IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Studio di autenticità del latte italiano a garanzia della sicurezza per il consumatore. Campioni di latte di massa: messa a punto di analisi Spettroscopica 1H HR-NMR e studio delle idonee condizioni di conservazione.

Research Project 2017, IZSAM 04/17

Salvatore Milone

Teramo 13-06-2019

Proposta di progetto

• **Responsabile Scientifico**	Dr. Giacomo Migliorati g.migliorati@izs.it
• **Parole chiave**	Latte bovino, autenticità, modelli chemiometrici
• **Obiettivo principale**	Valutare la possibilità di distinguere latti italiani da esteri utilizzando tecnologie, attrezzature e approcci innovativi

NMR BRUKER
AVANCE III 400 Ultrashield

Proposta di progetto

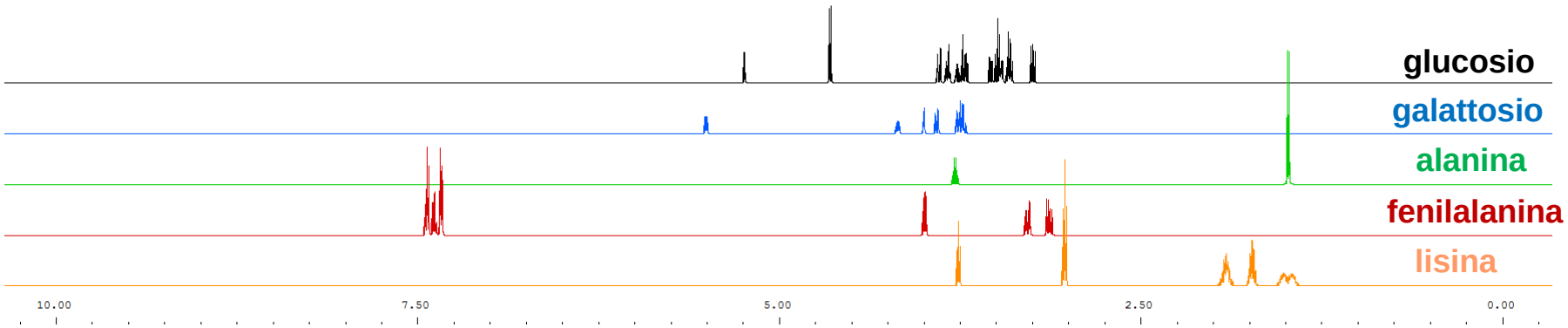
- Utilizzo di tecnologie innovative con lo scopo di avere per ogni campione una **"impronta digitale analitica"** da utilizzare per la loro successiva comparazione.

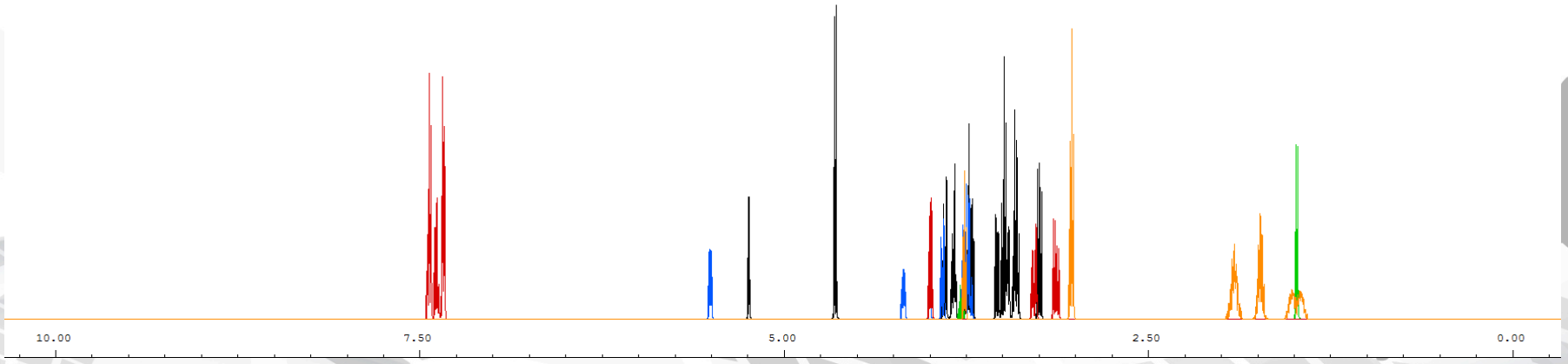
- Identificazione delle **“variabili analitiche”** utili per la discriminazione tra le due classi “**latte italiano**” e “**latte estero**” a partire dalle informazioni sui campioni e dalla loro **“impronta digitale analitica”**.

- Da queste, costruendo **modelli di classificazione**, verranno valutate le performance dei modelli stessi e le loro abilità nel **predire campioni incogniti**.

