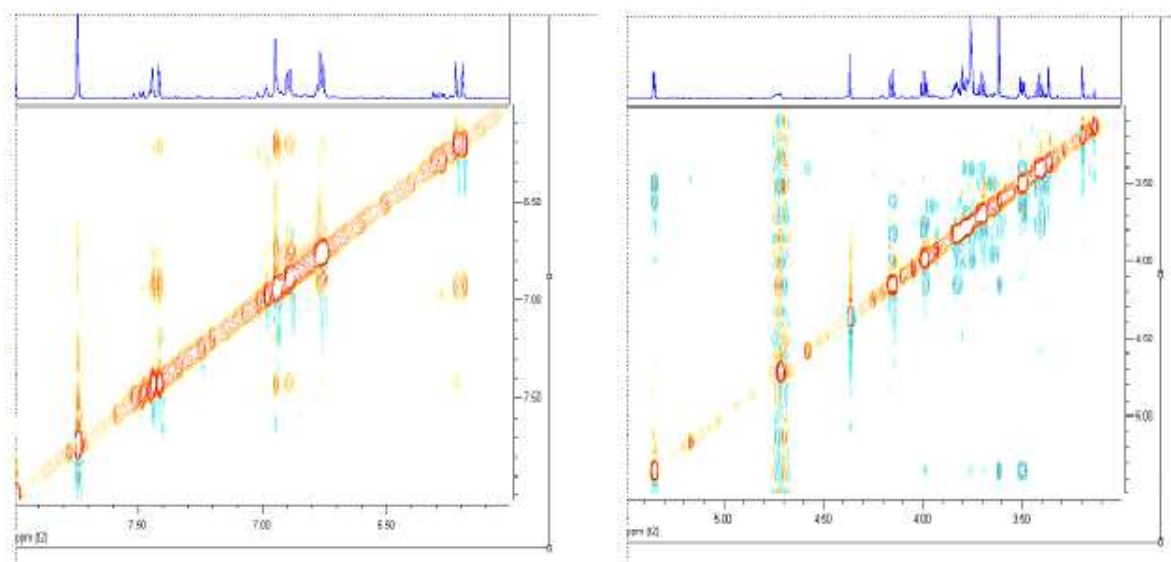
Dopo aver verificato che lo shift non dipende dal pH dell'estratto si è cercato di interpretare queste differenze. Lo spostamento potrebbe dipendere da diversi fattori come la diversa concentrazione

della molecola o dal fatto che essa possa formare complessi con altre sostanze. In letteratura infatti è riportato che la caffeina possa formare complessi sotto forma di sali potassici con l'acido clorogenico. Partendo quindi da tale considerazione, è stato eseguito uno spettro NOESY sia in un campione proveniente dal Brasile (figura 3.64) che su uno proveniente dall'Africa, quelli cioè che presentavano le maggiori differenze di risonanze dei picchi della caffeina.

Prima di fare ciò abbiamo determinato l'andamento del rapporto tra l'area dell'integrale di un segnale dell'acido clorogenico e un segnale metilico della caffeina. Il valore medio ottenuto è risultato circa uno per i campioni del Brasile e circa il doppio per i campioni africani che presentavano comunque il valore in assoluto più alto fra tutti i campioni esaminati.

L'integrazione dei picchi dello spettro consente di precisare che questo diverso rapporto dipende dalla maggiore concentrazione di caffeina nel caffè brasiliano rispetto a quello africano e dalla minore concentrazione di acido clorogenico (isomero predominante con doppietto a 7.44) nel caffè brasiliano rispetto a quello africano.

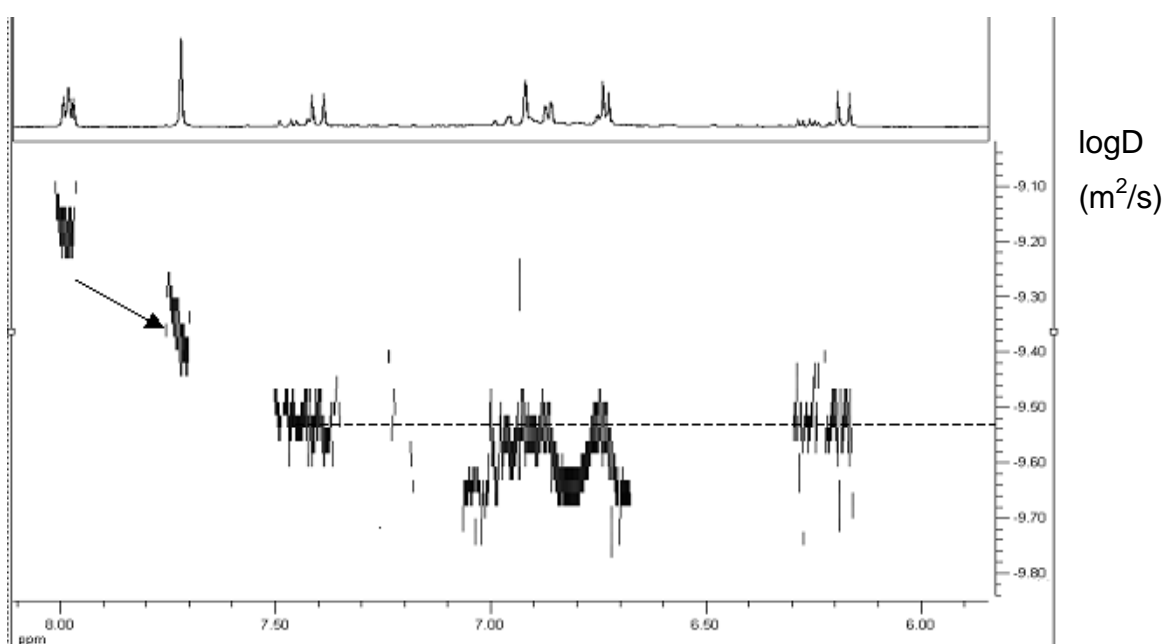
Nello spettro NOESY non sono stati evidenziati cross picchi di interazione dipolare tra i protoni della caffeina con alcun protone dell'acido clorogenico risultato che non avvalorava l'ipotesi di un'interazione tra i due composti.



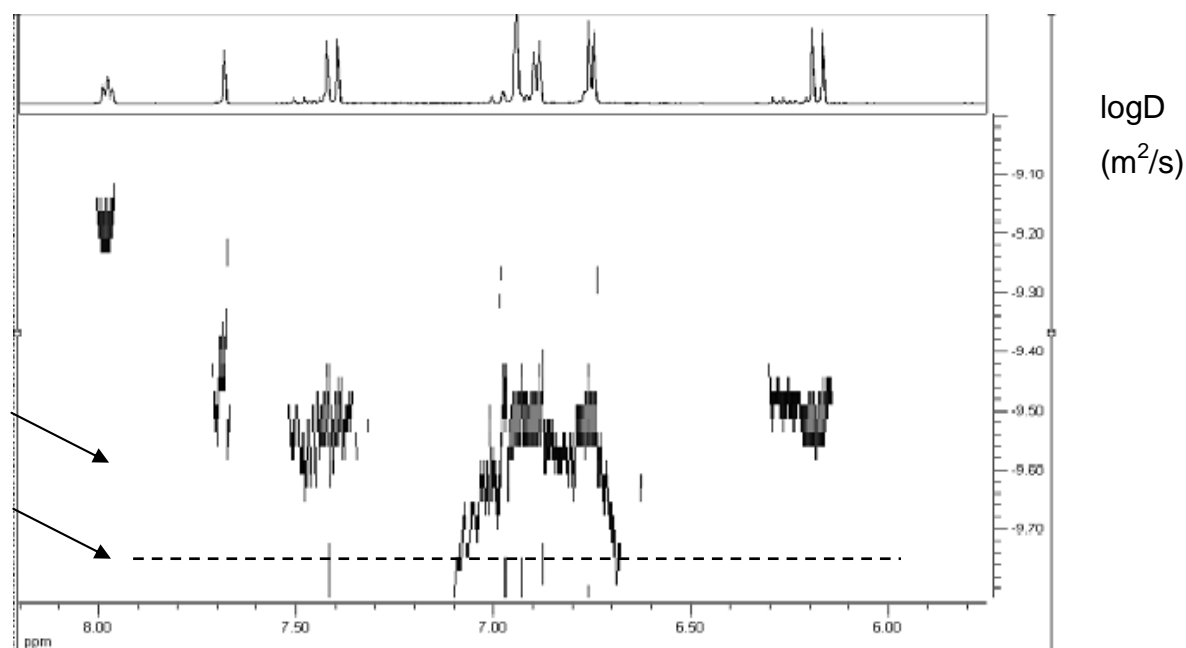
**Figura 3.64:** porzioni dello spettro noesy dell'estratto acquoso di campione del Brasile.

L'interazione dipolare tra i protoni dell'acido clorogenico dà origine a cross picchi positivi, in fase con la diagonale (evidenziato con una rappresentazione rossa del picco). Dalla teoria su cui si basa un esperimento di questo tipo e considerando la frequenza dello spettrometro utilizzato in questo studio sappiamo che cross picchi positivi in soluzioni acquose sono originati da molecole di grande peso molecolare, maggiore di 1000 Da. La presenza di cross picchi positivi pertanto è di difficile interpretazione; l'unica spiegazione possibile è quella che l'acido clorogenico si presenti in forma aggregata. Al contrario, la regione relativa agli zuccheri mostra cross picchi di segno negativo in accordo con il coefficiente di diffusione e dimensioni che li caratterizzano.

Lo spettro NOESY eseguito su un campione di origine africana presenta risultati molto simili. Per confermare l'ipotesi della possibile presenza di aggregati di acidi clorogenici sono stati condotti esperimenti DOSY che danno informazione sul coefficiente di diffusione delle molecole in soluzione. Nelle seguenti figure sono riportate due zone espanse di esperimenti DOSY condotti su un campione proveniente dal Brasile (fig. 3.65) e dall'Africa (fig.3.66).



**Figura 3.65:** spettro DOSY di un campione brasiliano



**Figura 3. 66** : spettro DOSY di un campione africano

Nella tabella I vengono riportati i valori dei coefficienti di diffusione determinati da questi esperimenti:

Coefficienti di diffusione ( $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ )			
	ppm	Brasile	Etiopia
Trigonellina	9.03	6.64	6.53
Caffeina	7.72	4.26	4.00
	7.68		3.09
Acido clorogenico	7.48	3.12	3.14
Saccarosio	5.35	3.86	3.84
Acqua	4.7	17.8	17.8

**Tabella I:** coefficienti di diffusione di alcune molecole nei due campioni

In entrambi i campioni, l'acido clorogenico è la molecola in soluzione che mostra il coefficiente di diffusione più basso. Le molecole di trigonellina, acqua e saccarosio mostrano coefficienti di diffusione identici nelle due soluzioni. Una differenza interessante invece si osserva in corrispondenza del picco a circa 7.70 della caffeina. Nel campione del Brasile, la caffeina presenta un unico coefficiente di diffusione tipico di una molecola libera in soluzione, mentre nel campione dell'Africa è presente anche un picco della caffeina con coefficiente di diffusione simile a quello dell'acido clorogenico. Questi dati fanno supporre che nel campione di caffè africano parte della caffeina sia complessata con l'acido clorogenico mentre nel campione Brasiliano la stessa sia presente solo in forma libera.

### 3.3.3. Analisi statistica

Lo scopo di questo lavoro è quello di determinare se sia possibile discriminare l'origine geografica del caffè verde mediante NMR e analisi statistica multivariata, PCA e PLS-DA. A tale scopo sono state valutate distintamente le tre matrici di dati costituite dai profili degli spettri NMR ottenuti dall'estratto organico e acquoso dei 48 campioni di caffè a disposizione.

#### 3.3.3.1. Analisi statistica degli spettri protonici in cloroformio.

I primi risultati ottenuti dall'analisi delle componenti principali, condotta considerando le risonanze dei composti non attribuibili agli acidi grassi, non hanno portato alla differenziazione tra i campioni con diversa provenienza geografica (*score plot* non mostrato). Il modello statistico creato tuttavia racchiude il 50% della varianza totale. Per incrementare il valore della varianza spiegata dal modello statistico, ( $R^2X$ ), si è proceduto selezionando le risonanze che contribuiscono maggiormente a tale analisi, escludendo quelle con un coefficiente predittivo  $Q^2$  nullo o negativo, e successivamente valutando un eventuale trend di tali variabili dipendente dall'origine geografica dei campioni.

Considerando quindi un set di 12 risonanze si effettua un'analisi PLS-DA. Tramite questo tipo di analisi il software crea delle *variabili responso* identificative ogni classe, e ne rende massima la differenziazione.

In questa analisi sono stati esclusi i campioni appartenenti all'Asia e all'Africa dei quali non si era in possesso di un numero di campioni statisticamente significativo. Lo *score plot* mostrato in figura 3.66 tiene conto di quattro classi rappresentati dei campioni di caffè provenienti dall'America e

spiega il 70% della varianza totale.

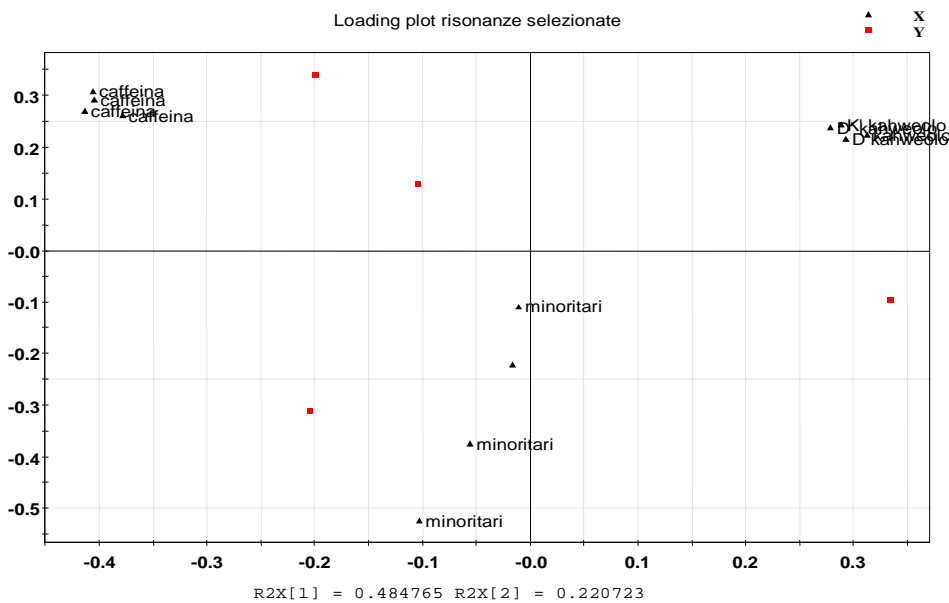
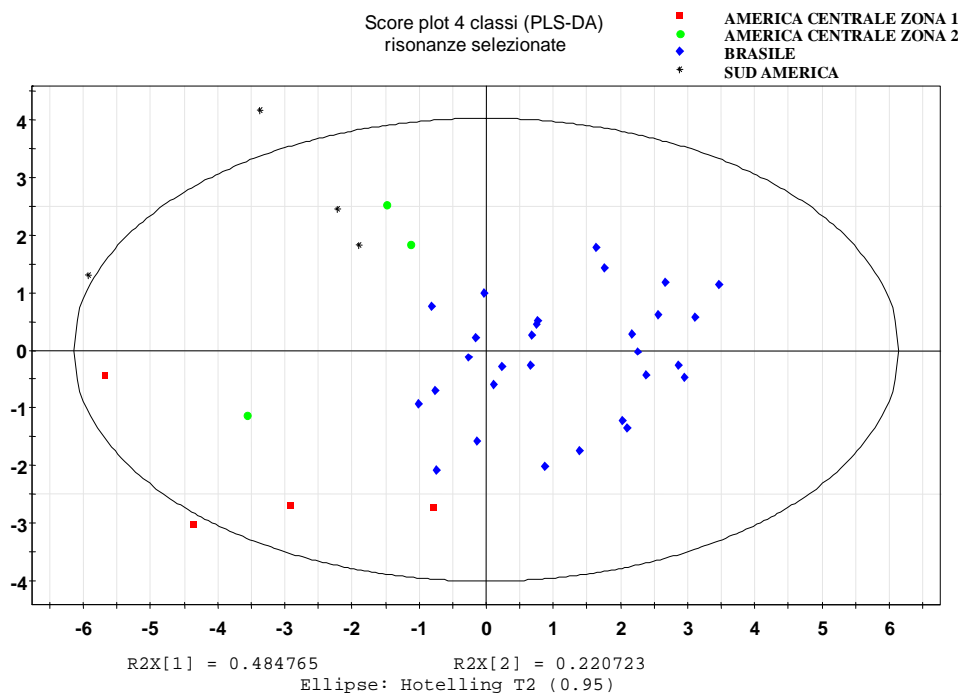
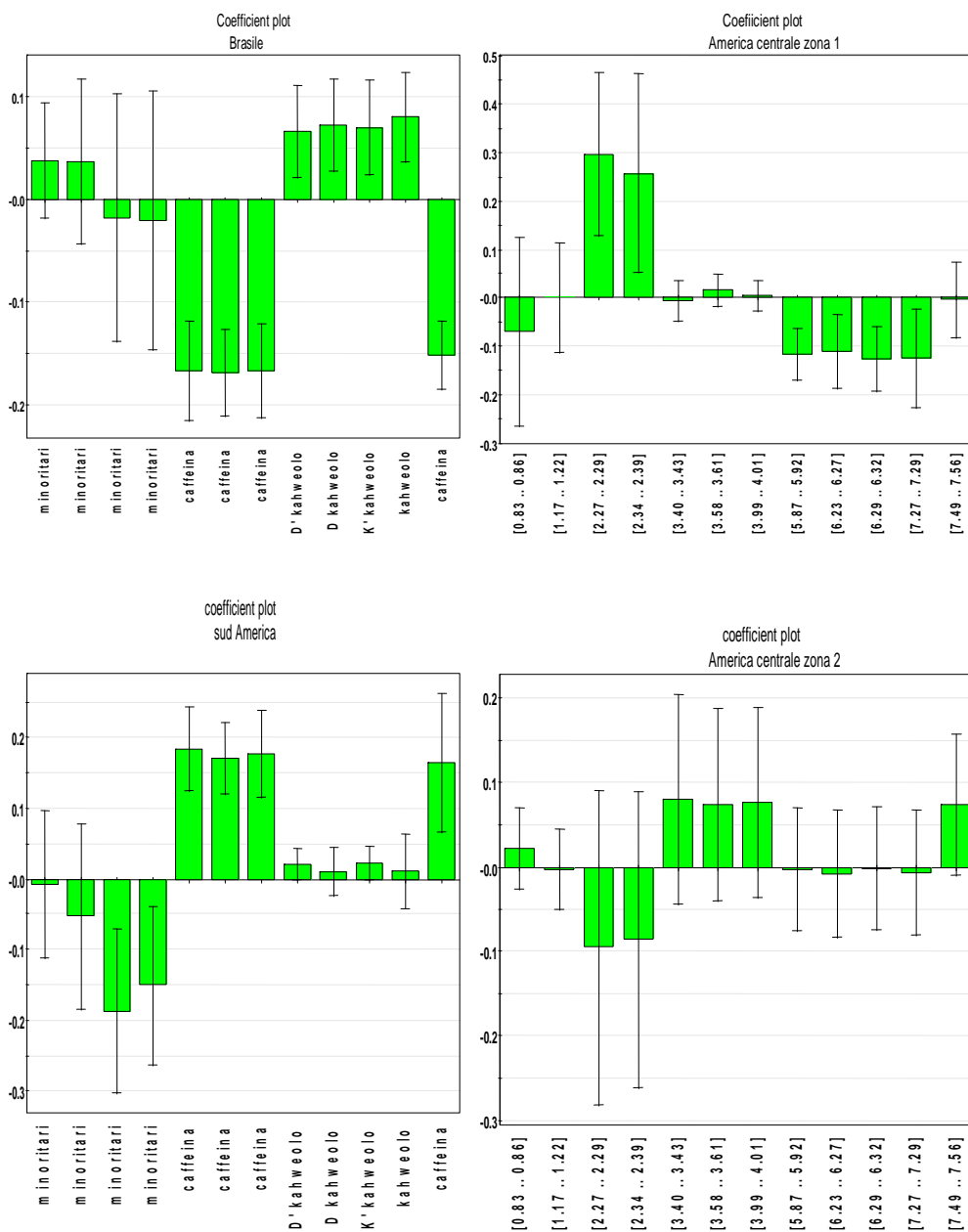


Figura 3.67: score plot e loading plot 4 classi, risonanze selezionate.