Spettroscopia ^{1}H HR-NMR

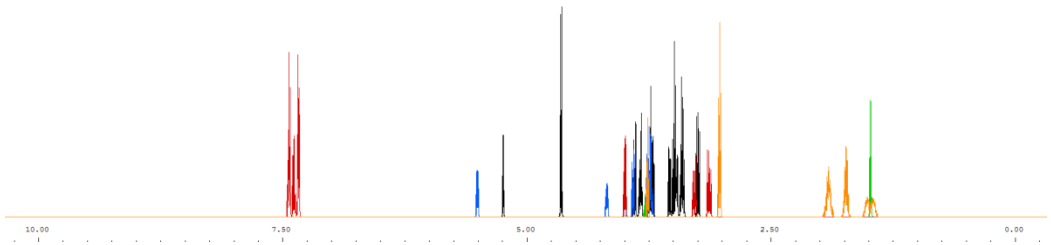
Chemical shift, molteplicità, costanti di accoppiamento danno informazioni sulla struttura chimica delle molecole ma.....
se abbiamo una miscela complessa a più componenti?





…dalla letteratura…

Spettro ^{1}H HR-NMR di latte UHT



Latte tal quale + D_2O

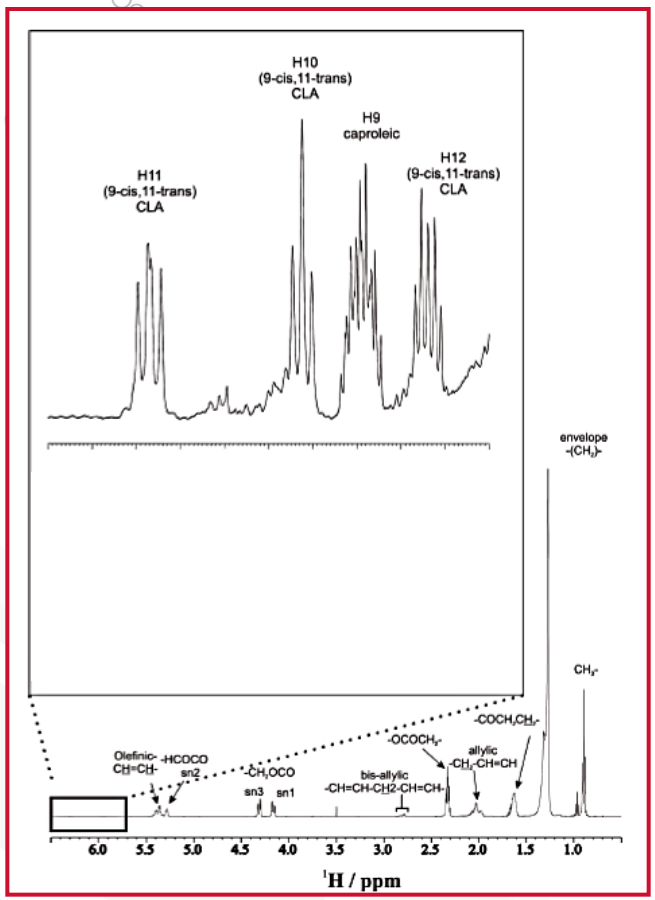
Segnali dei lipidi che dominano lo spettro NMR soprattutto ad alti campi.

Segnali “allargati” presenti coprono altri segnali.

Fangyu Hu, Kazuo Furihata, Mie Ito-Ishida, Shuichi Kaminogawa, Masaru Tanokura, 2004. “Nondestructive Observation of Bovine Milk by NMR Spectroscopy: Analysis of Existing States of Compounds and Detection of New Compounds”. J. Agric. Food Chem., 52, 4969-4974.

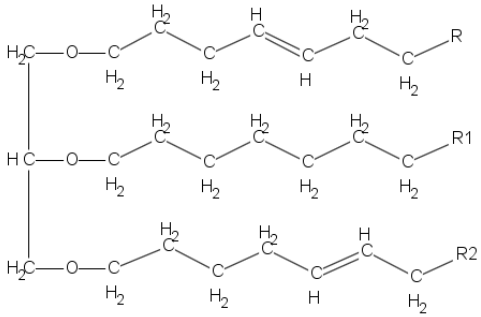
…dalla letteratura…

Spettro ^{1}H HR-NMR della frazione lipidica di un latte



- Estrazione dei trigliceridi (TAG)

Segnali dominanti dovuti ai gruppi -CH_2- delle lunghe catene alchiliche che costituiscono i TAG. Presenza di componenti minoritari evidenziabili amplificando lo spettro NMR.



Constantinos G. Tsiafoulis, Theodore Skarlas, Ouranios Tzamaloukas, Despoina Miltiadou, Ioannis P. Gerothanassis, 2014. "Direct nuclear magnetic resonance identification and quantification of geometric isomers of conjugated linoleic acid in milk lipid fraction without derivatization steps: Overcoming sensitivity and resolution barriers". Analytica Chimica Acta 821, 62-71.

…dalla letteratura…

Spettri ^{1}H HR-NMR della frazione idrosolubile di latti vaccini

- Estrazione della frazione idrosolubile

Leonardo Tenori, Claudio Santucci, Gaia Meoni, Valentina Morrocchi, Giacomo Matteucci, Claudio Luchinat "NMR metabolomic fingerprinting distinguishes milk from different farms", Food Research International 2018.

Approccio al metodo di analisi NMR

- Utilizzo di campioni di “latte di massa”
- Metodo di analisi: rapido, riproducibile, untargeted, applicabile a latti di ogni specie animale e che hanno subito qualsiasi trattamento
- Analisi di **frazioni estratte (idrofobica/idrofilica)** piuttosto che del latte tal quale
- Analisi HR-NMR
  - **spettri ^{1}H monodimensionali** su tutti i campioni
    - analisi statistica multivariata e costruzione di modelli di classificazione e predizione
  - **spettri bidimensionali** su campioni selezionati
    - per eventuali approfondimenti dello studio

Latte di massa

Il latte di massa, non essendo trattato in alcun modo, è soggetto a veloci mutamenti del profilo metabolico in tempi estremamente brevi.

In studi “per confronto”, come questo, è importante ottenere una appropriata equivalenza delle condizioni iniziali di analisi dei campioni.

Quindi…

Studio di stabilità del latte - NMR

Studio preliminare: variazioni del profilo chimico del latte di massa in diverse condizioni di conservazione nel tempo.

……come preservare nel migliore dei modi il profilo “originale” della matrice?

Studio nel tempo

- **Temperatura**
  - ambiente - frigorifero - congelatore
- **Stabilizzante Sodio azide (NaN_3)**
  - Diverse quantità (0 - 0.2 - 0.8 - 3.2) mg/ml di latte

Studio di stabilità del latte - NMR

Aliquote preparate per lo studio e condizioni di conservazione dello stesso latte di massa (valutazione da 132 spettri)

Diverse condizioni di preparazione e conservazione delle aliquote di latte sottoposto ad analisi NMR

sigla	NaN_3 (mg/ml)	T
A0	0	ambiente (~ 20-25°C)
A10	0.2	
A40	0.8	
A160	3.2	
F0	0	frigorifero (~ 2-8°C)
F10	0.2	
F40	0.8	
F160	3.2	
C0	0	congelatore (~ -20°C)
C10	0.2	
C40	0.8	
C160	3.2	

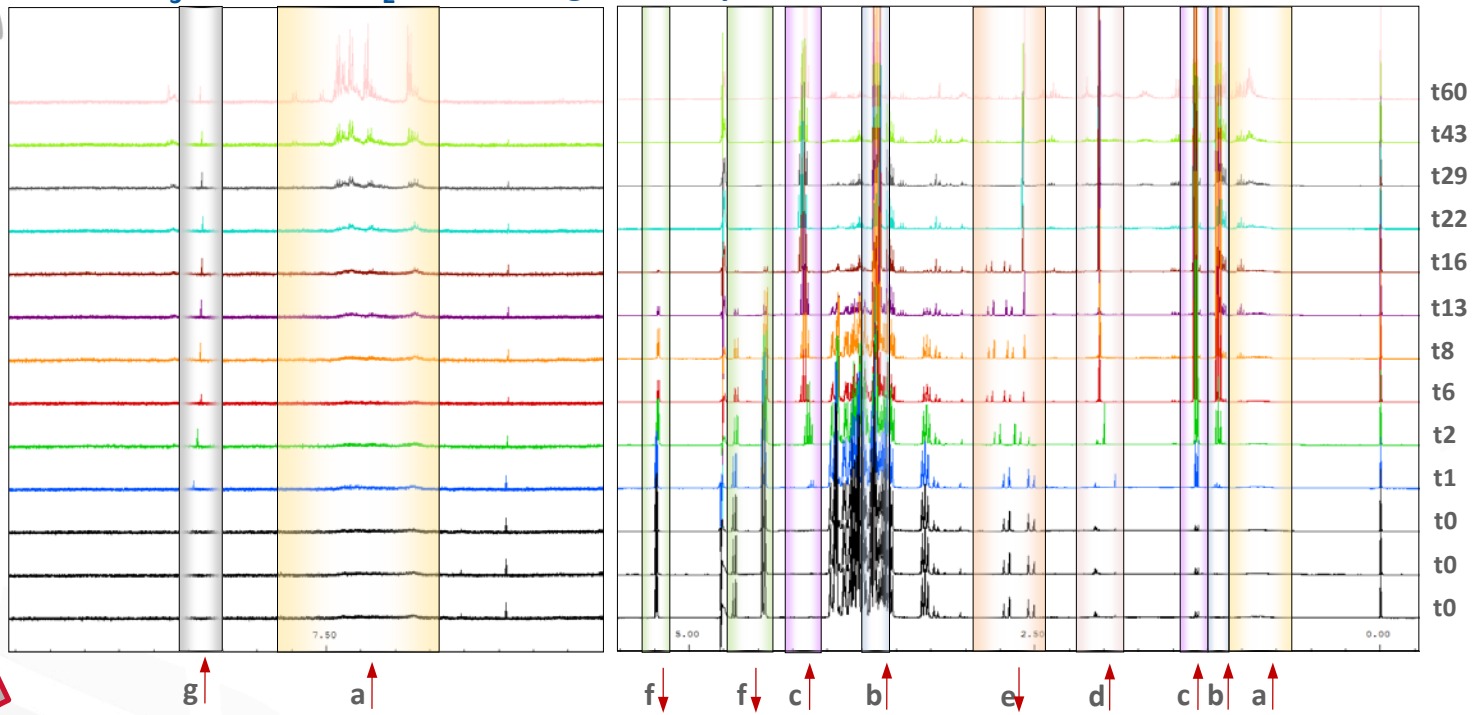
Giorni di conservazione del latte prima dell'analisi NMR