Considerando la proiezione delle variabili su una retta passante per il centro degli assi si valuta l'importanza di ogni variabile per la definizione di ogni variabile responso identificativa delle classi considerate, mentre è possibile determinare l'importanza assoluta di ogni variabile nella differenziazione tra le classi considerate nell'analisi (grafico VIP), non mostrato.

La prima componente principale del modello PLS-DA creato permette di differenziare i campioni del Brasile da quelli appartenenti alle altre tre classi considerate. Dall'interpretazione del *coefficient plot* mostrati in figura 3.67, si evince che la classe Brasile correla positivamente con la variabile kahweolo e negativamente con le altre variabili, principalmente caffeina.



**Figura 3.68:** grafico dei coefficient plot 4 classi

Allo stesso modo le classi Sud America e America centrale zona 2 correlano positivamente con la variabile caffeina e negativamente con le altre variabili ma appaiono molto simili tra di loro. La classe America centrale zona 1 è caratterizzata da un elevato contenuto delle variabili non identificate (minoritari) con risonanze (2.34-2.39 ppm) e (2.27-2.29 ppm), da un contenuto di caffeina mi-

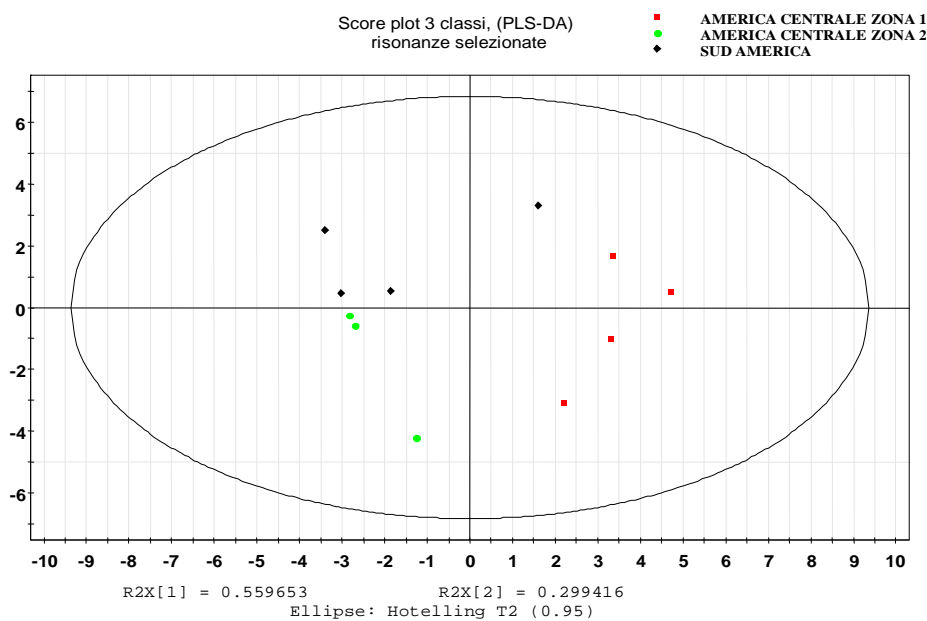
nore rispetto alle classi sud America e America centrale zona 2; infine correla negativamente con la variabile kawheolo.

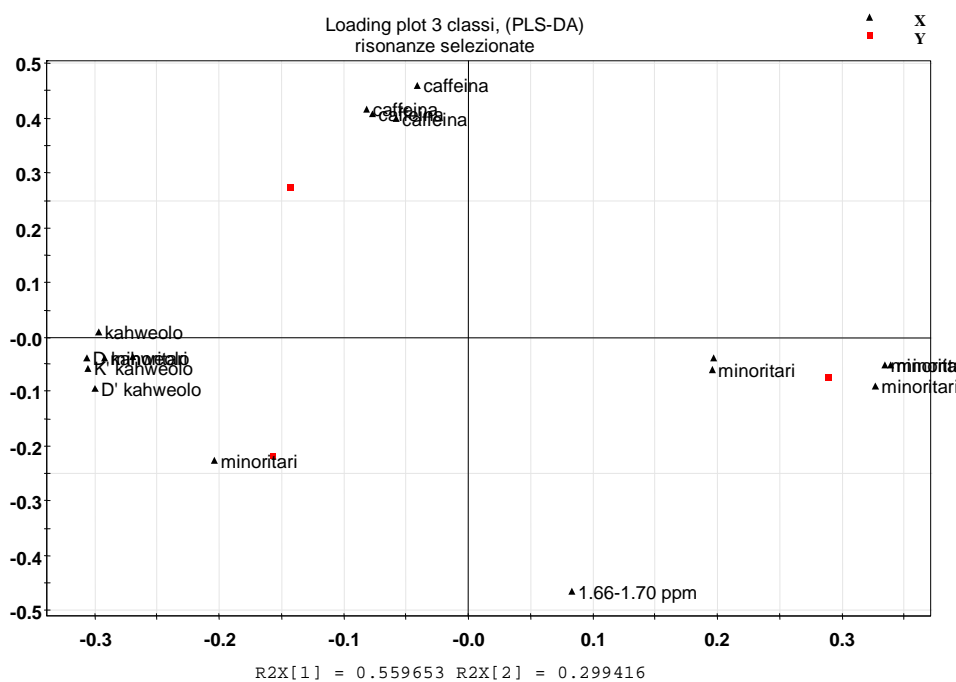
Dalla classification list tuttavia i risultati sono i seguenti:

classe	numero campioni considerati	correttamente classificati	classe assegnata
Brasile	29	29	
Sud America	4	4	
Am. centrale zona 1	4	3	1, Brasile
Am. centrale zona 2	3	1	1, Brasile; 1, Am.zona1

Escludendo la classe America centrale zona 2 la classificazione viene fatta in maniera corretta (dati non mostrati).

Affinché l'analisi PLS-DA abbia maggiore rilevanza statistica si considera un ulteriore modello che tiene in considerazione le tre classi costituite da un numero di campioni confrontabile escludendo la classe più numerosa, quella che comprende i campioni del Brasile.





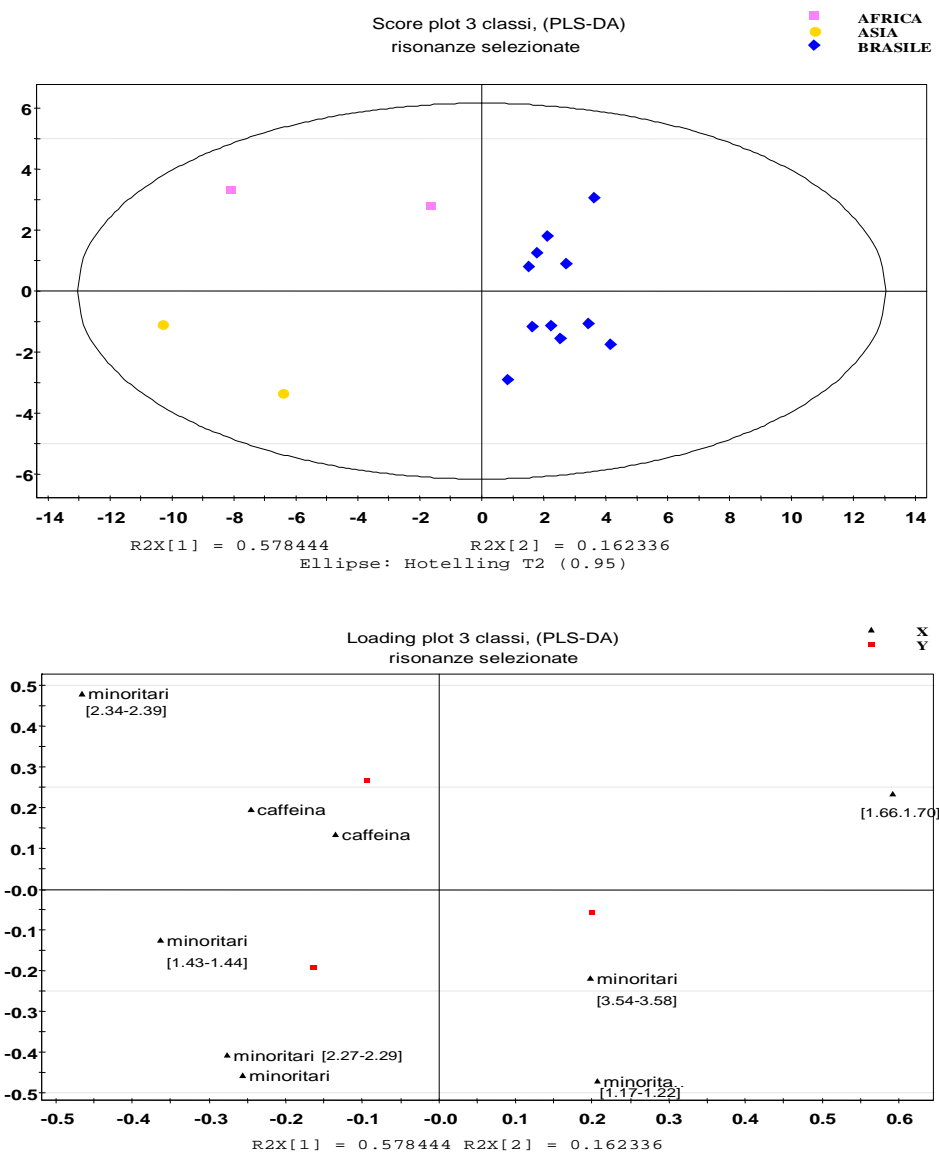
**Figura 3.69:** score plot e loading plot classi America centrale zona 1, 2 e del sud

Il modello di analisi creato spiega circa l'80% della varianza totale mostrando un'elevata accuratezza statistica. Le variabili direttamente responsabili della differenziazione dei campioni del centro America (zona 1 e 2) da quelli del sud America visualizzate interpretando il *coefficient plot* (non mostrato) e il *loading plot*, sono la caffeina e un segnale riconducibile ad un composto non identificato a 1.66-1.70 ppm. Tale composto in particolare contribuisce in maniera significativa nella definizione della PC2, caratterizzando i campioni centro americani; la caffeina invece caratterizza quelli del sud America. La prima componente principale invece differenzia i campioni appartenenti al centro America delle zone 1 e 2; in particolare i campioni della zona 2 sono caratterizzati da un contenuto di kawheolo e del composto [1.70-1.76 ppm] maggiore rispetto a quelli della zona 1, i quali invece presentano concentrazione maggiore dei composti minoritari corrispondenti alle risonanze [1.10-1.13 e 1.17-1.22 ppm] e [2.25-2.27, 2.27-2.29, e 2.34-2.39 ppm].

Con questo modello statistico i campioni del centro America zona 1 vengono correttamente classificati come appartenenti a questa classe, per il sud America 3 campioni su 4 vengono correttamente classificati, mentre per il centro America zona 2 solo 1 campione su tre viene correttamente classificato. Estendendo l'analisi PLS-DA anche ai campioni appartenenti all'Africa e all'Asia si sono costruiti diversi modelli di analisi statistica.

Per quanto riguarda la discriminazione tra i campioni africani e asiatici rispetto a quelli del Brasile è stato considerato un modello di PLS-DA rappresentato nello score plot in figura 3.70. Il numero di

campioni che costituisce la classe Brasile è stato volutamente ridotto, per ridurre la differenza di numerosità tra le classi considerate. Il modello statistico costruito tenendo conto di tutti i campioni della classe Brasile, non fittava bene i dati.



**Figura 3.70:** score plot e loading plot classi Asia, Africa e Brasile (10 campioni)

Le due componenti principali racchiudono circa il 74% della varianza, sebbene la PC2 ne abbia solo il 16%. La differenziazione tra la classe Brasile rispetto alle altre due appare evidente; tale classe correla positivamente con la variabile (1.66-1.70; 3.54-3.58; 1.17-1.22) e negativamente con tutte le altre. La differenziazione tra la classe Asia ed Africa è valutata dal valore della PC2. La classe Africa in particolare correla positivamente con la caffeina e col composto a 2.34-2.39 ppm, negativamente con tutti gli altri; la classe Asia correla positivamente con i composti che risuonano a 2.27-2.29 e 1.43-1.44 ppm. Dalla classification list i campioni vengono correttamente classificati.

### 3.3.3.2. Analisi degli spettri al $^{13}\text{C}$ dell'estratto in cloroformio

La correlazione tra il contenuto di acidi grassi e l'origine geografica è stata già valutata in matrici vegetali come l'olio d'oliva e la soia. In questo lavoro si è cercato di valutare tale relazione per il caffè verde.

Dall'integrazione manuale degli spettri dei 48 campioni si è costruita una matrice di dati contenente 65 variabili, associate ad altrettanti segnali attribuibili ai trigliceridi presenti nell'estratto organico. I dati così ottenuti sono stati valutati attraverso un'analisi statistica PCA preliminare, al fine di selezionare solo le risonanze più informative.

Con un data set di 29 risonanze l'analisi di PLS-DA ottenuta determina un modello statistico che spiega il 35% della varianza totale, poco significativo, ma che permette di evidenziare il trend generale che caratterizza i campioni. (Dati non mostrati)

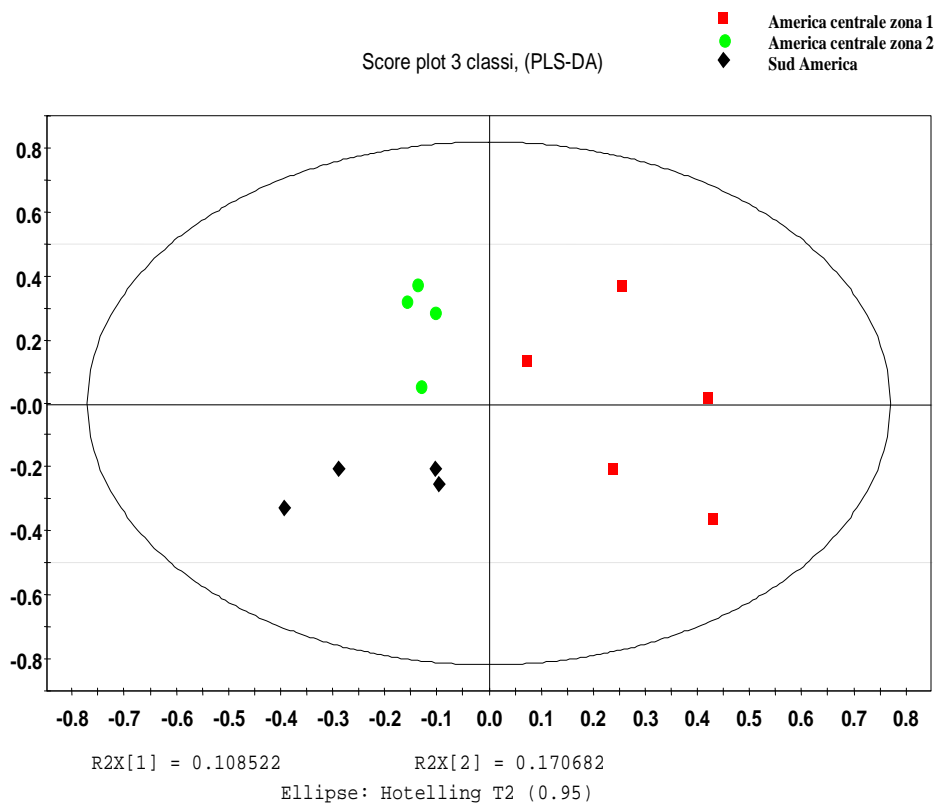
In particolare la classe Brasile correla positivamente con le variabili attribuibili all'acido oleico, le classi restanti sono caratterizzate da un contenuto di acidi polinsaturi e saturi molto maggiore.

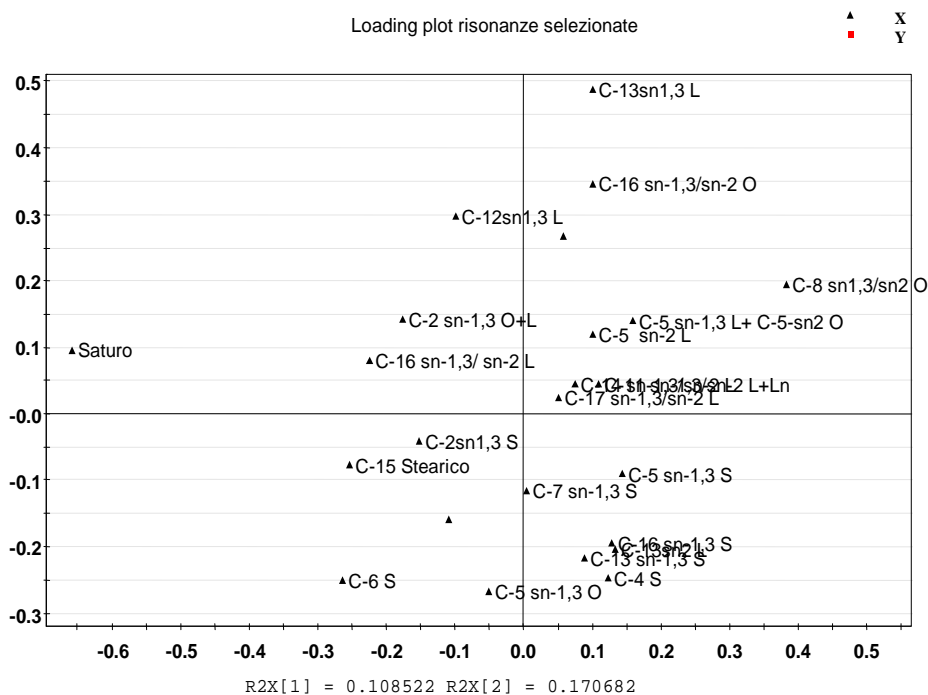
Per migliorare il modello statistico si procede selezionando solo 4 classi, escludendo quindi quelle contraddistinte da soli due campioni ognuna, e selezionando le risonanze importanti per la proiezione del nuovo modello di PLS-DA.



Il modello ottenuto spiega circa il 30% della varianza totale, e la sua rilevanza statistica non è attendibile poiché l'omogeneità in numerosità delle classi non è confrontabile. I campioni brasiliani si dispongono secondo la PC1 in maniera nettamente separata rispetto a quelli del centro America e sud America. La classe Brasile infatti correla positivamente con i segnali riconducibili all'acido oleico, senza distinzione nella posizione di esterificazione sul glicerolo, e con dei segnali riconducibili ad acidi grassi saturi. A caratterizzare i campioni appartenenti alle classi sud America, centro America zona 1 e 2, in questo modello statistico, è una maggiore concentrazione di acido linoleico.