Sigla	Giorni dal prelievo
t0	0
t1	1
t2	2
t6	6
t8	8
t13	13
t16	16
t22	22
t29	29
t43	43
t60	60

Studio di stabilità - NMR

➢ Temperatura: campioni conservati a Tamb (~ 20-25°C)

Spettri ^1H HR-NMR di un campione di latte di massa conservato a temperatura ambiente senza NaN_3 estratto in D_2O a diversi giorni dal prelievo.



tx: latte estratto a x giorni dal prelievo

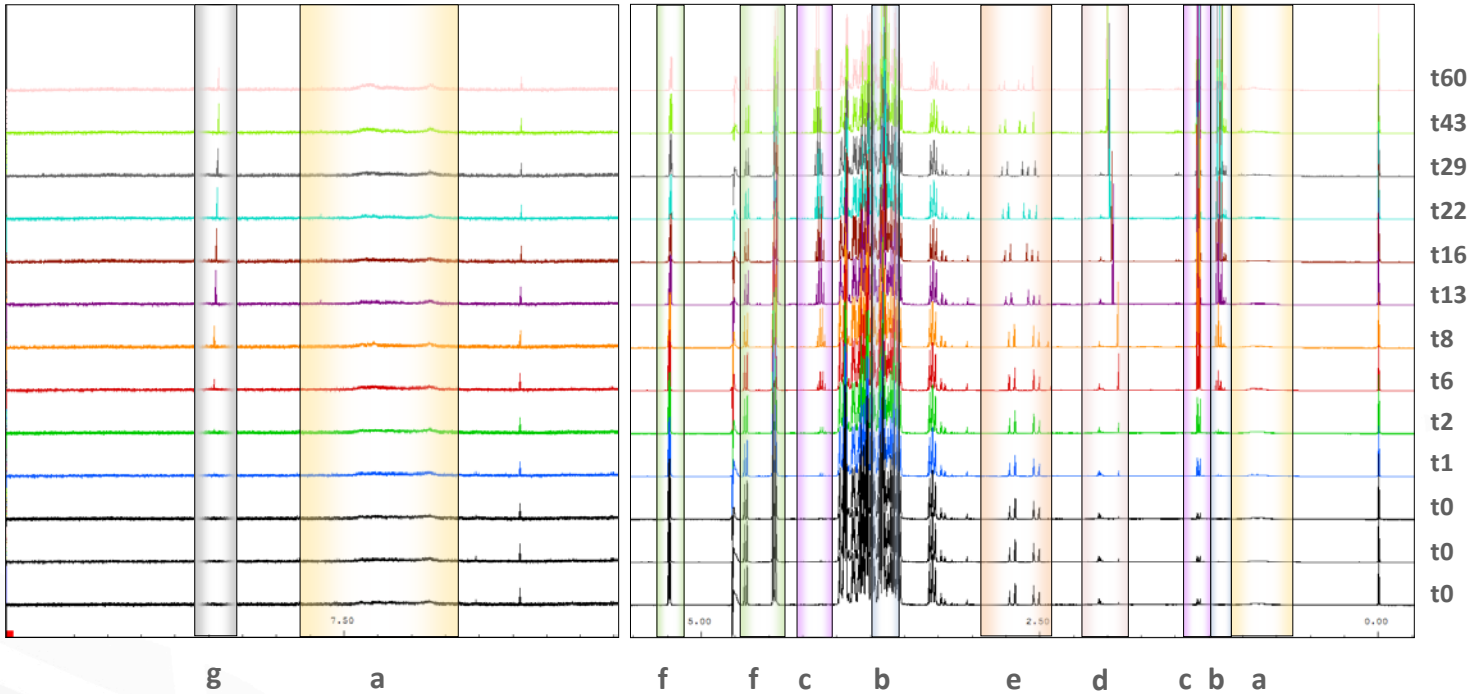
Le lettere "a-g" indicano alcune regioni dello spettro NMR in cui si osserva un aumento (↑) o una diminuzione (↓) dei segnali relativi a particolari metaboliti.

Shift e variazioni nell'intensità di alcuni segnali

Studio di stabilità - NMR

➢ **Temperatura: campioni conservati in frigo (~ 2-8°C)**

Spettri ^{1}H HR-NMR di un campione di latte di massa conservato in frigorifero senza NaN_3 estratto in D_2O a diversi giorni dal prelievo.