Escludendo la classe Brasile, e considerando le stesse risonanze è stato ottenuto un modello di analisi statistica PLS-DA al fine di valutare le differenze tra i profili degli acidi grassi tra i campioni del sud America e del centro America. Lo *score plot* e il corrispettivo *loading plot* ottenuti sono mostrati in figura 3.72.

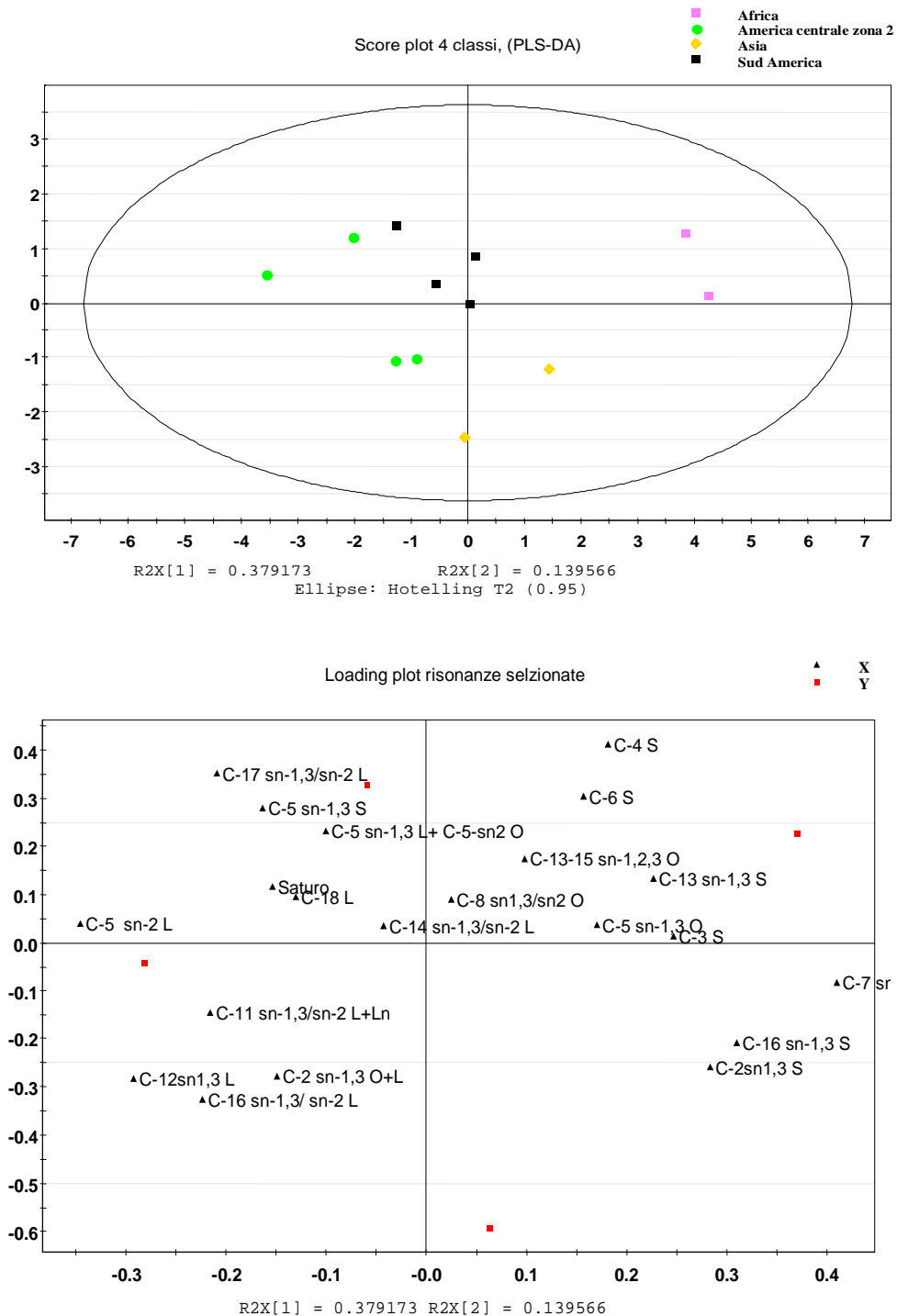




**Figura 3.72:** score plot e loading plot America centrale zona 1,2 e del sud.

Le tre classi considerate vengono nettamente separate. La prima componente principale separa la classe America centrale zona 1 dalle altre, tale classe correla positivamente con le risonanze attribuibili all'acido oleico e linoleico e con delle risonanze (C-5, C-4, C-16) attribuite ad acidi saturi. La PC2 contribuisce nella differenziazione tra la classe America centrale zona 2 e sud America spiegando un 17% della varianza totale del modello statistico. Tale differenziazione è attribuita probabilmente ad una diversa composizione di acidi grassi saturi. I campioni dell'America centrale zona 2 presentano una maggior concentrazione di acidi grassi insaturi e polinsaturi e di un tipo di acido saturo; la classe sud America è invece caratterizzata da una maggior concentrazione di un secondo acido grasso saturo e da una bassa quantità di acidi insaturi. Tale differenza potrebbe dipendere da diverse condizioni climatiche associate a tali zone geografiche come la maggiore altitudine di alcune coltivazioni a cui è associato un incremento della concentrazione di acidi polinsaturi. Tale osservazione è confermata dal confronto diretto tra le classi centro americane. Nonostante il modello creato contenga solo il 27% della varianza totale, dalla classification list i campioni di ogni classe vengono classificati in maniera corretta.

Per estendere il confronto ai campioni non appartenenti al continente americano, consideriamo il modello che tiene conto delle classi Asia, Africa, America centrale zona 2 e sud America (figura 3.73).



**Figura 3.73:** score plot e loading plot Asia, Africa, Am.centrale zona 1 e del sud.

Questo modello che spiega il 50 % della varianza totale, è notevolmente migliore di quelli creati precedentemente. La PC1 separa chiaramente la classe Africa e Asia da quelle sud America e Ame-

rica centrale zona 2. A tale separazione contribuisce il contenuto di acidi grassi saturi che correla positivamente con le classi non americane mentre è evidente il contributo dei grassi polinsaturi nel caratterizzare i caffè centro e sud Americani rispetto alle altre due classi. A differenziare tra loro le classi Asia e Africa, contribuiscono il contenuto di acido oleico, maggiore nei caffè africani, e il contenuto di acidi grassi saturi C-2, C-7, C-16 (33.93-33.95, 29.50-29.52, 31.81-31.82 ppm) che correla positivamente con la classe Asia. I modelli statistici costruiti permettono di distinguere in maniera piuttosto attendibile dei campioni di caffè provenienti da zone geografiche diverse tra di loro. A tale differenziazione contribuiscono fattori ambientali, fattori genetici direttamente influenzanti la biosintesi degli acidi grassi, e naturalmente la loro interazione. Dal confronto tra la classe Brasile Asia ed Africa si è definito un ulteriore modello statistico (dati non mostrati). La differenziazione tra le classi appare anche considerando la discrepanza tra la numerosità della classi in questione. In particolare i campioni brasiliani si differenziano rispetto a quelli asiatici e africani per il maggior contenuto di acido oleico. La classe Asia correla positivamente con l'acido linoleico in particolare con le risonanze attribuibili alla posizione *sn*-2 del glicerolo; i campioni africani invece correlano positivamente con gli acidi saturi in maniera maggiore, e con le risonanze dell'acidi linoleico relative alla posizione *sn*-1,3 del glicerolo. La classificazione dei campioni viene fatta in maniera corretta. A tale proposito la suddivisione in aree microclimatiche dell'immensa area del Brasile è un obiettivo più che ragionevole. Un'analisi di questo genere richiederebbe informazioni preliminari su cui fare opportune considerazioni.

### **3.3.3.3. Analisi statistica degli spettri dell'estratto acquoso**

L'analisi preliminare di PCA (non mostrata) tiene conto di un set di 48 campioni e 97 variabili. Il modello statistico di rappresentazione dei dati, non mostrato graficamente è mostrato graficamente spiega il 68% della varianza totale.

I campioni appartenenti al Brasile si separano in maniera evidente dagli altri. A determinare tale distinzione sono una serie di risonanze attribuibili al glucosio, probabilmente a zuccheri minoritari e a particolari isomeri degli acidi clorogenici evidenziabili nella sovrapposizione degli spettri in figura 4 48:

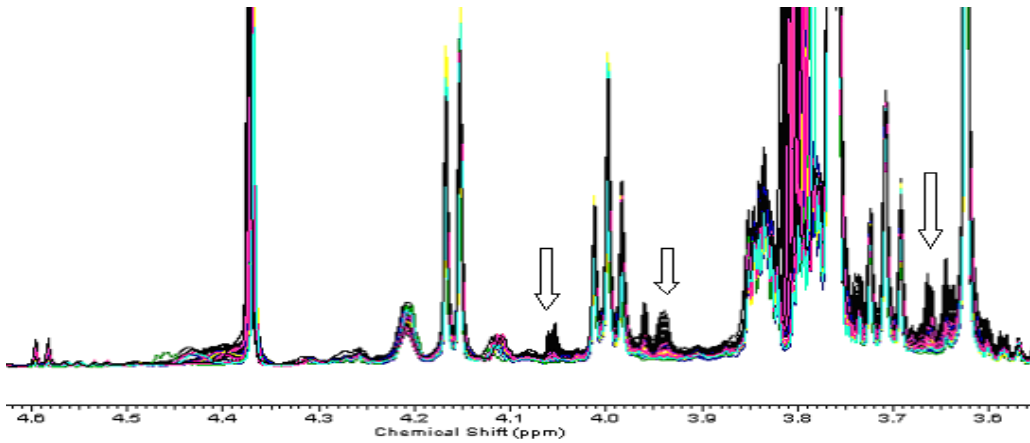
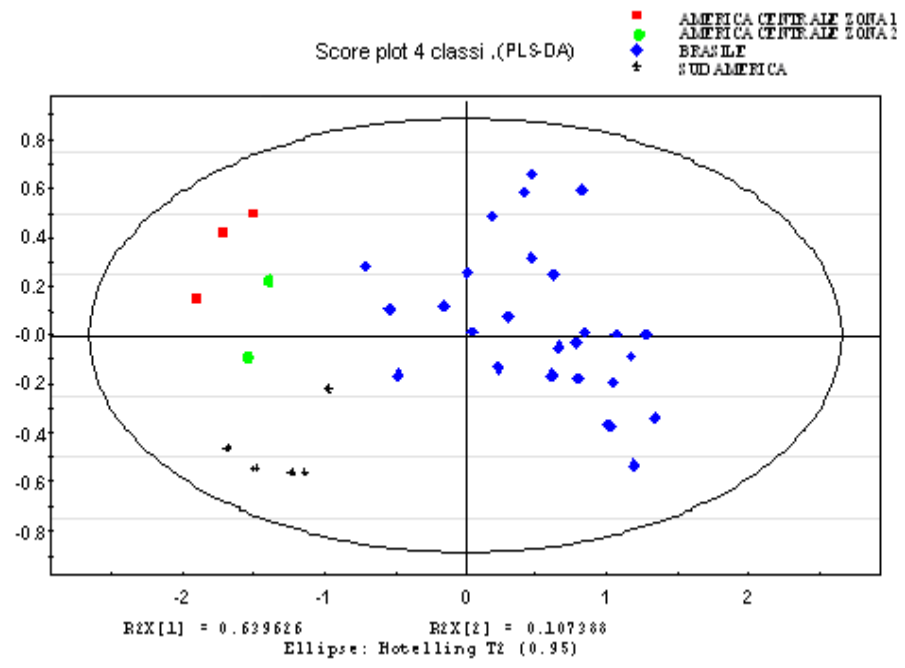
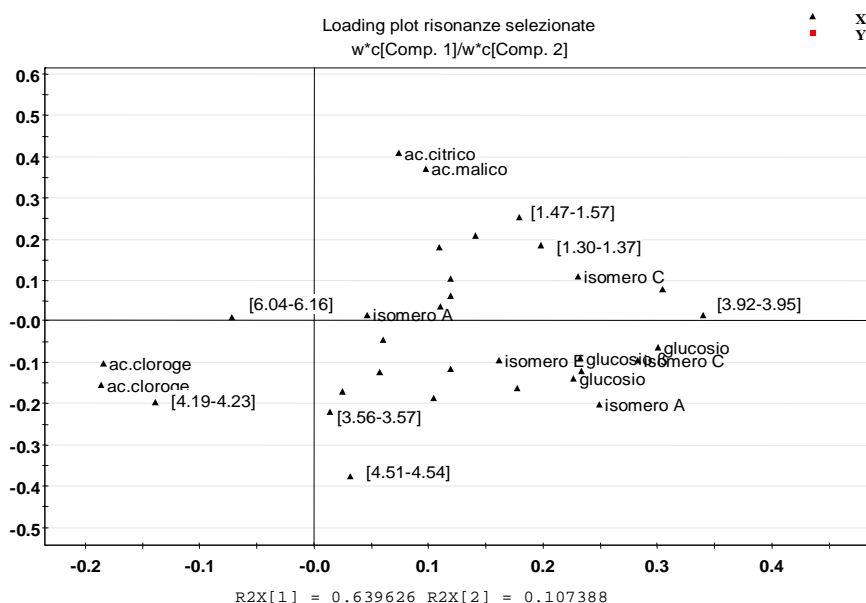


Figura 3.74: espansione dello spettro, con evidenziati alcuni segnali caratteristici del Brasile

Escludendo i campioni appartenenti alle classi costituite da soli due componenti, Asia e Africa, il modello statistico, ottenuto mediante analisi PLS-DA, è rappresentato nello score plot e loading plot seguente (figura 3.75).



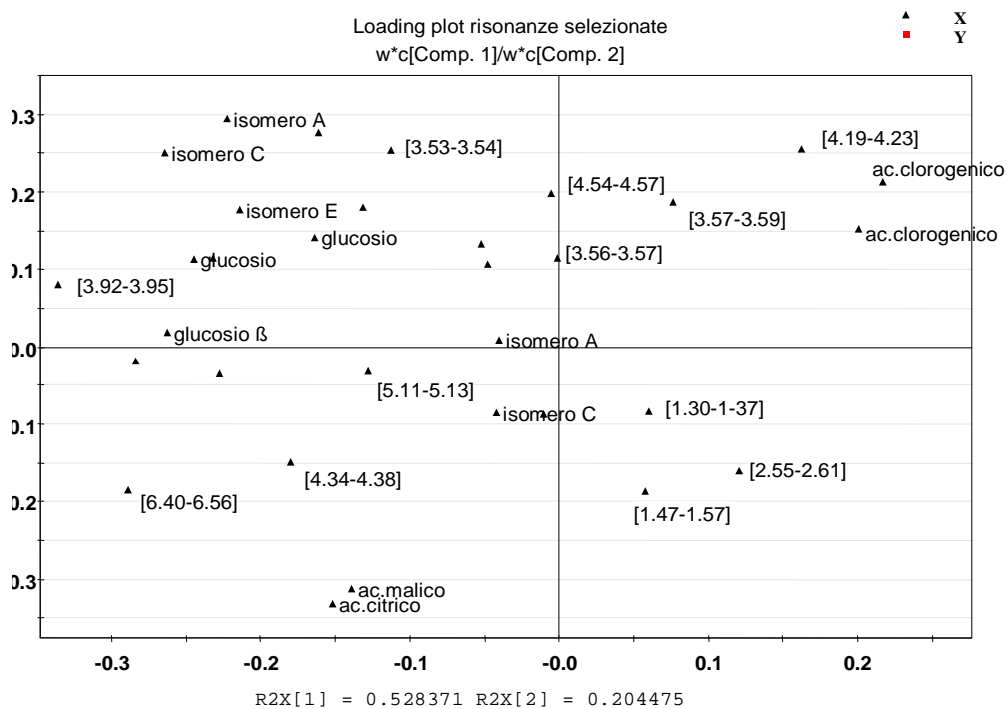
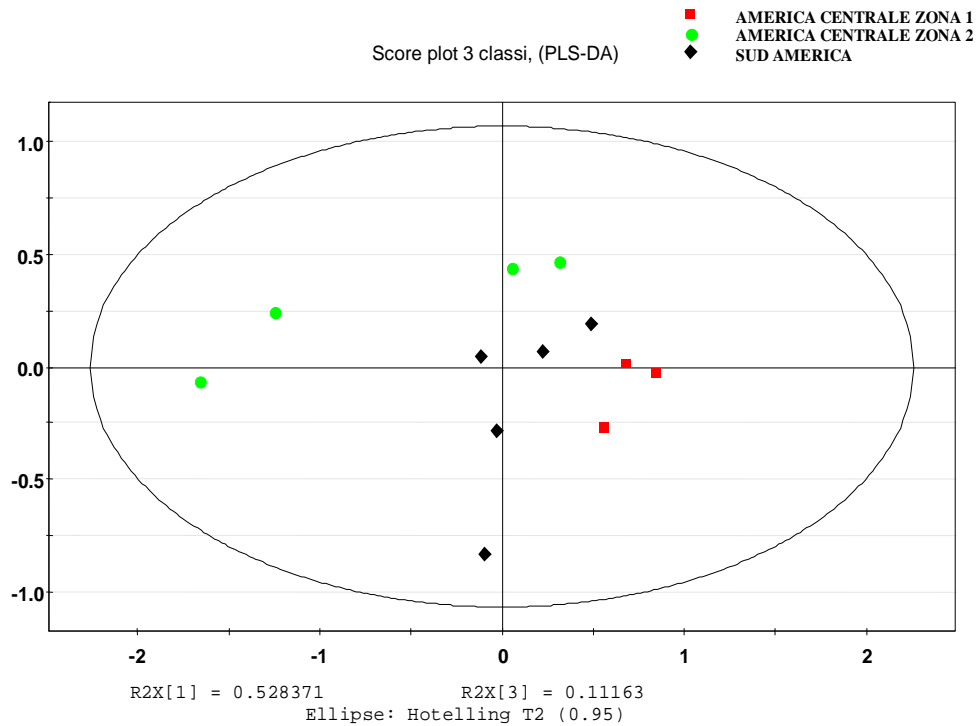


**Figura 3.75:** score plot e loading plot 4 classi americane

Il modello spiega circa il 75% della varianza totale è stato ottenuto utilizzando solamente le risonanze più significate per l'analisi e escludendo dei campioni che uscivano dal limite di confidenza fissato dal DmodX (outliers). La PC1 separa i campioni della classe Brasile dalle restanti tre classi secondo le risonanze che caratterizzano tale classe. I campioni non brasiliani infatti correlano negativamente con tali variabili e positivamente con le risonanze dell'acido clorogenico mostrando quindi un contenuto maggiore di tale variabile. La PC2 definisce una separazione abbastanza netta tra la classe sud America da quella America centrale zona 1, mentre la classe restante sembra avere delle caratteristiche intermedie. A definire tale separazione sono le risonanze del glucosio, dell'acido citrico e malico.

Dalla *classification list* i campioni appartenenti alla classe Brasile, quelli del sud America e dell'America vengono correttamente riconosciuti, mentre quelli dell'America centrale zona 1 non vengono riconosciuti come appartenenti alla classe definita. Dal confronto diretto fra due classi alla volta delle quattro prese appena in considerazione si definiscono modelli di clusterizzazione con un livello di attendibilità statistica molto elevato.