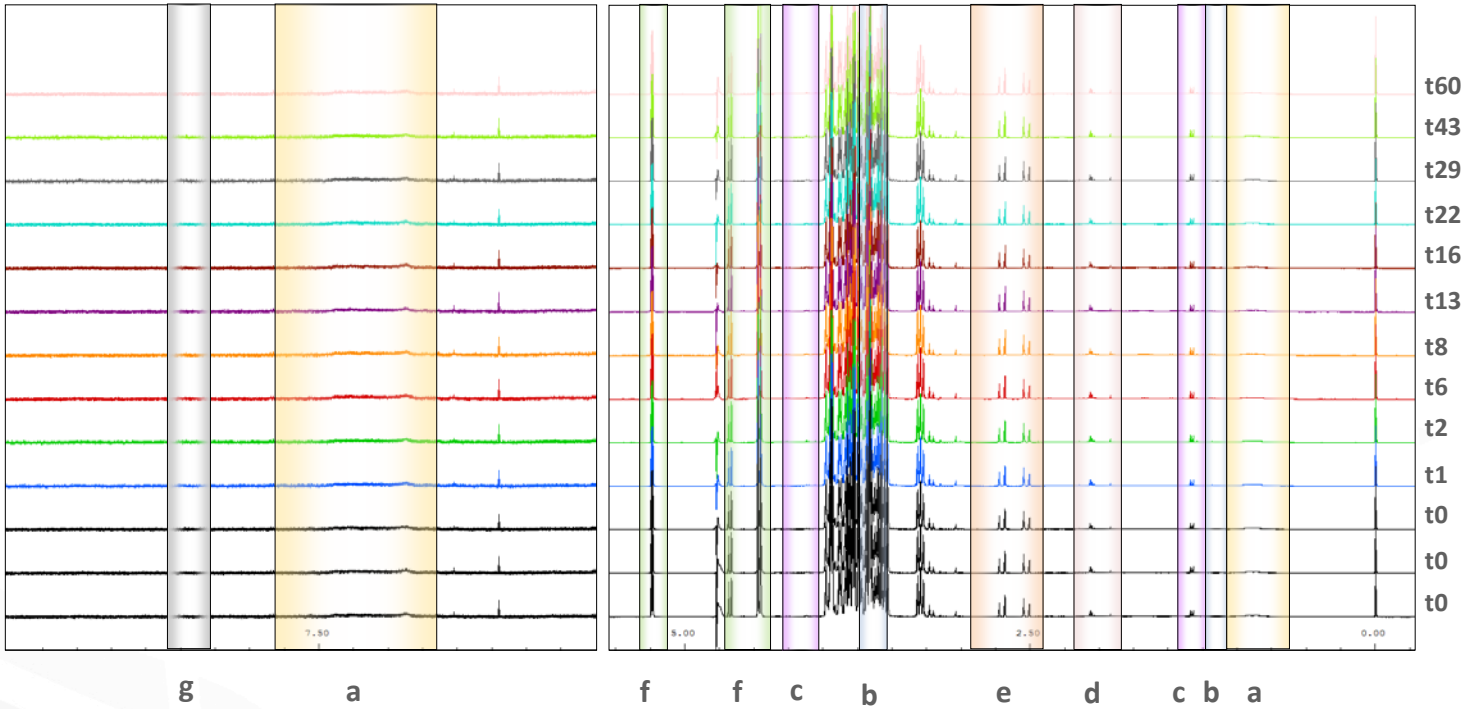
tx: latte estratto a x giorni dal prelievo

variazioni più contenute ma comunque presenti ed evidenti

Studio di stabilità - NMR

➢ **Temperatura: campioni conservati in congelatore (~ -20°C)**

Spettri ^{1}H HR-NMR di un campione di latte di massa conservato in congelatore senza NaN_3 estratto in D_2O a diversi giorni dal prelievo.



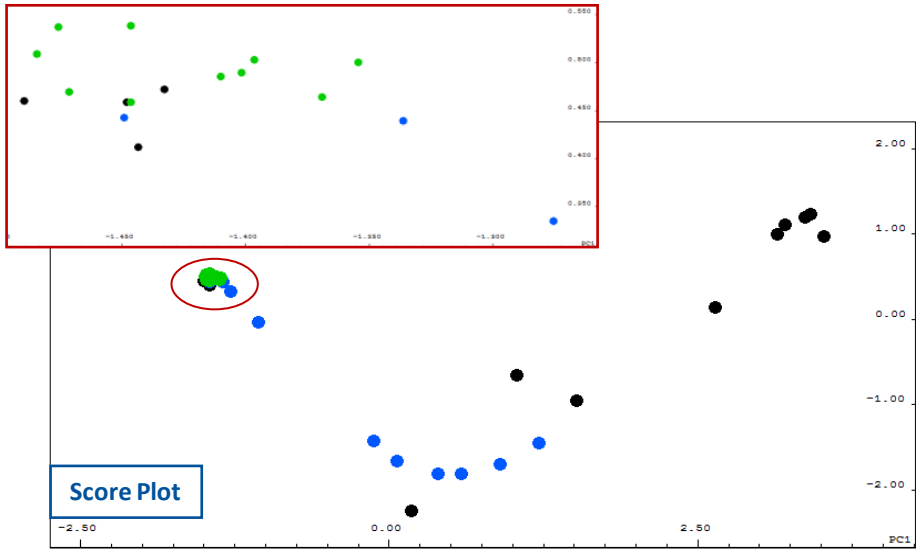
tx: latte estratto a x giorni dal prelievo

variazioni decisamente minori e dopo tempi lunghi…….

Studio di stabilità - NMR

➢ **Temperatura -** Analisi delle componenti principali (PCA)

PCA su spettri ^{1}H HR-NMR di un campione di latte di massa conservato a diverse temperature senza NaN_3 estratto in D_2O a diversi giorni dal prelievo (fino a 60).