Escludendo la classe Brasile dall'analisi si costruisce il modello di PLS-DA mostrato in figura 3.76:



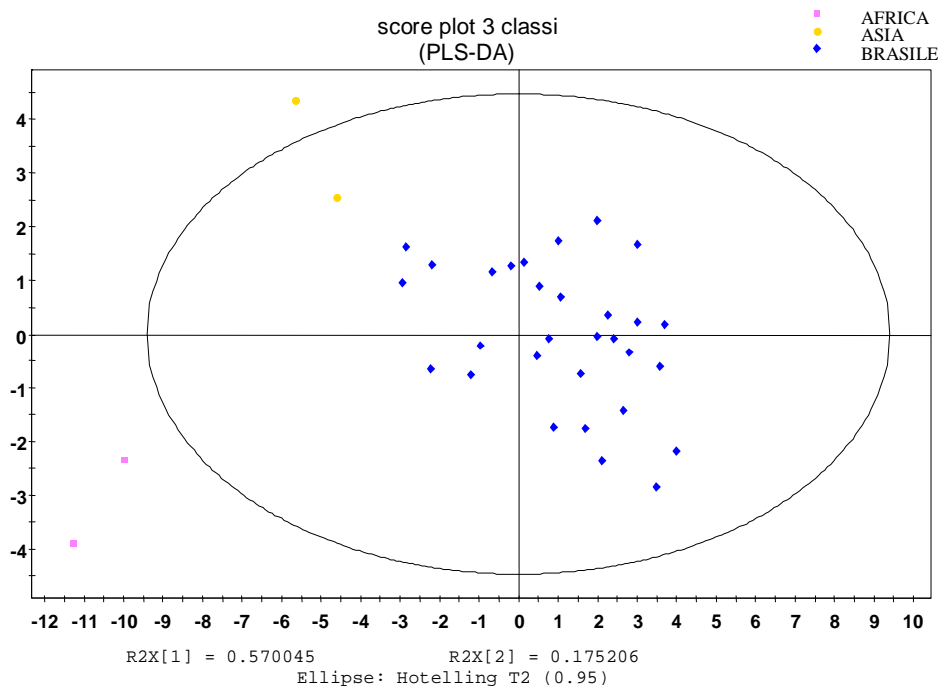
**Figura 3.76:** score plot e loading plot America centrale zona 1,2 e del sud

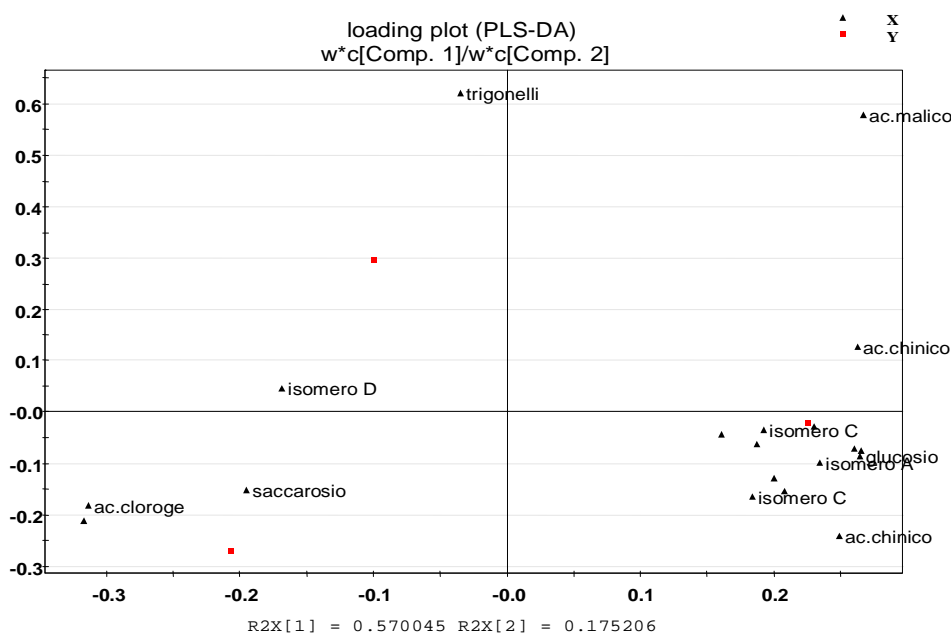
Dalla *classification list* i campioni vengono correttamente classificati come appartenenti alla classi corrispondenti.

Dall'interpretazione del *coefficient plot* si evince che la classe Sud America si differenzia per il contenuto di acidi clorogenici maggiore rispetto alle due classi, da un contenuto di acido citrico e malico molto più basso rispetto alle stesse classi, e da un contenuto di glucosio intermedio. La clusterizzazione dei campioni delle classi centro americane non è molto evidente per la presenza dei due campioni che mostrano delle caratteristiche di similarità con le altre due classi. Ciò potrebbe dipendere da errori nella procedura d'estrazione o dell'analisi NMR, o da caratteristiche particolari dei due campioni.

Il confronto della classe Brasile con l'Africa ed Asia (figura 3.77) è stato condotto considerando tutti i campioni a disposizione e un set di 14 risonanze. Nonostante la disomogeneità della numerosità delle tre classi considerate, dalla *classification list* i campioni vengono correttamente classificati.

Il modello creato racchiude nelle prime due componenti principali il 72% della varianza totale, e permette differenziare secondo la PC1 i campioni di provenienza Brasile dai restanti. Tale classe infatti correla positivamente con le risonanze identificative dei campioni brasiliani, quali glucosio, acido malico, chinico libero e composti evidenziati con la nomenclatura (isomeri), appartenenti alla classe degli zuccheri o dei clorogenici. La classe Africa correla positivamente con le risonanze relative all'acido clorogenico, (isomero predominante) essendo caratterizzata da un elevato contenuto del composto, e con la variabile saccarosio. La classe India infine è caratterizzata da un elevato contenuto di trigonellina e del composto identificato dalla risonanza (isomero D), e da un basso contenuto di acidi clorogenici e zuccheri.

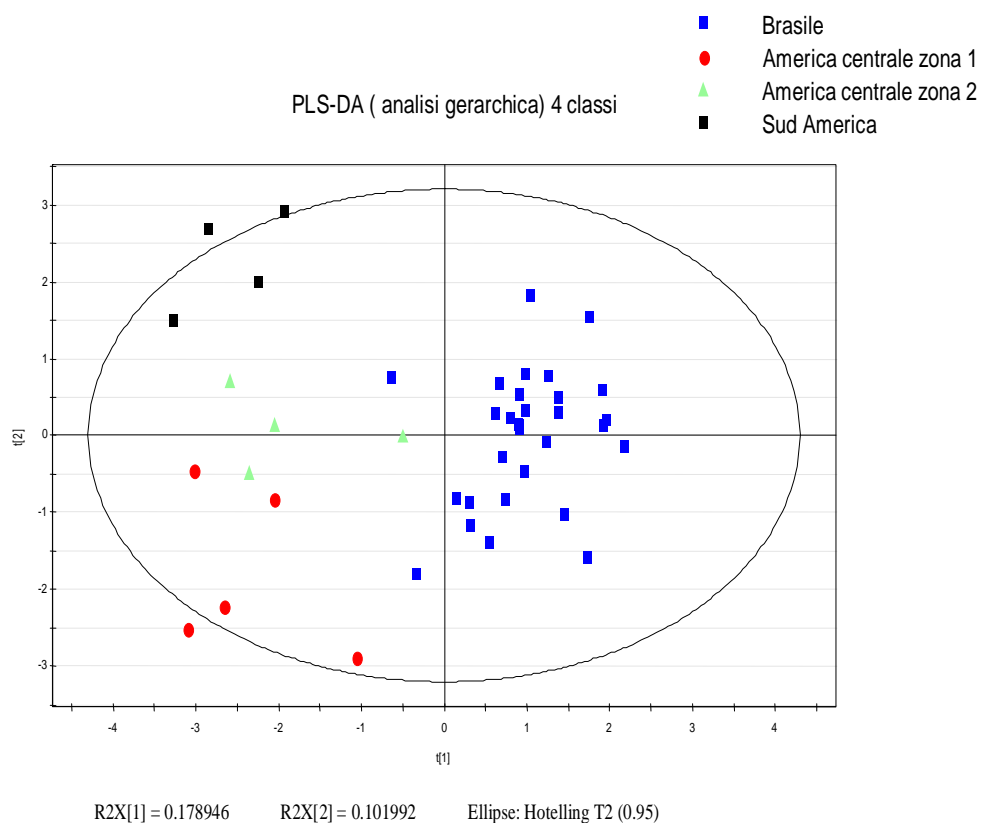




**Figura 3.77:** score plot e loading plot campioni del Brasile, Asia ed Africa

### 3.3.3.4. Creazione di un modello finale

Dall'analisi statistica condotta sui componenti minoritari, sull'estratto acquoso e sui segnali degli acidi grassi sono state selezionate le risonanze associate alla differenziazione delle 6 classi geografiche considerate. Ciò ha permesso la costruzione di un ulteriore e ultimo modello di analisi statistica basato su un metodo di analisi gerarchica. Attraverso tale metodo le variabili che costituiscono il training set vengono divise in blocchi e su ogni blocco vengono costruiti dei modelli di analisi PLS-DA. Fittando i dati così ottenuti si ottengono delle "supervariabili", considerate combinazione lineare delle variabili costruite su ogni singolo blocco. Nel nostro caso i blocchi erano costituiti dalle risonanze dei composti minoritari, degli acidi grassi e del profilo acquoso. Il *loading plot* mostra la rappresentazione degli scores, su quattro classi. (figura 3.78).



**Figura 3.78.** Rappresentazione degli scores su 4 classi.

La differenziazione tra le classi è evidente, ma ci sono tre *outliers* e la varianza spiegata è molto poca. Dalla *classification list* tutti i campioni vengono classificati in maniera corretta. Il grafico delle variabili importanti nella proiezione per l'analisi gerarchica, che tiene conto delle super variabili create dal sistema, mostra che l'estratto acquoso e i segnali degli acidi grassi contribuiscono allo stesso modo nel discriminare le quattro classi.

La validazione del modello statistico ottenuto è avvenuta attraverso un test di validazione interno al sistema. Un possibile approccio per testarlo ulteriormente sarebbe procedere attraverso un test di validazione esterna.



## Cap. 4. Conclusioni

Il lavoro di ricerca presentato in questa tesi di dottorato riguarda la ricerca e lo studio di alcuni parametri indicatori di qualità nel caffè verde.

La qualità del caffè verde rappresenta il primo requisito per la produzione di un espresso ad alto valore commerciale. Attualmente i principali ambiti degli studi scientifici applicati a questa matrice sono molteplici, i principali dei quali riguardano la ricerca di markers di qualità organolettica, la determinazione del contenuto di umidità, ai quali si è aggiunto negli ultimi tempi, data la crescente pratica dell'adulterazione, lo studio per la messa a punto di metodologie per l'autenticità.

Una parte consistente del lavoro di ricerca presentato in questa tesi di dottorato riguarda in particolare l'individuazione di markers adatti a discriminare il caffè verde su base geografica.

Tramite l'utilizzo della tecnica NMR nel dominio dei tempi in questo lavoro è stato realizzato un metodo basato sull'applicazione della sequenza spin echo per la determinazione simultanea del contenuto di acqua e olio nei chicchi di caffè verde, finalizzato all'utilizzazione dei valori di tali parametri come possibili markers per la discriminazione geografica su un campione di lotti provenienti da varie aree geografiche.

L'applicazione del metodo su un campione di cinquecento lotti di caffè verde ha portato alla conclusione che la percentuale di lipidi presente nel chicco è dipendente dalla particolare origine geografica del campione di caffè verde analizzato. Tale dipendenza ha permesso mediante analisi ANOVA una distinta clusterizzazione dei campioni analizzati su base continentale.

Inoltre, il metodo sviluppato ha dato risultati può essere esteso alla determinazione di acqua e olio in semi vegetali di interesse commerciale

Un ulteriore importante indagine presentata in questo lavoro di ricerca è rappresentata dallo studio della popolazioni di mobilità protoniche dell'acqua e dei lipidi nel caffè verde mediante NMR nel dominio dei tempi, reso necessario allo scopo di confermare preliminarmente la correttezza della scelta del tempo tau usato nella sequenza spin echo.

Lo studio delle componenti acqua e olio è stato condotto analizzando le distribuzioni dei tempi di rilassamento trasversale  $T_2$  ottenute invertendo le curve sperimentali CPMG ottenute dai campioni con la trasformata di Laplace.

Nell'ambito di tale l'analisi in particolar modo lo studio della popolazione protonica relativa all'acqua è stato inoltre condotto in dettaglio, effettuando esperimenti di reidratazione graduale di chicchi essiccati.

In breve, le distribuzioni di  $T_2$  ottenute da chicchi essiccati e reidratati direttamente fino al 35% (su base secca) sia con  $H_2O$  che con  $D_2O$  e, alternativamente, per esposizione in atmosfera di umidità controllata, sono state confrontate con quelle di chicchi verdi tal quali. I dati ottenuti indicano che fino a  $\sim 10\%$  l'acqua presente nel chicco manifesta una mobilità ridotta, in quanto probabilmente adsorbita o legata con le pareti cellulari mediante ponti idrogeno. La reidratazione con acqua deuterata ha inoltre posto in evidenza il contributo dello scambio protonico al segnale osservato.

Un dato altrettanto interessante ottenuto nel corso di questo studio è rappresentato inoltre dall'osservazione che la forma dei profili di distribuzioni ottenuti per l'acqua risulta data dalla convoluzione di due popolazioni di mobilità protonica, rispettivamente centrate a 0.5 e 1 ms. Sia nel chicco verde che in quelli reidratati è stato trovato che a contenuti di acqua fino a 4% è visibile di queste due popolazioni solo quella a mobilità inferiore, mentre a percentuali intermedie sono presenti entrambe. L'evidenza di tali bande a diverso  $T_2$  in funzione del grado di idratazione del chicco potrebbe rappresentare una conferma ed è da considerarsi una possibile interpretazione in termini di mobilità protoniche dell'effetto di plasticizzazione (associabile alla componente a  $T_2$  più lunghi) e anti-plasticizzazione (componente a  $T_2$  più corti) osservati da Pittia e coll.

La conferma della dipendenza del profilo di mobilità dal contenuto dell'acqua per mezzo dell'analisi di un numero significativo di campioni di chicchi di caffè verde potrebbe avere un interessante ricaduta a livello industriale per la determinazione diretta del contenuto d'acqua proprio tramite l'osservazione del profilo di distribuzione dei  $T_2$ .

Il risultato più importante ottenuto dello studio della regione di distribuzione assegnata ai lipidi è invece rappresentato dal profilo multimodale di quest'ultima, che indica la presenza di diverse mobilità protoniche. Questa osservazione è in linea con i dati di letteratura.

Infine, un modello di analisi statistica multivariata è stato infine elaborato mediante l'analisi statistica multivariata delle risonanze NMR sia degli estratti organici che acquosi di 48 campioni di caffè verde di diversa provenienza geografica. La scarsa disponibilità di campioni dall'Africa e dall'Asia non hanno consentito di approfondire maggiormente l'analisi statistica. Questo rimane un obiettivo da perseguire nel prossimo futuro. Dai dati raccolti tuttavia è emerso che nell'estratto organico gli acidi grassi sembrano essere efficaci nella discriminazione differenziazione i campioni africani da tutti gli altri, mentre le componenti minoritarie sono efficaci nella differenziazione tra i campioni con diversa provenienza.

kahweolo correla positivamente con i campioni del Brasile, la caffeina e composti minoritari differenziano i campioni centro americani da quelli del sud America, e altri componenti minoritari non identificati che caratterizzano i campioni africani e quelli asiatici.

La caratterizzazione dell'estratto acquoso mediante esperimenti bidimensionali ha permesso l'identificazione di sistemi di spin caratteristici degli estratti protonici dei campioni di caffè brasiliano, quali zuccheri minoritari e isomeri dell'acido clorogenico.

Esperimenti di diffusione DOSY condotti sull'estratto acquoso dei campioni di origine africana è stata confermata hanno inoltre avvalorato l'ipotesi di una possibile interazione caffeina/ acidi clorogenici. In particolare i dati ottenuti fanno supporre che nell'estratto acquoso del campione africano analizzato, la caffeina è presente in soluzione sia in forma libera che complessata con l'acido clorogenico.

## Bibliografia

- [1] M.N. Clifford, Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: M.N. Clifford, K.C. Willson (eds), *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*, 305-374. Avi Publishing Company, Westport, Connecticut, USA. (1985).
- [2] R.J. Clarke, R. Macrae, *Coffee volume 1: Chemistry*, (Cap. 6, P. Folstar Lipids), Elsevier Applied Science, (1985).
- [3] A. Illy, R. Viani, *Espresso coffee: the chemistry of quality*, Academic Press (1995)
- [4] M.P. Lachance, *J. Food Safety*, **4**, 71-112 (1982)
- [5] R. Horman, R. Viani, The caffeine-chlorogenate complex of coffee, an NMR study, *Proc. 5<sup>th</sup> ASIC Coll.*, 102-111 (1971).
- [6] T. Baumann, S.S. Mosli, B. H. Schultess, R.J. Aerts, Interdependence of caffeine and chlorogenic acid metabolism in coffee, *Proc. 15<sup>th</sup> ASIC Coll.* (1993). 134-140.
- [7] L. Navarini, R. Gilli, V. Gombac, A. Abatangelo, M. Bosco, R. Toffanin, *Carbohydr. Polym.*, **40**, 71– 81 (1999).
- [8] A.G.W. Bradbury, D.J. Halliday, Polysaccharides in green coffee beans, *Proc. 12<sup>th</sup> ASIC Coll.*, 265-269, (1987).
- [9] A.G.W. Bradbury, D.J. Halliday, Chemical structure of green coffee polysaccharides, *J. Agric Food Chem.* **38**, 389-392, (1990).
- [10] R. J. Redgwell, D. Curti, M. Fischer, P. Nicolas, L. B. Fay, *Carbohydrate Research*, **337**, 239–253 (2002).
- [11] H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, 3<sup>rd</sup> edition Springer Verlag, (2004).
- [12] R.J. Clarke, O. G. Vitzthum, *Acids in coffee*, *Coffee Recent Development*, Blackwell Science Ltd. (2001).
- [13] E. Dentan, Étude microscopique du développement et de la maturation du grain de Café, *ASIC 11<sup>th</sup> Coll.* 381-398 (1985)..
- [14] A. H. C. Huang, Oil bodies and oleosins in seeds, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 177-200 (1992).
- [15] D.J. Bewley, M. Black, *Seeds. Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York & London (1994).
- [16] P. Crisafulli, F. Silizio, A. Pallavicini, L. Navarini, Poster presentation, *ASIC 23<sup>rd</sup> Coll.* (2005).