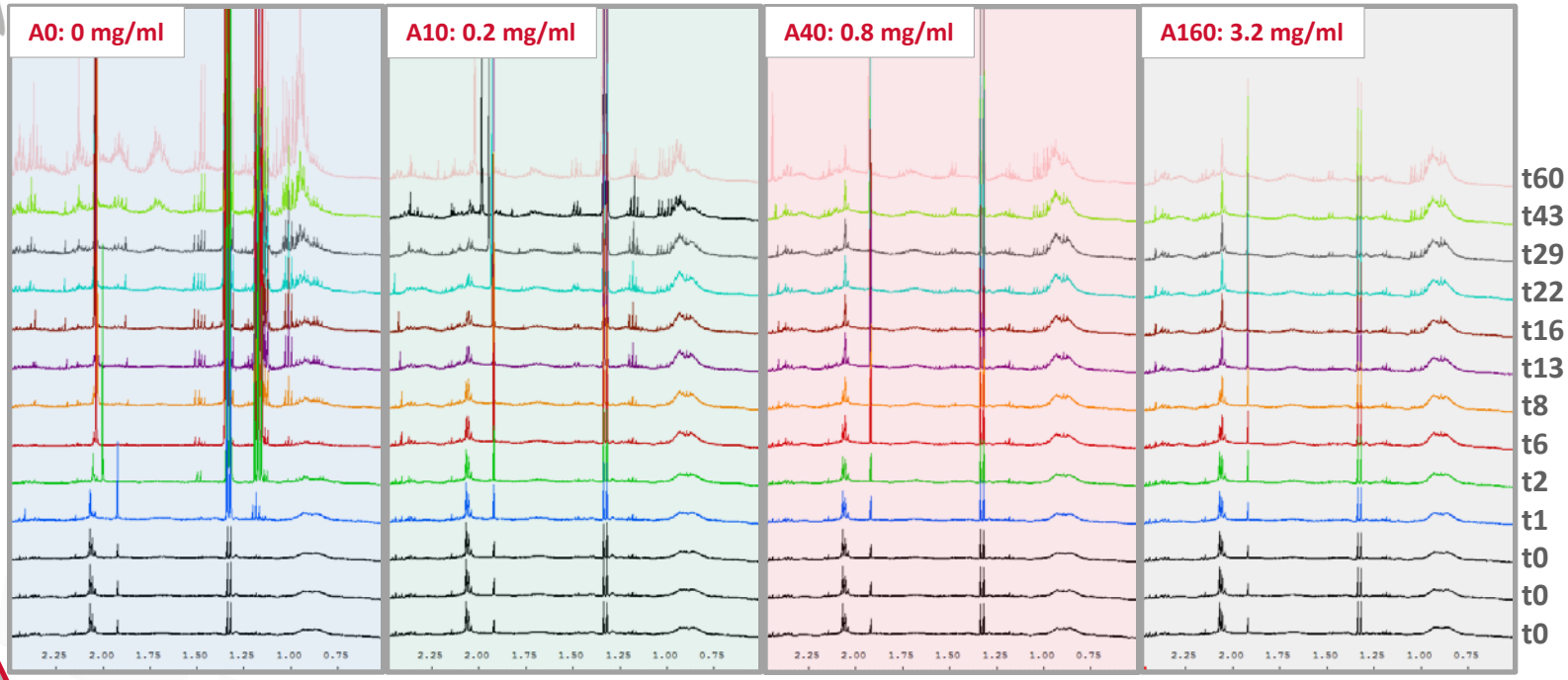
nero: campioni conservati a temperatura ambiente
blu: campioni conservati in frigorifero
verde: campioni conservati in congelatore
*indagine PCA condotta senza scalatura sugli spettri e applicando pareto scaling sulle variabili
Nel riquadro in alto l'ingrandimento della zona dello score plot evidenziata in rosso

Il congelamento ostacola la variazione dei profili metabolici nel tempo ma non la elimina completamente