- [17] Wajda, Walczyk, “Relationship between acid value of extracted fatty matter and age of green coffee beans”, *J. Sci. Food Agric.* **29**, 377-380 (1978)
- [18] P. Folstar, W. Pilnik, J.G. de Heus, H. C. van der Plas, the composition of fatty in coffee oil and wax, *Lebensm. Wiss u Technol.* **8**, 286-288 (1975)
- [19] K. Speer, Kolling-Speer, *Lipids in coffee: Recent developments*, Blackwell Science, 33-49 (1994)
- [20] K. Speer, N. Sehat, A. Montag, Fatty acids in coffee, *Proc. 15<sup>th</sup> ASIC Coll.* 583-92. (1993).
- [21] H.G. Maier, *Proc. 15<sup>th</sup> ASIC Coll.* 291-296 (1993).
- [22] Mariani, Fedeli, Gli steroli delle specie Arabica e Robusta del caffè, *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **68**, 111-115 (1991).
- [23] T. Leroy, F. Ribeyre, B. Bertrand, P.Charmetant, M. Dufour, C. Montagnon, P. Marraccini, D.Pot., *Braz. J. Plant Physiol.*, **18** (1) 229-242 (2006)
- [24] C.T. Reh, A. Gerber, J. Prodolliet, G. Vuataz, *Food Chem.* **96**, 423–430 (2006)
- [25] J. Prodolliet in *Proc. 20<sup>th</sup> ASIC Coll* (1996).
- [26] J. Prodolliet, Authenticity of coffee, in *Food Authentication*, ed. by P.R. Ashurst and M.J. Dennis, Blackie Academic & Professional, London, 304–338 (1996).
- [27] P. Pittia, M. Dalla Rosa, C.R. Lerici, *Lebensm. Wiss u. Technol.* **34**, 168–175 (2001)
- [28 ] P. Pittia, M. C. Nicoli, G. Sacchetti, *J. of Texture Studies*, **38**, 116–134 (2007).
- [29] P. Pittia, G. Sacchetti, *Food Chem.* **106**, 1417–1427 (2008).
- [30] M.-L. Mateus, D. Champion, R. Liardon, A. Voilley, *J. Food Eng.* **81**, 572–579 (2007)
- [31] J. Diaz Santanilla, S. Gomez, G. Felsner, G. Fritsch, *Colloque Intern. Chim. Cafés Verts Torréfiés Derivés*, **6**, 172–177 (1974).
- [32] L. Rodriguez, G. Fritsch, S. Diaz, *Colloque Intern. Chim. Cafés Verts Torréfiés Derivés*, **7**, 153–158 (1975).
- [33] D. Deininger, R. Richter, *Lebensmittelindustrie*, **37**, 21–22 (1990).
- [34] J. Avelino, B. Barboza, J. C. Araya, C. Fonseca, F. Davrieux, B. Guyot, C. Cilas, *J. Sci. Food Agric.*, **85**, 1869–1876 (2005).
- [35] B. Guyot, D. Gueule, J. C. Manez, J. Perriot, J. Giron, L. Villain, *Plant. Recher. Dé Verts*, **3**, 272–280 (1996).
- [36] B. Bertrand, P. Vaast, E. Alpizar, H. Etienne, F. Davrieux, P. Charmentant, *Tree Physiol.*, **26**, 1239–124 (2006).

- [37] G., Guerrero, M. Suarez, G. Moreno, J. Agric. Food Chem., 49, 2454–2458 (2001).
- [38] B. Bertrand, D. Villarreal, A. Laffargue, H. Posada, P. Lashermes, S. Dussert, J. Agric. Food Chem., **56**, 2273–2280 (2008).
- [39] S. Casal, M. R. Alves, E. Mendes, M. B. P. P. Oliveira, M. A. Ferreira, J. Agric. Food Chem., **51**, 6495–6501 (2003).
- [40] Martin, M. J.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G.; Valdenebro, M. S.; Leon-Camacho, M. Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation. *Talanta* 2001, 54, 291–297.
- [41] F. Carrera, M. Leon-Camacho, F. Pablos, A.G. Gonzalez, *Anal. Chimica Acta*, **370**, 131-139 (1998)
- [42] A. G. Gonzalez, F. Pablos, M. J. Martin, M. Leon-Camacho, M. S. Valdenebro, HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chem.*, **73**, 93–101 (2001).
- [43] C. L. Ky, J. Louarn, S. Dussert, B. Guyot, S. Hamon, M. Noirot, Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.accessions. *Food Chem.* **75**, 223–230 (2001).
- [44] T. Joët, A. Laffargue, F. Descroix, S. Doulebeau, B. Bertrand, A. De kochko, S. Dussert, *Food Chem.* **118** 693–701 (2010).
- [45] R. M. Alonso-Salces, F. Serra, F. Reniero, K. Heberger, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4224–4235 (2009).
- [46] M.-Y. Choi, *Food Chem.* **121** 1260–1268 (2010).
- [47] Minispec application Notes n.30.
- [48] E. Brosio, E. Chiacchierini, F. Conti, C. Lintas, S. Sykora, *La rivista della Soc. italiana di Scienza dell'alimentazione*, **4** (anno 7), 309- 314 (1978).
- [49] P.S. Belton; I.J. Colquhoun; B.P. Hills, *Applications of NMR in food science*, **26**, 1-53 (1993).
- [50] K. Van Putte, J. van den Ende, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1974)
- [51] American Oil Chemist Society AOCs Official Method, Cd 16b – 93: SFC by Low Resolution Magnetic Resonance.
- [52] IUPAC Norm Version 1987: 2.150 (ex 2.323) Solid content determination in fats by NMR (Low resolution nuclear magnetic resonance).
- [53] H. Todt, G. Guthausen, W. Burk, D. Schmalbein, and A. Kamlowski, Graham A. Webb (ed.), *Modern Magnetic Resonance*, 1739 –1743.

- [54] M.S. Miskandar, Y.B. Cheman; R. Abdul Rahman; I. Noraini , M.S.A. Yusoff, *J. Food Lipids*, **11** 190 –207 (2004).
- [55] T.F. Conway, F.R. Earle, *JAOCS* **40**, 265 (1963).
- [56] P.N.Tiwari, P.N. Gambhir, T.S. Rajan, *Ibid.* **51**, 104 (1974).
- [57] P.N.Tiwari, W. Burk, *Ibid.* **57**,119 (1980).
- [58] VT. Srinivasan, *Ibid.* 56:1000 (1979).
- [59] P.N. Gambhir, A.K. Agarwala, *JAOCS (J. Am. Oil Chem. Soc)* 62:103 (1985).
- [61] G. Rubel, Simultaneous determination of oil and water contents in different oilseeds by pulsed nuclear magnetic resonance, *JAOCS*, **71** (10) 1057-1062 (1994).
- [62] P.N.Tiwari, P.N. Gambhir, *JAOCS*, **71** (9), 1017 – 1020 (1995).
- [63] ISO/CD 10565 (E), Oilseed – Simultaneous determination of oil and water contents – Method using pulsed nuclear magnetic resonance spectrometry, (1995).
- [64] Chinacoti and Krygsman, Application of low-resolution NMR for simultaneous moisture and oil determination in food (oilseed), *Current protocols in food analytical chemistry*, A1.3.1- A1.3.11. (2001)
- [65] E. Brosio, F. Conti, A.D. Nola, O. Scorano, E. Balestrieri, *J. Food Technol.*, **16**, 629-636 (1981)
- [66] Minispec Application Note n. 15.
- [67] H. B. Hickey, B. MacMillan, M. Newling, P. Ramesh, B. Van Eijck, Balcom. Magnetic resonance relaxation measurements to determine oil and water content in fried foods., *Food Res. Int.*, **39**, 612-618. (2006)
- [68] D.N. Rutledge, *Food control*, **12**, 437- 445 (2001).
- [69] I.A. Farhat. *et al.* 2003) <sup>1</sup>H NMR relaxation study of amylopectin retrogradation. In: PS Belton, AM Gil, GA Webb, D.N Rutledge (Eds). *Advances in Magnetic Resonance in Foods*. The Royal Society of Chemistry, 2003 :172–79.
- [70] H. Lechert, possibilities and limits of Pulsed Nmr Spectroscopy for investigation of problems of starch-research and starch technology. *Starke* (1976), **28** (11), 369–373.
- [71] M. Bianchi, F. Capozzi, M.A. Cremonini, L. Laghi, M. Petracci, G. Placucci, C. Cavani, Influence of the season on the relationships between NMR transverse relaxation and WHC in turkey breast, *J. Science and Agric.*, **84**, 1535 – 1540 (2004).
- [72] H. C. Bertram, M. D. Aaslyng, H. J. Andersen, *Meat Science*, **70**, 75–81 (2005).
- [73] J.E.M. Snaar and H. Van As, Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by <sup>1</sup>H NMR relaxation measurements. *Biophys. J.*, **63**, 1654 – 1658 (1992).

- [74] P. S. Belton, and R. G. Ratcliffe. NMR and compartmentation in biological tissues. *Prog. NMR Spectroscopy*. **17**, 241-279 (1985).
- [75] G. Bacic, and S. Ratkovic. Water exchange in plant tissue studied by proton NMR in the presence of paramagnetic centers, *Biophys. J.* **45**, 767-776 (1984).
- [76] F. Mariette, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **14** (3), 203-211 (2009).
- [77] B. P. Hills G. Le Floc'h, *Magn. Reson. Imaging*, **82**, 751 (1994).
- [78] B. P. Hills and B. Remigereaux, *International Journal of Food Science and Technology*, **32**, 51–61 (1997).
- [79] R. Gianferri, V. D'Aiuto, R. Curini, M. Delfini, E. Brosio, Proton NMR transverse relaxation measurements to study water dynamic states and age-related changes in Mozzarella di Bufala Campana cheese, **105**, 720 - 726 (2007).
- [80] A. Raffo, R. Gianferri, R. Barbieri, E. Brosio, *Food Chem.* **89** 149–158 (2005).
- [81] Y. Q. Song, L. Vengataramanan, M.D. Hurlimann, M. Flaum, P. Frulla, C. Straley *J. Magnetic Resonance*, **154**, 261-268 (2002).
- [82] B. P. Hills, and S. L. Duce. The influence of chemical and diffusive exchange on the water proton transverse relaxation in plant tissues. *Magn. Reson. Imaging*. **8**, 321-331. (1990).
- [83] B. P. Hills, and F. Babonneau, *Magn. Reson. Imaging*, **12**, 909 (1994).
- [84] H.J. Hennig, H. Lechert, W. Goemann, Examination of swelling mechanism of starch by Pulsed Nmr- Method., *Starke* **28** (1), 10–13 (1976).
- [85] H.J. Hennig, Nmr Investigations of Role of Water for Structure of Native Starch Granules. *Starke*, **29** (1), 1–4 (1977).
- [86] Browning pears: N. Hernandez-Sanchez, B.P. Hills, P. Barreiro, N. Marigheto, *Postharvest Biology and Technology* **44** 260–270 (2007).
- [87] B. P. Hills, S. Benamira, N. Marigheto, and K. Wright, *Appl. Magn. Reson.* **26**, 543-560 (2004).
- [88] N. Marigheto, L.Venturi, B. P. Hills, *Postharvest Biology and Technology*, **48** , 331–340 (2008).
- [89] E. Alberti, P. S. Belton, A. M. Gil, *Annual report on NMR spectroscopy*, **47** (2002).

- [90] E. Schievano, K. Guardini and S. Mammi, Fast Determination of Histamine in Cheese by NMR, *J. Agric. Food Chem.* (2009).
- [91] T. W. E. Vogels, L. Terwel, A. C. Tas, F. van den Berg, F. Dukel, and J. van der Greef
- [92] G. Le Gall, M. Puaud; I. J. Colquhoun, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 580 (2001).
- [93] P. S. Belton, I. Delgadillo, E. Holmes, J. K. Nicholson, M. Spraul, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1483 (1996).
- [94] Belton, P. S.; Delgadillo, Gil A.M.; Nicholson, J. K.; Roma P.; Casuscelli F., Colquhoun, I. J.; Dennis, M. J; Spraul, *J. Agric. Food Chem.* **35**: S52(1997).
- [95] P. S. Belton, I. J. Colquhoun, E. K. Kemsley, I. Delgadillo, P. Roma, M. J. Dennis, M. Sharman, E. Holmes, J. K. Nicholson, M. Spraul, Application of chemometrics to the <sup>1</sup>H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chem.*, **61** (1-2), 207–213 (1998).
- [96] G. Le Gall, I. J. Colquhoun, and M. Defernez, *J. Agric. Food Chem.*, **52** (4), 692–700 (2004).
- [97] Jang-Eun Lee, Bum-Jin Lee, Jin-Oh Chung, Jeong-Ah Hwang, Sang-Jun Lee, Cherl-Ho Lee, and Young-Shick Hong *J. Agric. and Food Chem.*, **58** (19), 10582-10589 (2010).
- [98] G. E. Pereira, J.-P. Gaudillere, C. van Leeuwen, G. Hilbert, M. Maucourt, Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D. <sup>1</sup>H NMR metabolite fingerprints of grape berry: comparison of vintage and soil effects in Bordeaux grapevine growing areas. *Anal. Chim. Acta* **563** (1-2), 346–352 (2006).
- [99] E. Schievano, I. Arosio, R. Lava, V. Simionato, S. Mammi and R. Consonni, Olio di oliva DOP del lago di Garda: uno studio NMR e analisi statistica multivariata, *La Rivista Italiana delle sostanze grasse*, **83**, 14-17 (2006).
- [100] E. Schievano, Pasini G., Cozzi G., and S. Mammi, Identification of the production chain of Asiago d'Alveo cheese by Nuclear Resonance Spectroscopy and Principal Component Analysis, *J. of Agric. and Food Chem.*, **56** (16), 7208-7214 (2008).
- [101] M. Anastasiadi, A. Zira, P. Magiatis, S. A. Haroutounian, A. L. Skaltsounis and E. Mikros, *J. Agric. Food. Chem.*, **57** (23), 11067–11074 (2009).
- [102] L. Viggiani, M. A. Castiglione Morelli, Characterization of wines by nuclear magnetic resonance: a work study on wines from the Basilicata region in Italy. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 8273–8279 (2008).
- [103] E. Csomos, K. Heberger, L. Simon-Sarkadi, Principal component analysis of biogenic amines and polyphenols in Hungarian wines, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3768–3774 (2002).
- [104] E. Csomos, K. Heberger, L. Simon-Sarkadi, Principal component and linear discriminant analyses of free amino acids and biogenic amines in Hungarian wines. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 8055–8060 (2003)

- [105] R.Sacchi, L.Mannina, P.Fiordiponti, P.Barone, L.Paolillo, M.Patumi and A. Segre: Characterization of Italian Extra Virgin Olive Oil Using  $^1\text{H-NMR}$  Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, **46** (10), 3947—3951 (1998).
- [106] L. Mannina, M. Patumi, N. Proietti, and A.L. Segre Geographical Characterization of extra virgin olive oils of Tuscany using high-field  $^1\text{H NMR}$  spectroscopy, *Ital. J. of Food Sci.*, **13**, 55-66 (2001).
- [107] D.A.Skoog, J.J.Leary, *Chimica analitica strumentale*, Edises, (Cap. 6), 449 -512 (1995).
- [108] Claridge, *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*, Tetrahedron Series Pergamon ed. 1999.
- [109] H.Y. Carr, E.M. Purcell, *Am. J. Physiol.* **94**, 630–638 (1954)
- [110] S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688–691 (1958)
- [111] W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery, *Numerical recipes in C*. New York: Cambridge University Press. (1994).
- [112] K.P. Whittall Analysis of NMR relaxation data. In: *Signal treatment and signal analysis in NMR*. Amsterdam: Elsevier ed.by D.N. Rutledge p 44–67 (1996).
- [113] Provencher SW. 1982. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Comput Phys Commun* 27: 213–227.
- [114] G.C. Borgia, Brown RJS, Fantazzini P. 2000. Uniform penalty inversion of multiexponential decay data. *J. Magn Reson* 147:273–285.
- [115] Barone P, Ramponi A, Sebastiani G. 2001. On the numerical inversion of the Laplace transform for NMR relaxometry. *Inverse Problem* 15:77–99.
- [116] Provencher SW. 1982. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comput Phys Commun* 27:229 –242.
- [117] G.C. Borgia, R.J.S. Brown, P. Fantazzini, *J. Magn. Reson.* **132**, 65–77 (1998)
- [118] Borgia, R.J.S. Brown, P. Fantazzini, *J. Magn. Reson.* **147**, 273– 285 (2000)
- [119] Borgia, R.J.S. Brown, P. Fantazzini, *Magn. Reson. Imaging* **19**, 473–475 (2001)
- [120] L. Venturi, P. Rocculi, C. Cavani, G. Placucci, M. Dalla Rosa, M.A. Cremonini, *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10572–10578 (2007).
- [121] C.C. Seow, P.B. Cheah, Y.P. Chang, *J. Food Sci.* 64, 576–581 (1999)
- [122] D.J. Le Botlan and I. Hèlie, *Analysis*, 22, 108-113 (1994)

- [123] B. Chaland, Mariette F, Marchal P, de Certaines J.,  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance relaxometric characterization of fat and water states in soft and hard cheese. *J. Dairy Res.* 2000; 67:609-18.
- [124] Miller, “Basic statistical methods for analytical chemistry, Part 2: Calibration and regression methods”, *Analyst*, **116** (1991).
- [125] M . Bosco, R. Toffanin, D. De Palo, L. Zatti, A.L. Segre, *J. Sc. Food Agric.* **79**, 869-878 (1999).

# Appendice I

## Descrizione del rilassometro Bruker Minispec



L'apparato Bruker Minispec *Mq20*

L'apparato di misura è complessivamente composto di tre unità: unità magnete, unità di controllo elettronico, unità gradienti.

- Unità magnete (blocco di sinistra in fig.). Contiene il magnete permanente; fra le espansioni polari del magnete è collocata la sonda (*probe*).

Sul coperchio è presente il foro per l'introduzione del tubo NMR.

La temperatura (costante) nell'unità magnete è di 40 °C. Il mantenimento della temperatura ad un valore costante è necessario in quanto la magnetizzazione dei materiali dipende dalla temperatura secondo la legge di Curie:

$$M = \frac{CB_o}{T} \quad \text{con:} \quad C = \frac{N\mu^2}{k_B}$$

dove:

N è il numero dei momenti magnetici;

$\mu$  è il singolo momento magnetico;

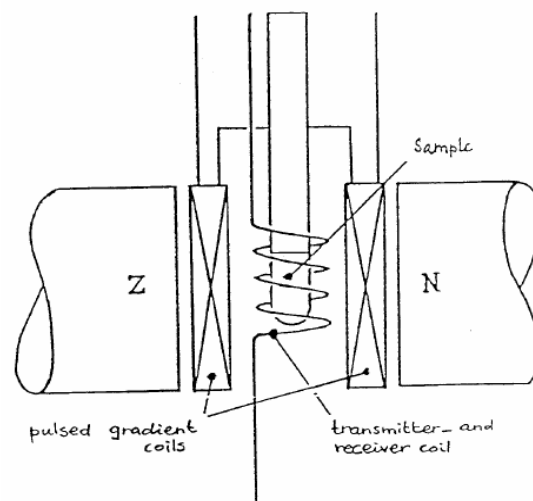
$k_B$  è la costante di Boltzmann;

$B_0$ : è il campo magnetico fisso;

T è la temperatura assoluta in K.

Il magnete è in grado di produrre un campo di 0.47 T, corrispondente ad una frequenza di lavoro per il protone di circa 20 MHz.

*Probe* (sonda). Costituisce un elemento a se stante, all'interno del quale viene collocato il tubo di misura. Contiene la spira (*coil*) che trasmette gli impulsi a radiofrequenza al campione e ne riceve il segnale. E' equipaggiato con sensori per il controllo della temperatura.