Studio di stabilità - NMR

➢ **Stabilizzante (NaN_3): diverse quantità (0 - 0.2 - 0.8 - 3.2) mg/ml**

Effetto di NaN_3 sulla stabilità del latte a temperatura ambiente



tx: latte estratto a x giorni dal prelievo

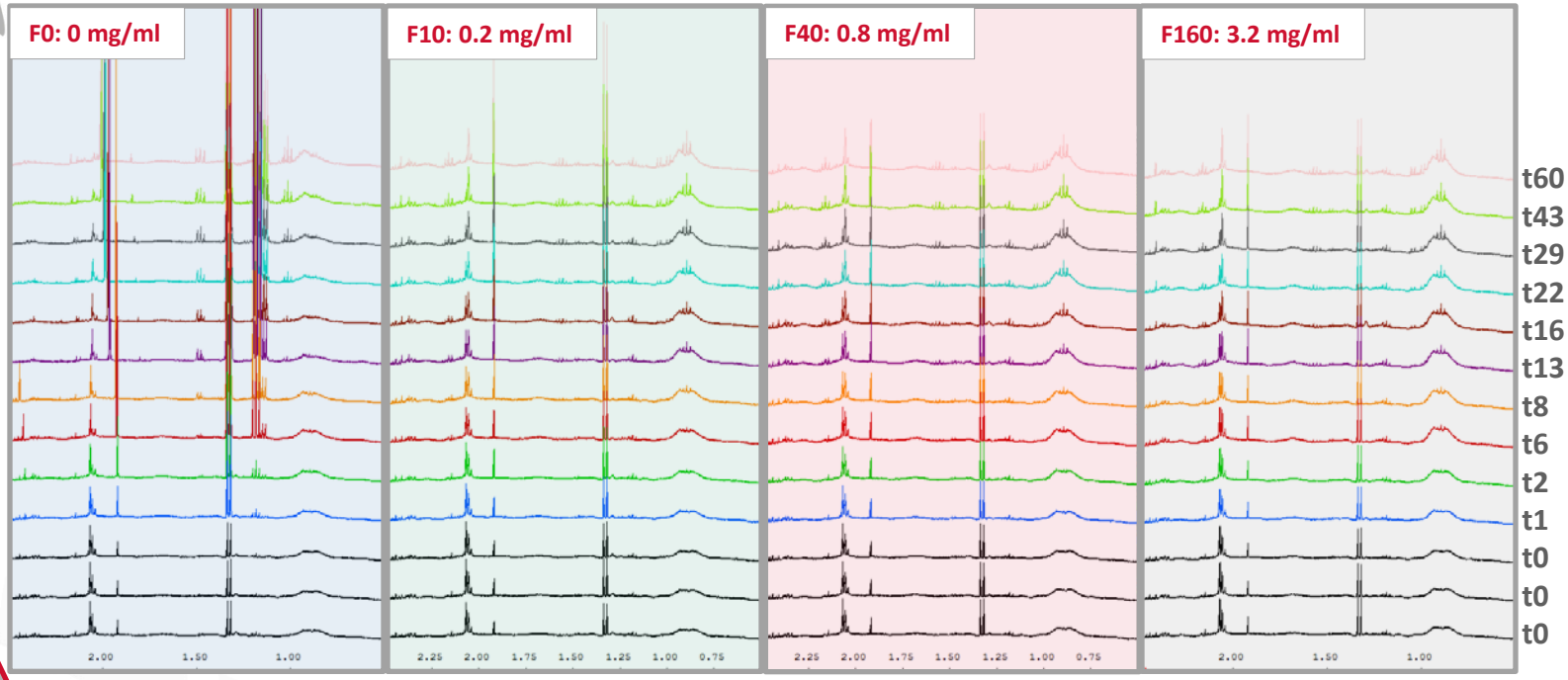
Riportata una regione dello spettro NMR a titolo di esempio

L'aggiunta di NaN_3 riduce ma non annulla le modificazioni a carico del profilo dei metaboliti nel tempo

Studio di stabilità - NMR

➢ **Stabilizzante (NaN_3): diverse quantità (0 - 0.2 - 0.8 - 3.2) mg/ml**

Effetto di NaN_3 sulla stabilità del latte refrigerato



tx: latte estratto a x giorni dal prelievo

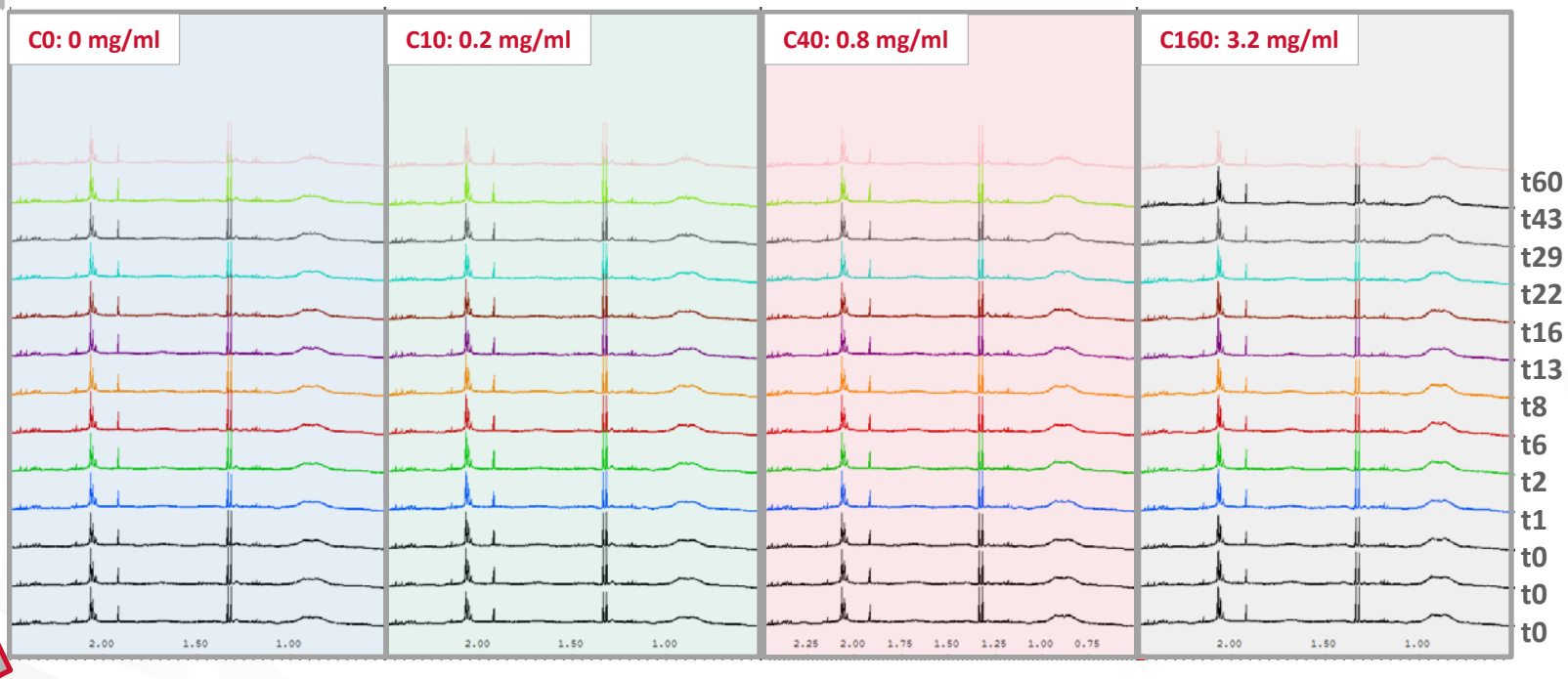
Riportata una regione dello spettro NMR a titolo di esempio