Schema generico di una sonda per il Minispec

I probe in dotazione presso il nostro gruppo di ricerca sono di tre tipi:

- Probe per misure relative per tubi di diametro 10 mm (158RV), termostatabile.
- Probe per misure assolute per tubi di diametro 10 mm (120 AVGX), termostatabile, equipaggiato di spire per la trasmissione degli impulsi a gradiente. E' quindi necessario nelle misure di diffusione.
- Probe per misure assolute per tubi di diametro 18 mm (**recuperare il nome**), non termostatabile. Quest'ultimo è dotato di una spira (coil) dal passo e dal diametro maggiore degli altri due, pertanto, è caratterizzato da un Q factor più alto e, di conseguenza, garantisce una mag-

giore omogeneità di  $B_1$ . E' consigliabile quindi per misure su quantità di campioni maggiori (fino ad altezze di riempimento 3 cm)

Il probe assoluto presenta una maggior sensibilità ed un maggior tempo morto (0.017 ms), ovvero il tempo necessario per non avere più alcun effetto residuo dell'impulso applicato. Il probe relativo presenta, invece, un minor tempo morto (0.006 ms) ed è quindi adatto per misure di campioni solidi che hanno tempi di rilassamento molto brevi o per misure in cui è importante il confronto tra il segnale relativo al rilassamento del solido e quello relativo al rilassamento del liquido

- Unità gradiente (*PGU: Pulse Gradient Unit*)

In Figura 2-1, si trova in mezzo tra l'unità magnete e l'unità di controllo elettronico.

E' l'unità preposta a rendere il campo magnetico disomogeneo in maniera controllata per le misure di coefficienti di diffusione.

- Unità di controllo elettronico (*ECU, Electronic Control Unit*)

In Figura, è l'ultimo blocco a destra a destra. E' formata da varie schede elettroniche che hanno, tra le funzioni principali, quelle di creare l'impulso a radiofrequenza in accordo con i valori impostati nell'interfaccia dall'utente.

Condizioni ambientali di funzionamento generale della macchina:

- ✓ Range di temperatura ideale 20-25° C
- ✓ temperatura minima di lavoro: 18° C
- ✓ temperatura massima di lavoro: 28° C
- ✓ Umidità non condensata: 20-80 %

## Il software del Minispec.

Il Software del Minispec è caratterizzato da un'interfaccia "friendly", ed è dotato di funzioni statistiche. Il monitoraggio dello strumento avviene tramite PC mediante connessione Ethernet.

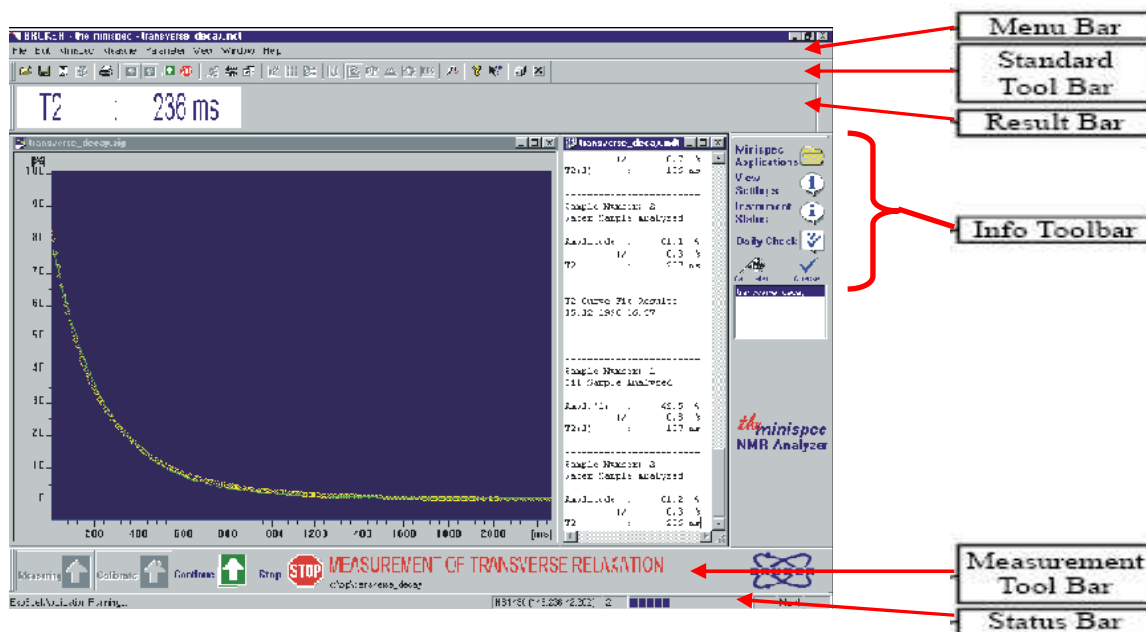
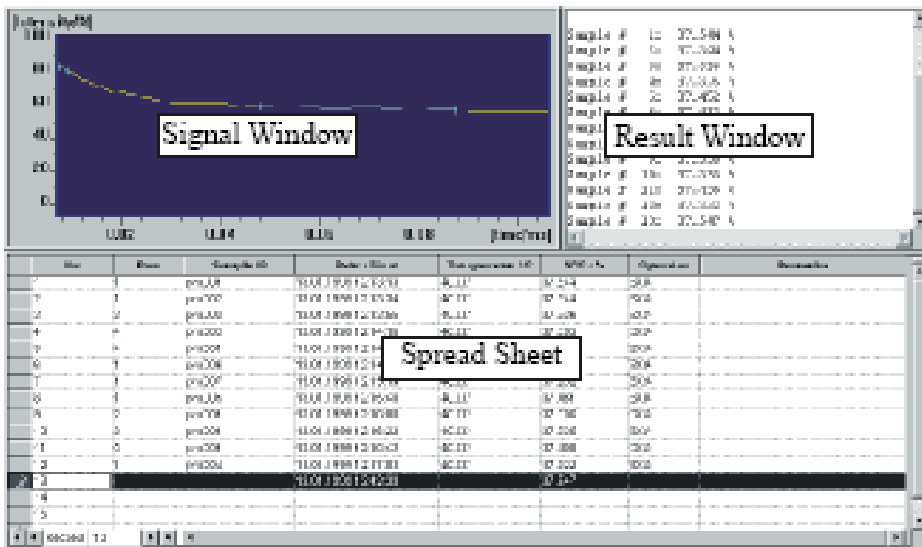


Fig. Interfaccia del programma con un'applicazione di misura già caricata.

Il caricamento dell'applicazione avviene selezionando l'icona della cartella gialla chiamata 'Minispec Applications' (Figura), presente nell'interfaccia del programma in Info tool bar contiene le sequenze NMR sottoforma di applicazioni.

All'apertura dell'applicazione, vengono visualizzate quattro finestre (Fig.):

- 'Signal Window': in questa finestra viene visualizzato il segnale NMR. Il grafico può essere salvato con estensione '.sig', oppure in formato ASCII selezionando "copy as data".
- 'Result Window': qui vengono riportati i risultati al termine della misura. I dati risultanti in questa finestra sono salvati con estensione '.mdt'.
- 'Spread Sheet Window'(compare solo se prevista nell'applicazione): ha tre funzioni: permette di inserire i dati di ingresso prima dell'avvio della misura, fornisce una lista dei risultati di misura e consente il salvataggio dei dati in formato EXCEL.
- 'Program Window': in questa finestra è contenuto il programma della particolare sequenza di impulsi (in linguaggio Exspell) dell'applicazione riguardante il tipo di misura che si vuole eseguire.



Pannelli di controllo nella schermata principale.

La tipica schermata di controllo durante una misura sperimentale, illustrata sopra, presenta alcuni pannelli in cui sono raccolte diverse opzioni. I principali sono.

- ‘Result Bar’: fornisce il risultato dell’ultima misura.
- ‘Info Toolbar’: contiene, in generale, informazioni sullo stato generale della macchina. In particolare, oltre alla cartella delle sequenze, vi si trova l’opzione di ‘Daily Check’ (che viene descritta più avanti).
- ‘Status Bar’: indica lo stato di esecuzione della misura.

Menu bar: contiene alcune opzioni tra le quali l’“Instrument settings”.

L’opzione ‘Daily Check’.

E’ una routine di diagnostica dello stato di funzionalità dell’hardware (es: temperatura, tempo morto del ricevitore, omogeneità il campo magnetico, gli angoli della spira di trasmissione e quella di ricezione, il guadagno del ricevitore, la larghezza degli impulsi a 90° e 180°, ecc.).

L’operazione di controllo con il ‘Daily Check’ è consigliato a cadenza giornaliera, allo scopo di verificare lo stato di taratura dello strumento ed eventuali problemi nell’hardware.

Il ‘Daily Check’ viene eseguito con un campione di un materiale delle caratteristiche più simili possibile a quello da analizzare. Una volta inserito il campione per il ‘Daily Check’ la routine viene avviata cliccando sull’apposita dicitura. In base allo stato di calibrazione della macchina, l’icona di ‘Daily Check’ può presentarsi in uno dei due modi mostrati sotto:



L'icona di sinistra indica che lo strumento è tarato, mentre l'altra avverte che deve essere eseguito il daily check.

L'opzione 'Update Settings'.

Per aggiornare i valori di alcuni o tutti i parametri strumentali, è possibile utilizzare l'opzione 'Update Settings' (nel Menu bar, in alto nella finestra di controllo generale).

Anche in questo caso è consigliabile che il campione utilizzato in questa ottimizzazione abbia una composizione il più possibile simile a quella del campione da misurare.

L' 'Update Settings' ottimizza i parametri della finestra 'Instrument Settings Table' (nell'Info tool bar)

Nella tabella "Instrument settings" sono presenti come parametri la durata degli impulsi a 90° e a 180°, gli angoli delle spire, il guadagno del ricevitore, il tempo tra una scansione e l'altra (RD), il campo magnetico e la sua omogeneità, la temperatura desiderata, ecc. (figura sotto)

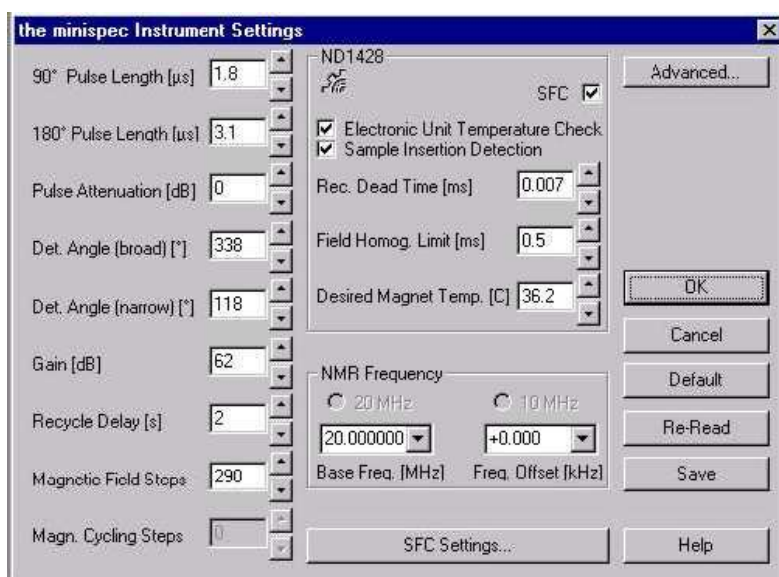


Figura maschera di controllo dell' "Instrument settings"

I parametri di controllo delle misure vengono modificati nel menù della maschera di 'Acquisition Parameter Table' (Figura).

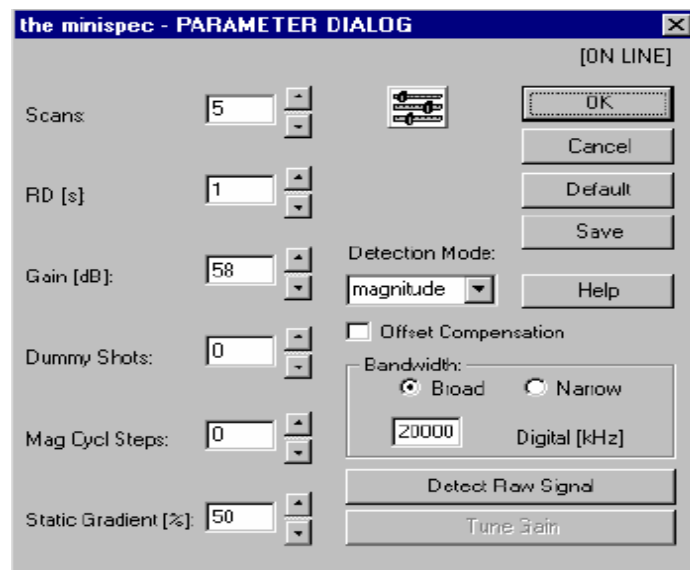


Figura . maschera dei parametri di acquisizione

I principali parametri di acquisizione che figurano nella maschera sono:

- Scans (NS): numero di scansioni; può variare tra 1 e 32000.
- Recycle Delay (RD)
- Receiver Gain (RG): il guadagno del ricevitore e può essere variato tra 40 e 119 dB.
- Dummy Shots: impulsi o sequenze che possono essere effettuate prima della registrazione del segnale. Varia tra 0 e 32000.
- Detection Mode: è la particolare modalità di acquisizione del segnale, scelta tra quattro possibili opzioni: 'Magnitude', 'Real', 'Imaginary', 'Complex'.

La rappresentazione 'Magnitude' fornisce il modulo del segnale e trascura gli effetti di una risonanza non perfetta nella visualizzazione del segnale, eseguendo la radice quadrata della somma dei quadrati della parte reale e della parte immaginaria.

La modalità 'Complex' visualizza anche la parte negativa del segnale e attraverso il comando 'FFT' del menù 'Process' permette di visualizzare lo spettro del segnale.

Le modalità 'Real' e 'Imaginary' permettono rispettivamente di visualizzare la parte reale ed immaginaria del segnale singolarmente.

Queste ultime due modalità sono importanti perché consentono di capire se il campo magnetico è stato configurato in maniera ottimale in quanto, se ciò fosse verificato, la parte

reale darebbe un segnale massimo mentre la parte immaginaria sarebbe nulla.

- Analog Bandwidth

E' la banda del ricevitore e può essere cambiata tra 'Broad' (1 MHz) e 'Narrow' (300 KHz).

'Broad' è consigliata con rilassamenti veloci, mentre la 'Narrow' quando si ha a che fare con segnali deboli per cui il guadagno deve essere elevato.

L'opzione 'Narrow' viene utilizzata con guadagni del ricevitore elevati maggiori o uguali a 100 dB.

- Digital Bandwidth.

E' un filtro digitale che può intervenire addizionalmente al filtro analogico per ridurre il rumore sovrapposto al segnale; funziona quando viene impostata una banda inferiore a quella analogica. La banda del filtro digitale può essere variata tra 0 e 20000 KHz.

A 20000 KHz, il filtro digitale è disattivato.

Con segnali molto deboli e rumorosi è consigliato di mettere la banda minima possibile, tale però da non produrre distorsioni nel segnale.

Infine la tabella 'Application Configuration Table' contiene diversi set di parametri in funzione della particolare sequenza selezionata.

Nel caso di misure di tempi di rilassamento può essere richiesto l'intervallo temporale tra due impulsi ( $\tau$ ), il tempo in cui verrà applicato l'ultimo impulso, ecc.

## Procedura generale di preparazione delle misure.

1. Scegliere il tipo di misura che si vuole eseguire. In base a al tipo di misura viene di conseguenza stabilito il tipo di probe.

Istruzioni per il cambio del probe.

Spegnere l'unità elettronica, aprire il coperchio dell'unità magnetica e togliere la sonda svitando gli anelli di sicurezza (punto 2 di Figura).



Fig. vista dall'alto della sonda. Il punto 2 indica gli anelli a "D" di sicurezza.

Una volta richiuso il coperchio dell'unità magnete, bisogna riaccendere l'unità elettronica.

Se l'operazione di cambiamento della sonda è andata a buon fine nella maschera di controllo compaiono contemporaneamente la scritta "*new probe head detected*" e la maschera della lista di probes con i relativi nomi. Bisogna a questo punto perciò selezionare il nome del probe che è stato inserito.

(NB: se il nome del probe corrisponde effettivamente con quello appena inserito, si accende la spia di sinistra nell'unità magnete; in caso contrario la spia di sinistra spenta indica un mancato collegamento fra software e hardware, che può accadere tipicamente in caso di selezione erronea del nome del probe, che non è stato riconosciuto).

Subito dopo l'operazione di accensione la macchina deve raggiungere la temperatura di 40 °C; il tempo per questa operazione dura in genere due ore, durante le quali la spia di destra dell'unità magnete rimane di colore arancione; quando il set point della temperatura è segnalato dalla spia verde.

E' necessario fare l'"Update Settings" ogni volta che viene cambiato il probe.

2. Lanciare il programma cliccando su 'The Minispec Software'.
3. Eseguire il 'Daily Check' con un campione di riferimento (ogni 24 ore) per verificare la taratura dello strumento.
4. Fare l' 'Update Settings' con un campione uguale o simile a quello che verrà analizzato (es: sia nella forma del tubo NMR (fondo piatto, ecc.) che nel contenuto solido o liquido), al fine di ottimizzare i parametri per la particolare misura.

I valori trovati nella routine (automatica) verranno impostati nella tabella 'Instrument Settings Table'.

5. Cliccare sulla cartella 'Minispec Applications'. Verranno visualizzate le ultime applicazioni eseguite.

Nel caso si voglia eseguire un'altra applicazione, cliccare su 'Browse' e cercare la nuova applicazione.

6. Inserire il campione su cui si vogliono fare le misure in modo tale che il campione contenuto nel tubo si trovi nella fascia di omogeneità sia del campo  $B_0$ , sia di  $B_1$  (variabile in funzione del tipo di probe) .

7. In base al campione da analizzare, impostare i parametri nella tabella 'Parameter Table' tra i quali NS, RD, RG, Analog Bandwidth.

8. Aprire la tabella 'Application Configuration Table' ed inserire i parametri appropriati per l'analita.

9. Questo punto è da seguire solo con misure assolute e di diffusione.

Per quelle assolute seguire i punti dall'1 al 7 di questo paragrafo, poi premere 'Sample Calibration' dal menù 'Measure' e seguire le indicazioni fornite nel sottoparagrafo 2.5.5 (sezione *CALIBRAZIONE*).

Una volta eseguita la calibrazione, si può avviare la misura premendo il tasto 'Measure'.

Per dettagli sull'esecuzione della misura, basta vedere il sottoparagrafo 2.5.5 (sezione *MISURA*).

Per le misure di diffusione, fare i punti 1,2,3,5 di questo paragrafo e poi proseguire con il sottoparagrafo 2.5.3 (sezione 3) *procedura di calibrazione* e sezione 4) *esecuzione della misura*].

10. Premere il tasto 'Measure' per avviare la misura.

*Dettagli applicazione CPMG nel software Minispec.*

Nome dell'applicazione per la sequenza CPMG: ***t2\_cp\_mb***.

$\{RD - 90_x - \tau - [(180_y - \tau - )_{DE} (180_y - \tau - )_{asd} - \tau - ]_N\}_{NS}$

DE è il numero di Echo a vuoto, cioè che non vengono registrati, prima che il segnale di Echo venga campionato e quindi visualizzato.

Questo parametro è possibile cambiarlo nella 'Application Configuration Table'.

Per quanto riguarda l'esecuzione della misura, si seguono i passi del paragrafo 2.4 (*Procedura di misura*) dall'uno al sette, mentre per il punto otto si fissano i parametri nella 'Application Configuration Table' di Figura.

Infine per avviare la misura si preme il tasto 'Measure'.

Nella voce '90°-180° Pulse Separation' va inserito il valore di tau in ms.

Il range di valori ammissibile per t è (ms): 0.04 - 100.

Il limite inferiore di 0.04 ms può essere variato andando a modificare il programma dell'applicazione.

*Dettagli delle misure per la determinazione di acqua e olio in semi vegetali con la spin echo nel software Bruker Minispec.*

Per questo tipo di misura è consigliabile l'utilizzo del probe per misure assolute su tubi da tubi di 18 mm di diametro (AVGX 520)

(Con riferimento ai punti 2 e 3): le operazioni di Daily Check e Update settings possono essere eseguite con un tubo riempito con una quantità di campione fino a 3 cm dell'altezza.

(Con riferimento al punto 5): nome dell'applicazione per la sequenza spin echo: m\_o\_norm. (che non prevede calibrazioni da parte dello strumento).

(Con riferimento al punto 6): in questo caso è sufficiente lasciare il tubo direttamente sul fondo dello spazio campione del probe.

(Con riferimento al punto 7): i parametri della maschera di controllo "Parameter Table" sono:

- NS = 16
- RD (Recycle Delay) = 2 s;
- RG (Receiver Gain) = 60 dB (eventualmente modificabile con "Tune Gain" in "Parameter Table" in base alla quantità e al tipo di semi);
- DS (dummy shots) = 0;

(Lasciare invece inalterati tutti gli altri parametri di default).

Il tau (di 3.5 ms) è impostato di default in 'Application Configuration Table' come tempo di echo ( $2\tau$ ) a 7 ms.

La misura con questa applicazione può essere fatta cliccando su "detect raw signal" nella maschera di controllo.

Al termine della misura (della durata di 16 secondi) è possibile riportare la curva sperimentale su foglio elettronico tramite l'opzione "copy as data" dal menù di controllo.

Per visualizzare gli intervalli di campionamento (sampling windows) dei segnali S1 ed S2 è possibile fare partire una misura cliccando su “Run”.

In questo modo i tratti della curva spin echo corrispondenti alle sampling windows vengono evidenziati in azzurro; selezionando nel Tool Bar il cursore (in Standard Tool Bar) è possibile leggere i punti sperimentali utilizzati nel campionamento effettuato dalla macchina.

Sul foglio elettronico si riportano infine tali intervalli e si ricavano i valori di S1 ed S2 come medie.

## Appendice II

### Metodi di calibrazione.

#### **i) calibrazione col metodo del weight variation**

L'inconveniente di non avere dei campioni con un contenuto di olio tale da coprire l'intero intervallo utile può essere risolto utilizzando una variante di questa procedura chiamata “weight variation”, che fa uso di un solo campione di calibrazione a contenuto noto di olio. In questo caso la quantità di olio rivelata dallo strumento viene variata aumentando la quantità di chicchi inseriti nei tubi di campionamento, simulando così campioni con percentuali di olio crescenti [19].

Il contenuto di olio relativo,  $h$ , come percentuale in massa, viene determinato mediante le seguenti espressioni [28]:

$$h_1 = \frac{m_1 H}{m_R}$$

$$h_2 = \frac{m_2 H}{m_R}$$

.....

$$h_n = \frac{m_n H}{m_R}$$

dove  $m_1, m_2 \dots m_n$  = massa, in grammi, delle diverse porzioni di chicchi di caffè, appartenenti al lotto di calibrazione;

$H$  = contenuto di olio, come percentuale in massa, del campione di calibrazione, determinato per estrazione;

$m_R$  = massa di riferimento, in grammi, di una porzione intermedia.

La curva di calibrazione si ottiene diagrammando l'intensità del segnale diviso per la massa  $m_R$  contro le percentuali di olio ottenute.

### ii) **Calibrazione con olio puro**

Questo metodo consiste nel registrare il segnale  $S_2$  utilizzando come standards aliquote di olio estratto da chicchi di caffè. La curva di calibrazione, che si ottiene incrementando le pesate di olio, ha la caratteristica di essere molto accessibile perchè nel momento in cui si ha a disposizione dell'olio, i campioni standard possono essere facilmente riprodotti [19]. L'olio viene inserito in un tubo di campionamento mediante una pipetta pasteur e fatto adagiare su un supporto inerte, in modo da essere il più possibile distribuito nell'area di campionamento. Il supporto utilizzato è stato cotone, introdotto in quantità tale da raggiungere un'altezza di 2 cm nel tubo di campionamento.

Questo tipo di calibrazione ha il difetto di non prendere in considerazione l'effetto matrice dei chicchi nel segnale NMR dell'olio, perciò risulta non essere molto esatto. Inoltre, la stabilità dell'olio estratto è molto breve rispetto ai chicchi intatti, quindi è necessario utilizzare, ad ogni nuova calibrazione, dell'olio fresco appena estratto [29].

Per tutte le procedure, il bianco è ottenuto registrando il segnale di un tubo NMR vuoto, assegnandone arbitrariamente un contenuto di olio dello 0.01% [28].

### **Determinazione dei campioni a contenuto noto di umidità**

Come per l'olio, il problema di partenza per poter costruire una curva di calibrazione è avere a disposizione campioni a contenuto noto di umidità.

Si è cercato di preparare questi campioni determinando l'umidità mediante l'essiccazione in stufa.

La procedura utilizzata consiste nel valutare la perdita in peso di 10 g di chicchi riscaldati a 105°C per 16 ore a pressione atmosferica. Vista la disponibilità limitata di campioni, sono stati utilizzati solo 5 g di chicchi di caffè, che sono stati posti in stufa a 105°C per 16 ore. Al termine di questo periodo i pesafiltri contenenti i campioni sono stati mantenuti in un essiccatore, utilizzando  $P_2O_5$  per evitare la reidratazione, fino al raggiungimento della temperatura ambiente e poi ripesati; per ogni campione sono state eseguite tre determinazioni.

L'umidità è stata determinata come perdita in peso percentuale mediante la seguente espressione:

$$\text{Umidità (\%)} = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \cdot 100$$

dove:

$w_1$  = massa, in grammi, dei chicchi di caffè prima dell'essiccazione,

$w_2$  = massa, in grammi, dei chicchi di caffè dopo essere stati per 16 ore in stufa.

Con questo tipo di metodica si può assistere ad una perdita di composti organici volatili come alcoli, acetali, aldeidi, eteri, benzofurani e altri ancora, che si realizza alle temperature di lavoro (105 °C). La perdita di questi composti può portare ad una sovrastima del contenuto di acqua effettivamente presente, e quindi ad un errore sistematico.

### **Procedura di calibrazione per la determinazione del contenuto di umidità**

La procedura utilizzata per la costruzione di una curva di calibrazione per l'umidità fa uso della sequenza spin-echo. A differenza dell'olio, la correlazione viene fatta tra la differenza  $S_1-S_2$  dei segnali specifici (u.a./g) registrati e il contenuto noto di umidità. A tal proposito è necessario avere a disposizione un set di campioni a percentuale di umidità che possa coprire un intervallo il più ampio possibile [28]. Come nel precedente caso, l'accuratezza della curva di calibrazione è limitata dal metodo di riferimento scelto per la determinazione degli standard.

## **Appendice III**

### **Parametri di input e e messaggi di output di UPEN.**

#### **Parametri di processamento (di input):**

##### **Parametri di controllo modificati con maggiore frequenza:**

<b>Parametro</b>	<b>Funzione</b>
<b>FileChr</b>	I files di output (.dat e .tst) utilizzano il nome esteso del file originale, più un carattere aggiuntivo che è variabile e deciso dall'utente per evitare di sovrascrivere il nome stesso. <b>Valori di input permessi:</b> " " carattere vuoto per estensione di default.
<b>NNN</b>	("No NN"): disattiva la costante di Non-Negatività (fissata di default). I dati di diverse, ma non tutte le distribuzioni di tempi di rilassamento hanno diversi motivi per essere fissate come non negative. L'opzione di non negatività tuttavia può essere rimossa per motivi di controllo della qualità del dato sperimentale. <b>Valori di input permessi:</b> " " o "y" per partire con l'opzione NoNN attiva; "p" permanente NoNN. "n": attiva NN.
<b>MN</b>	Controlla la scelta di includere <i>Sinf</i> , il valore del segnale fittato al tempo infinito ( $S_\infty$ ) come parametro di regressione. <b>Valori di input permessi:</b> " " per automatico: il programma decide autonomamente. MN=1 per i dati di $T_1$ e MN=0 per i dati

	<p>di <math>T_2</math>;  “n” no;  “y” yes;  “i” Sinf è richiesto dall’utente.</p>
<b>AvNa</b>	<p>(“Av” per “average”; “Na” per “Number averaged”).  E’ possibile usare i primi Na (normalmente 16) punti medi di coppie di segnali successive invece che i segnali tal quali.  Ciò è fatto per mitigare gli effetti problemi di aggiustamento strumentale che portano all’oscillazione dei primi punti della CPMG attorno ad un fit di smoothing.  <b>Valori di input permessi:</b>  “n” no;  “y” yes;  “ ” automatico (quando RmR12 è alto (&gt;.05) usa i primi punti medi Na).</p>
<b>beta00</b>	<p>Controlla il valore di partenza del parametro di <i>compliance</i> beta00, dove valori maggiori di beta00 permettono more detail (non necessariamente validi) nel fit.  <b>Valore di default:</b>  "1" (normalmente non deve essere maggiore di 2).</p>
<b>AbsValue</b>	<p>Permette una serie di opzioni quando vengono processati dati in valore assoluto(“Modulus”).  <b>Valori di input permessi:</b>  “ ” no (default);  “y” yes;  “i” un valore per l’asintoto del valore assoluto (asym) richiesta dell’utente;  “a” auto: se <i>Sinf</i> è positivo e paragonabile a RumV tratta i dati come dati in valore assoluto;</p>
<b>MI</b>	<p>Numero dei tempi di di rilassamento di output per i quali è fittata la distribuzione.  MI è fissato a 100 per default, ma in determinati casi profili con picchi stretti possono essere fittati con un maggior numero di punti.</p>
<b>ND</b>	<p>Numero di punti eliminati a partire dal più breve punto sperimentale della curva di di rilassamento.  <b>Valore di default:</b> 0.</p>
<b>Mint</b>	<p>MINimo <math>t</math>, dove <math>t</math> è il tempo, valore di ascissa. Punti sperimentali con <math>t &lt; Mint</math> vengono scartati nel calcolo.  <b>Valore di default:</b> 0 .</p>
<b>Maxt</b>	<p>MAXimum <math>t</math>, dove <math>t</math> è il tempo, valore di ascissa. Punti sperimentali con <math>t &gt; Mint</math> vengono scartati nel calcolo.  <b>Valore di default:</b> 0.</p>
<b>Emx</b>	<p>(“Error-MaXimum”). Alcuni dataset sperimentali possono essere affetti da spikes di rumore, vale a dire cioè punti che distanziati da un fit intermedio da più del livello previsto da un rumore random di tipo Gaussiano. Questi punti possono essere automaticamente sottopesati  <b>Valore di input:</b>  0 disattiva  &lt; 2.5 disattiva eccetto quando sono usate routines di fitting di dati in valore assoluto, nel qual caso è usato <math>Emx = 4</math>  2.5 punti caratterizzati da un rapporto <math>Computed\_signal\_estimated/RumV &gt; Emx</math> vengono sottopesati.</p>

### Parametri di output e diagnostica.

Al termine di ogni processamento di una curva sperimentale viene prodotta da UPEN una serie di files di output (.eps; .dat. e .tst) associati al file originale di partenza:

- ❖ il file **eps** contiene il grafico della distribuzione ottenuta in formato immagine;

- ❖ il file **.tst** è un file di testo che contiene una lista di messaggi e valori calcolati la cui interpretazione è necessaria per l'analisi della distribuzione trovata. Compare in testa al grafico della distribuzione come commento.
- ❖ il file **.dat** è un file ASCII multiplo che contiene 11 colonne tramite le quali è possibile, ad esempio, ricostruire la distribuzione trovata ed eseguire alcuni test diagnostici.

### Significato dei messaggi di output nel file .tst

- **SNR** (signal-to-noise ratio),  $S/R_v = USig/RumV$ . “U” indica “unextrapolated” ed è il fit computato del segnale in corrispondenza del tempo del primo punto sperimentale. RumV (“V” = “Variation of local error of fit”) è il rumore calcolato dagli errori di fit dei secondi adiacenti. dovrebbe essere vicino al *rumore casuale*. SNR = 300 è giudicato sufficiente per il fit corretto del segnale (). Se l'opzione NN (Non-Negative constraint) non è attiva, compare **Neg%**, che è l'integrale della parte negativa in percentuale rispetto all'integrale totale.
- **XNeg%** indica la percentuale di area negativa prima dell'applicazione di NN. Se non ci sono picchi stretti questo parametro dovrebbe avere un valore molto piccolo.
- **\_plt\_** (con un numero a sinistra e uno a destra). Il numero a sinistra **pltt** è il numero progressivo che contraddistingue il ciclo dell'iterazione.
- **\_RmR\_** è un importante messaggio di diagnostica. Il numero a sinistra è **RmR** =  $R_{rv} = \ln(Rum/RumV)$ , che dovrebbe normalmente essere negativo o almeno non più di qualche punto percentuale se positivo, dato che la regressione minimizza Rum, non RumV. A destra c'è **RmR12** =  $\ln(RumV1/RumV2)$ , dove RumV1 è il rumore computato per l'errore di fit dalla prima coppia di punti adiacenti (Na, Number Averaged, 16), e RumV2 dal secondo punto adiacente. E' una misura dell'alternanza attorno al valore dello smoothing del fit, che rappresenta un problema ricorrente nelle misure di  $T_2$ . In genere tuttavia non comporta particolari problemi nel fit; viene molto mitigato dall'implementazione di AvNa. Valori positivi maggiori di qualche punto percentuale indicano la presenza di qualche problema nella curva sperimentale.
- **xxx%\_Extrap\_yyy%**. UPEN rende visibili per estrapolazione porzioni di distribuzione altrimenti non fisicamente previste in base ai parametri di acquisizione usati, e quindi in assenza di punti sperimentali. Il numero di sinistra xxx% indica la percentuale di segnale estrapolato a tempi inferiori del primo punto calcolato; il numero di destra indica invece la percentuale di segnale estrapolato a tempi maggiori dell'ultimo punto calcolato. Se il rapporto segnale rumore SNR e altri fattori lo consentono, la distribuzione calcolata può estendersi oltre i limiti dei dati sperimentali. Ciò spiega la possibilità di trovare “code” di distribuzione apparentemente non spiegabili in base ai parametri di acquisizione adottati. (es. con tau 0.04 ms è visibile ugualmente una porzione di curva a tempi di circa 0.01 ms. In questo caso Upen avverte 10%\_extrap\_...%)
- **Beta00**: è il parametro di *compliance* (corrispondente al coefficiente di smoothing della funzione di penalty ()): è impostato a 1 di default. Per valori  $> 1$  lo smoothing aumenta, per valori  $< 1$  la risoluzione dei profili aumenta.
- **\_BusyMMod\_**: il numero di sinistra è una misura della multimodalità della distribuzione. Un valore di 1.0 significa unimodale. Serve per capire se, in base al programma, vi è un indizio di distribuzione con diversi picchi. vedi UPEN-II.
- **Resolved\_Peaks\_Tgm**: compare solo se ci sono dei picchi risolti già dal programma. Tgm è la media geometrica (g-m).
- **\_RumNewOld\_**: è il valore di **RmR12o** prima dell'applicazione automatica di AvNa da parte del programma. Il numero a sinistra RumNewOld è  $\ln(Rum/Rumo)$  (“o” sta per “old value”), che rappresenta il costo di NN (vincolo di non negatività) associato al peggioramento dell'errore di fit, e che dovrebbe essere non troppo superiore a 0.01, a meno che vi siano picchi molto pronunciati nella distribuzione. Bisogna tuttavia tenere presente che in questo particolare caso NN è sempre molto costosa. Tuttavia ciò è indice di probabili problemi nel fit. Il numero a destra sta per  $\ln(RumV/RumVo)$ .
- **AbsValue**: è un parametro creato apposta pre le misure di CPMG in valore assoluto. Se attivo UPEN riconosce che le intensità dei punti sperimentali in questo caso non possono tendere asintoticamente a 0, ma tendono al valore del rumore. Pertanto tale parametro evita inutili problemi originati da que-

sta causa. Se attivo, compare al termine dell' iterazione "AbsValue:asyp=". In questo ultimo messaggio il primo numero è l'asintoto scelto dal programma, il secondo numero indica il numero di punti sperimentali utilizzati dal programma nella determinazione dell'asintoto stesso. Il terzo numero infine è Sinfld, il vecchio ("old") valore di Sinf (signal at infinite time), cioè il valore appena prima dell'applicazione di AbsValue (cfr

- “\_XSigU\_” compare associato a tre numeri. X significa “extrapolated to zero time”; U significa “unextrapolated” cioè, la curva di fit calcolata al tempo del primo punto; il terzo è la differenza fra il primo e l'ultimo punto.
- **Rum - Sinf** Rum è il rumore dell'errore di fit, ed è il numero a sinistra di “\_Rum\_”, RumV, il livello di rumore stimato, è il valore a destra. Se **Sinf** (il segnale al tempo infinito) è stato incluso come parametro modificabile nella regressione, il suo valore dovrebbe essere confrontabile con il rumore, RumV. In tal caso va presa in considerazione la possibilità di usare AbsValue nel processamento della CPMG. Se vi sono ragioni di sospettare, in base a considerazioni fisiche, che vi siano picchi “legittimi” sottesi ad un profilo (il quale è caratterizzato da una forma, ad esempio, trapezoidale), è utile diagrammare Rum (non RumV) in funzione di beta00. Un sensibile miglioramento del fit (cioè un calo sensibile dell'errore di fit) accompagnato da risoluzione dei picchi è un indizio di veridicità dei picchi stessi, almeno da un punto di vista statistico (*Riferimento Up 10: Borgia Brown Fantazzini 2001*).
- **Kurtosis** (indica la curtosi statistica del set di dati sperimentali). Valori > 1.0 indicano outliers, o deviazioni dalla distribuzione Gaussiana degli errori di fit. Una consistente deviazione con indica buona probabilità errori sistematici

In base ai valori trovati dal programma per ciascuno dei messaggi di output sopra descritti Upen emette messaggi di avvertimento della presenza di problemi lievi (**warning**) e gravi (**beware**) nel fit. In particolare i messaggi di tipo beware devono essere in presi in dovuta considerazione. In genere in presenza di un messaggio di questo tipo è raccomandabile il controllo e l'eventuale ripetizione della curva sperimentale. Nella tabella sono riportati i valori in base ai quali i messaggi di avvertimento possono assumere una diversa gravità:

Output	Warning	Beware
Xneg%	18	30
RmR	0.05	0.15
RmR12	0.12	0.3
Xtrap	10	25
RumNewOld	0.05	0.12
beta00	<1 or >2	<0.2 or >4
kurtosis	1	2.5

### Significato delle colonne del file .dat.

1. “**T**”: colonna dei tempi di rilassamento equispaziati nella scala logaritmica;
2. “**Sig\_Np**”: quantità di segnale di input riferita ad unità di *e* (Nepero)
3. “**Rate**”: numeri progressivi indicanti la scala delle velocità di rilassamento  $R_i$  ( $R_i = 1/T_i$ ).
4. “**Pct\_Np**”: percentuale di segnale totale estrapolato per Nepero;
5. “**Cum\_Pct**”: percentuale di segnale totale estrapolato avente un tempo di rilassamento maggiore);
6. “**SigT**”: intensità di segnale per T. Non comprende punti esclusi da ND, Mint, Maxt);
7. “**E:SNR<sub>xxx</sub>**” (rapporto fra i singoli punti di errore del fit e il rumore; xxx sono le cifre di un numero che indica il rapporto segnale/rumore(S/N); in assenza di particolari errori di fit il grafico che si ottiene plottando E:SNR<sub>xxx</sub> contro SigT dovrebbe essere compreso nell'intervallo di deviazioni standard {+3; -3};
8. “**Sig**” (segnale di input, con Sinf, il valore del segnale registrato o calcolato al tempo infinito sottratto a meno che il parametro SinfSbtr\$ sia "n", cioè non attivo)
9. “**SigCalc**” (il segnale della distribuzione calcolata);
10. “**Range**” (dato da due numeri che indicano l'intervallo dei tempi di rilassamento considerati nel fitting);

11. “Zero”: due zeri: servono per contraddistinguere l’intervallo coperto dai dati. In genere non viene mai usato)

## **Appendice IV**

### **Analisi gascromatografica di alcuni oli di caffè.**

Questa analisi è stata fatta allo scopo di ulteriore verifica della correttezza dei risultati trovati per la calibrazione dell’olio mediante le aggiunte standard.

L’analisi effettuata è indirizzata a confermare la composizione media in acidi grassi di alcuni campioni di caffè della varietà arabica.

I campioni di olio analizzati sono stati ottenuti mediante estrazione Soxhlet.

*Preparazione dei campioni per l’analisi.*

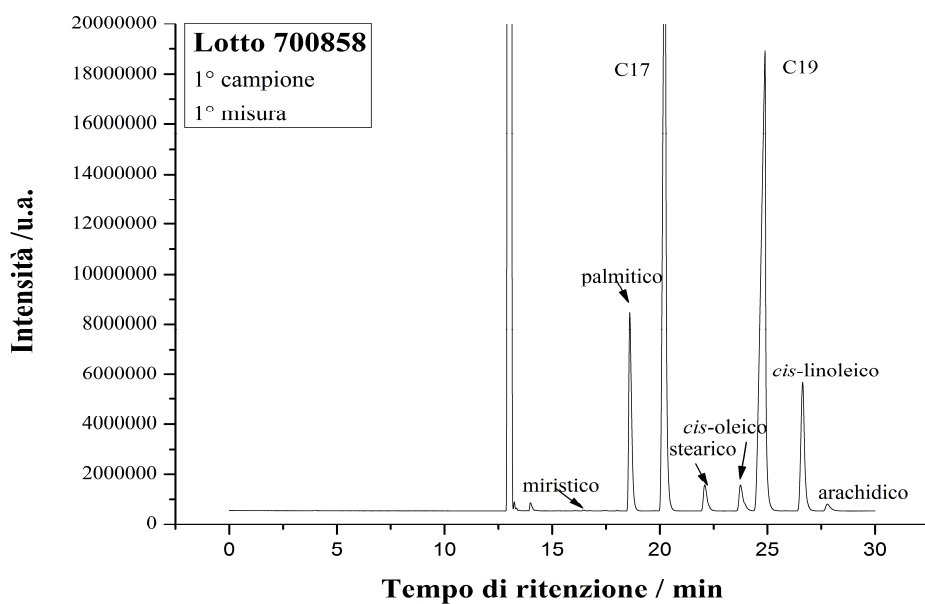
La derivatizzazione degli acidi grassi presenti nei campioni è stata effettuata aggiungendo 2 mL di metanolo e 80  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (utilizzato come catalizzatore acido) e 5 mL di pentano ad una quantità di  $\sim 0.5$  g di olio, accuratamente pesata; la reazione di derivatizzazione è stata condotta per 30 minuti a  $80^\circ\text{C}$  in bagno termostato. La resa di estrazione degli esteri è stata controllata tramite aggiunta di due standard, eptadecanoato (C17) ed enneadecanoato (C19), aggiunti direttamente a campioni di olio.

In questo studio è stato utilizzato un gascromatografo equipaggiato con colonna Carbowax (Supelco fused silica SPTM-2560) capillare (75mX0.18mm  $\varnothing$ ), caratterizzata da uno spessore della fase stazionaria di 0.14  $\mu\text{m}$ . La separazione è stata condotta in condizioni isoterme con una temperatura dell’iniettore di  $260^\circ\text{C}$ , del detector di  $260^\circ\text{C}$  e della colonna a  $200^\circ\text{C}$ , un flusso del gas di trasporto di 35 psi (0.28 mL  $\text{min}^{-1}$ ) e con frequenza di campionamento del cromatogramma pari a 12.5000 punti al secondo. L’assegnazione dei tempi di ritenzione nel gascromatogramma è stata ottenuta per confronto con una miscela standard a contenuto noto di esteri metilici di acidi grassi (SUPELCO) con la seguente composizione:

Standard:		% w/w
Acido miristico	(C14:0)	4%
Acido palmitico	(C16:0)	10%
Acido stearico	(C18:0)	6%
Acido oleico	(C18:1)	25%
Acido trans-oleico	(C18:1)	10%
Acido linoleico	(C18:2)	34%
Acido trans-linoleico	(C18:2)	2%
Acido linolenico	(C18:3)	5%
Acido arachidico	(C20:0)	2%
Acido behenico	(C22:0)	2%

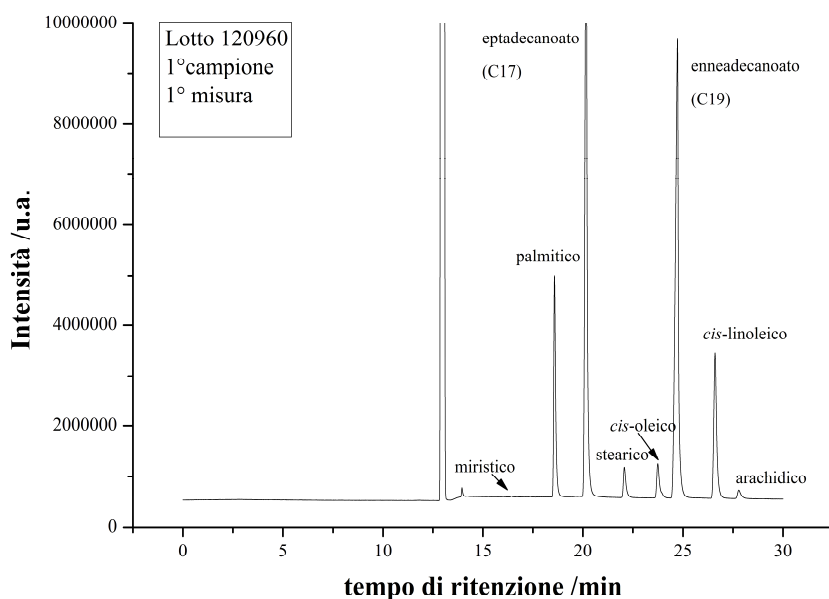
## Risultati

Di seguito sono riportati alcuni gascromatogrammi e le relative tabelle di composizioni percentuali trovate relative a lotti di caffè della specie arabica provenienti da diverse regioni geografiche.



<b>Lotto 700858 (Africa) _Campione 1</b>						
<b>1° misura</b>			<b>2° misura</b>			
<b>Nome estere</b>	<b>Area [<math>\mu</math>V*s]</b>	<b>Area %</b>	<b>Area [<math>\mu</math>V*s]</b>	<b>Area %</b>	<b>Media Area %</b>	<b>Dev std Area%</b>
<b>Miristico</b>	640.25	<b>0.05</b>	587.45	<b>0.05</b>	0.05	0.00
<b>Palmitico</b>	574297.57	<b>41.81</b>	543832.56	<b>43.01</b>	42.41	0.85
<b>C17</b>	2620847.3		2159430.24			
<b>Stearico</b>	114883.55	<b>8.36</b>	97834.67	<b>7.74</b>	8.05	0.44
<i>cis-oleico</i>	97578.05	<b>7.10</b>	92001.04	<b>7.28</b>	7.19	0.12
<b>C19</b>	2571248.54		2321069.52			
<i>cis-linoleico</i>	562477.06	<b>40.95</b>	510941.78	<b>40.41</b>	40.68	0.39
<b>arachidico</b>	23852.32	<b>1.74</b>	19345.9	<b>1.53</b>	1.63	0.15

<b>Lotto 700858 (Africa) _Campione 2</b>						
<b>1° misura</b>			<b>2° misura</b>			
<b>Nome estere</b>	<b>Area [mV*s]</b>	<b>Area %</b>	<b>Area [mV*s]</b>	<b>Area %</b>	<b>Media Area %</b>	<b>Dev std Area %</b>
Miristico	102.04	<b>0.07</b>	321.91	<b>0.21</b>	0.14	0.10
Palmitico	58126.77	<b>42.12</b>	62083.48	<b>40.42</b>	41.27	1.20
C17	142846.91		187924			
Stearico	9091.01	<b>6.59</b>	12456.73	<b>8.11</b>	7.35	1.08
<i>cis-oleico</i>	10851.34	<b>7.86</b>	12977.9	<b>8.45</b>	8.16	0.41
C19	62955.81		60322.52			
<i>cis-linoleico</i>	42061.55	<b>30.48</b>	46111	<b>30.02</b>	30.25	0.32
arachidico	2127.51	<b>12.88</b>	19653.21	<b>12.79</b>	12.84	0.05

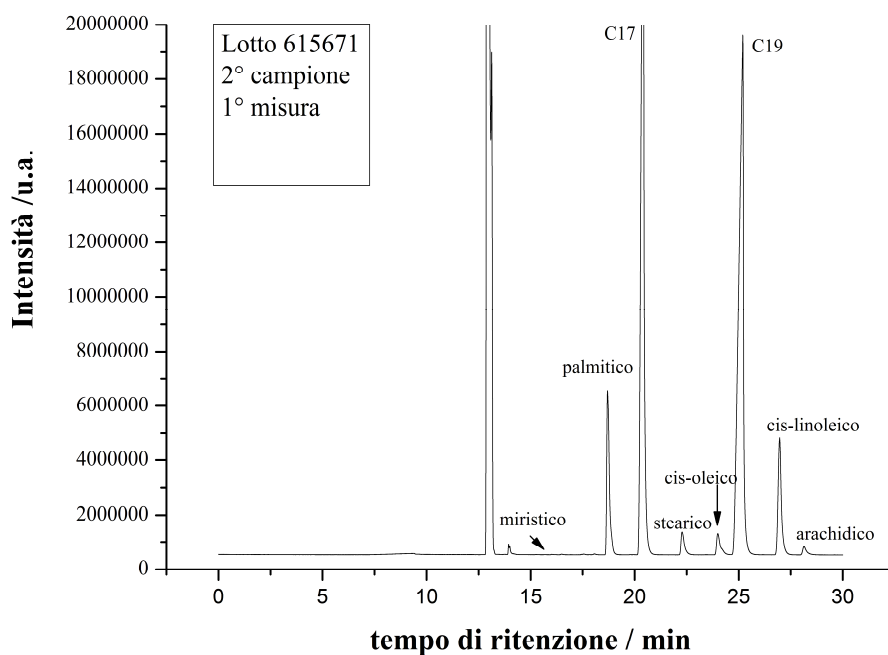


### 120960 (America meridionale)\_ Campione 1

Nome estere	1°misura		2°misura		Media Area %	Dev std Area %
	Area [mV*s]	Area %	Area [mV*s]	Area %		
Miristico	896.32	<b>0.13</b>	990.51	<b>0.15</b>	0.14	0.02
Palmitico	301543.7	<b>42.21</b>	268151.1	<b>40.86</b>	41.54	0.96
C17	9870432		9226003.5			
Stearico	54678.83	<b>7.65</b>	49829.29	<b>7.59</b>	7.62	0.04
cis-oleico	57346.61	<b>8.03</b>	53953.58	<b>8.22</b>	8.12	0.14
C19	922401.9		895759.2			
cis-linoleico	278819	<b>39.03</b>	267026.6	<b>40.69</b>	39.86	1.17
arachidico	21045.19	<b>2.95</b>	16371.58	<b>2.49</b>	2.72	0.26

### 120960 (America meridionale)\_ Campione 2

Nome estere	1°misura		2°misura		Media Area %	Dev std Area %
	Area [mV*s]	Area %	Area [mV*s]	Area %		
Miristico	604.42	<b>0.11</b>	990.51	<b>0.15</b>	0.13	0.03
Palmitico	232746.8	<b>42.16</b>	268151.1	<b>40.86</b>	41.51	0.92
C17	950454.2		922600		156.37	
Stearico	42991.96	<b>7.79</b>	49829.29	<b>7.59</b>	7.69	0.14
cis-oleico	33565.89	<b>6.08</b>	53953.58	<b>8.22</b>	7.15	1.51
C19	949185.6		895759.2			
cis-linoleico	229853.8	<b>41.64</b>	267026.6	<b>40.69</b>	41.16	0.67
arachidico	12267.64	<b>2.22</b>	16371.58	<b>2.49</b>	2.36	0.16



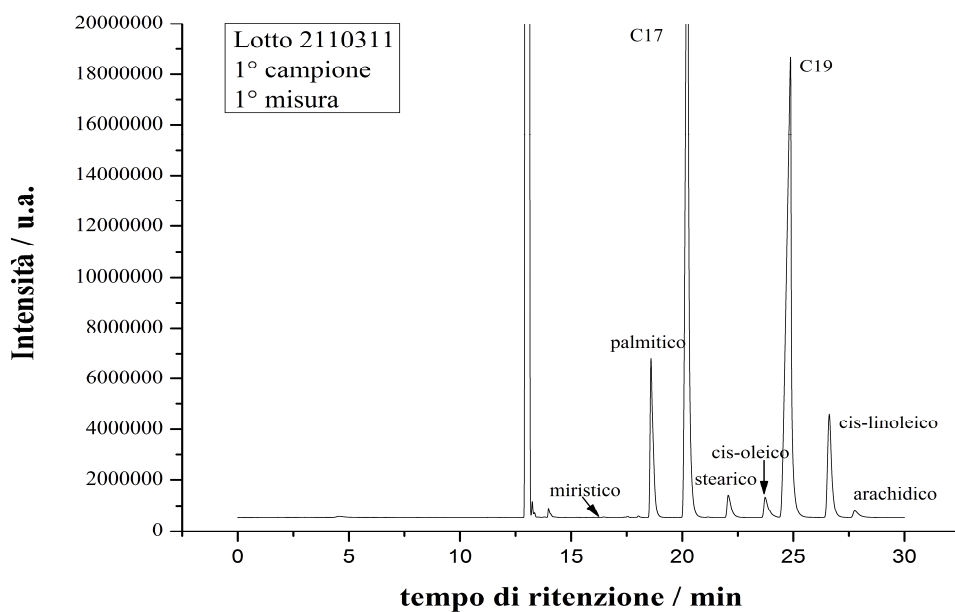
### Lotto 615671 (America Meridionale) \_Campione 1

Nome estere	1° misura		2° misura		Media Area %	Dev std Area %
	Area [mV*s]	Area %	Area [mV*s]	Area %		
Miristico	1223.32	<b>0.18</b>	1890.56	<b>0.28</b>	<b>0.23</b>	0.07
Palmitico	281517.24	<b>41.61</b>	288781.1	<b>42.87</b>	<b>42.24</b>	0.89
C17	6780416.6		900345.2			
Stearico	64678.9	<b>9.56</b>	49829.29	<b>7.40</b>	<b>8.48</b>	1.53
cis-oleico	50565.11	<b>7.47</b>	52951.28	<b>7.86</b>	<b>7.67</b>	0.27
C19	833996.11		895658			
cis-linoleico	260745	<b>38.54</b>	267216.2	<b>39.67</b>	<b>39.10</b>	0.79
arachidico	17778.66	<b>2.63</b>	13001.98	<b>1.93</b>	<b>2.28</b>	0.40

### 615671 (America Meridionale)\_Campione 2

Nome estere	1°misura		2°misura		Media Area %	Dev std Area %
	Area [mV*s]	Area %	Area [mV*s]	Area %		
Miristico	1110.01	<b>0.10</b>	2557.55	<b>0.16</b>	<b>0.13</b>	0.04
Palmitico	501181.87	<b>47.09</b>	673874.4	<b>43.21</b>	<b>45.15</b>	2.74
C17	2880896.8		4027644			
Stearico	82848.26	<b>7.78</b>	114321.1	<b>7.33</b>	<b>7.56</b>	0.32
cis-oleico	55538.93	<b>5.22</b>	91384.82	<b>5.86</b>	<b>5.54</b>	0.45
C19	2686960.6		3986336			
cis-linoleico	401683.92	<b>37.74</b>	645453.8	<b>41.39</b>	<b>39.56</b>	2.58

arachidico	22026.81	<b>2.07</b>	31977.35	<b>2.05</b>	<b>2.06</b>	0.01
------------	----------	-------------	----------	-------------	-------------	------



**Lotto 2100311 (Asia)\_Campione 1**

Nome estere	1°misura		2°misura		Media Area %	Dev std Area %
	Area [mV*s]	Area %	Area [mV*s]	Area %		
Miristico	1690.62	<b>0.15</b>	1680.52	<b>0.15</b>	<b>0.15</b>	0.00
Palmitico	501925.66	<b>43.43</b>	503001.3	<b>45.89</b>	<b>44.66</b>	1.74
C17	2743565		934522.4		<b>161.34</b>	
Stearico	81185.73	<b>7.03</b>	79830.13	<b>7.28</b>	<b>7.15</b>	0.18
cis-oleico	72133.76	<b>6.24</b>	76892.28	<b>7.02</b>	<b>6.63</b>	0.55
C19	2459804.7		817322.1			
cis-linoleico	468865.33	<b>40.57</b>	424331.1	<b>38.71</b>	<b>39.64</b>	1.31
arachidico	29790.8	<b>2.58</b>	10331.46	<b>0.94</b>	<b>1.76</b>	0.94

<b>2100311 (Asia)_Campione 2</b>						
<b>Nome estere</b>	<b>1°misura</b>		<b>2°misura</b>		<b>Media Area %</b>	<b>Dev std Area %</b>
	Area [mV*s]	Area %	Area [mV*s]	Area %		
Miristico	1110	<b>0.10</b>	2557.55	<b>0.16</b>	<b>0.13</b>	0.04
Palmitico	501181.87	<b>47.09</b>	673874.4	<b>43.21</b>	<b>45.15</b>	2.74
C17	2880896.8		4027644			
Stearico	82848.26	<b>7.78</b>	114321.1	<b>7.33</b>	<b>7.56</b>	0.32
cis-oleico	55538.93	<b>5.22</b>	91384.82	<b>5.86</b>	<b>5.54</b>	0.45
C19	2686960.6		3986336			
cis-linoleico	401683.92	<b>37.74</b>	645453.8	<b>41.39</b>	<b>39.56</b>	2.58
arachidico	22026.81	<b>2.07</b>	31977.35	<b>2.05</b>	<b>2.06</b>	0.01

In tutti i lotti analizzati si può notare che i composti prevalenti in percentuale sono l'acido palmitico (C16) e l'isomero cis dell'acido linoleico (C18:2). I nostri dati differiscono rispetto a quanto riportato da Speer per quel che riguarda il rapporto delle percentuali C16/ C18:2. Le quantità trovate di acido stearico e acido oleico tuttavia sono in sostanziale accordo con i dati di Speer secondo cui, nell'arabica, questi due composti sono presenti in quantità mediamente equivalenti (*Speer, K. Speer*).

Dai dati ottenuti è possibile concludere tuttavia che l'origine geografica dei lotti considerati non sembra influenzare apprezzabilmente le composizioni percentuali in acidi grassi dell'olio di caffè estratto. Infatti, la variabilità dei valori percentuali degli acidi grassi nei lotti analizzati appare abbastanza limitata. Pertanto, questo tipo di verifica, oltre a chiarire la composizione in acidi grassi dell'olio estratto, fornisce una conferma ulteriore della robustezza della calibrazione per l'olio con il metodo delle aggiunte standard nella tecnica NMR illustrata nei paragrafi precedenti.