Rallenta il processo degradativo rispetto ai campioni conservati a temperatura ambiente. Si ha comunque una modificazione del profilo dei metaboliti anche con le concentrazioni maggiori di NaN_3

Studio di stabilità - NMR

➢ **Stabilizzante (NaN_3): diverse quantità (0 - 0.2 - 0.8 - 3.2) mg/ml**

Effetto di NaN_3 sulla stabilità del latte congelato



tx: latte estratto a x giorni dal prelievo

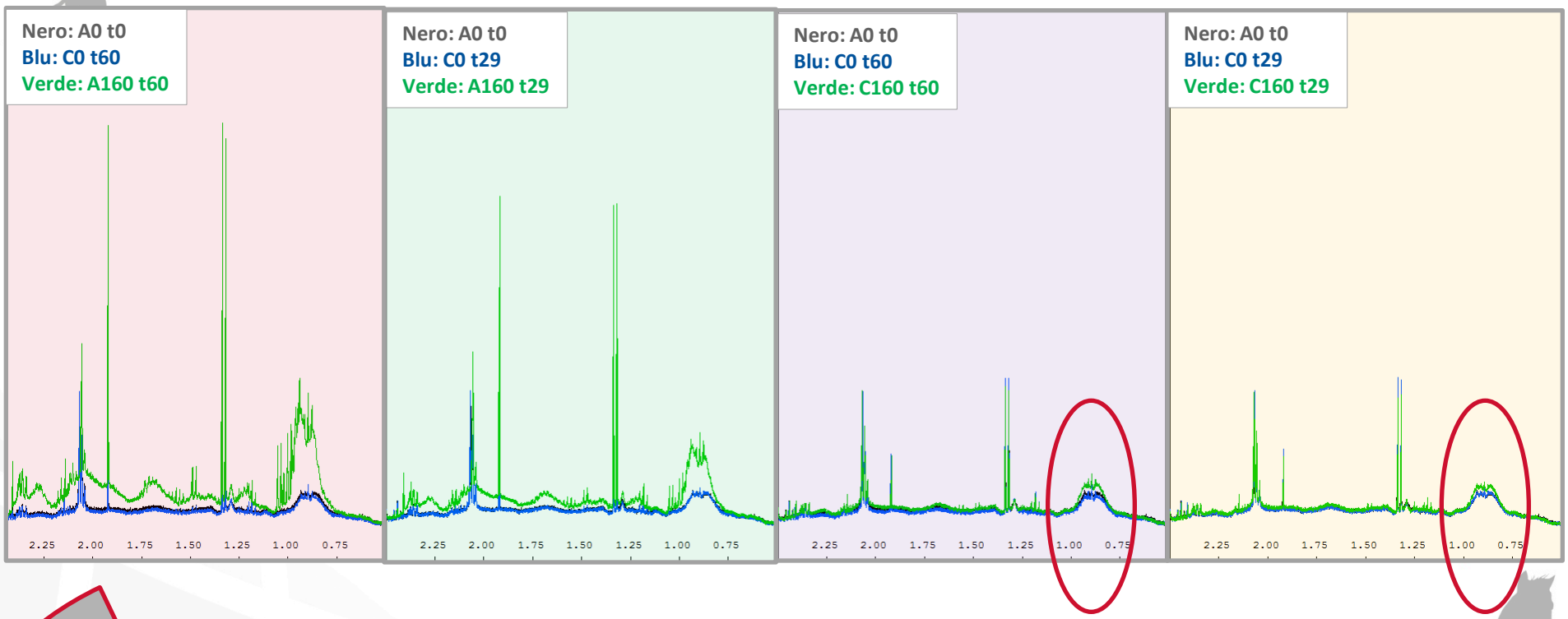
Riportata una regione dello spettro NMR a titolo di esempio

Rallenta ancora il processo degradativo ma resta una modificazione del profilo dei metaboliti anche con le concentrazioni maggiori di NaN_3

Studio di stabilità - NMR

Alla ricerca del profilo più somigliante…..

combinazioni temperature di conservazione e quantità di stabilizzante

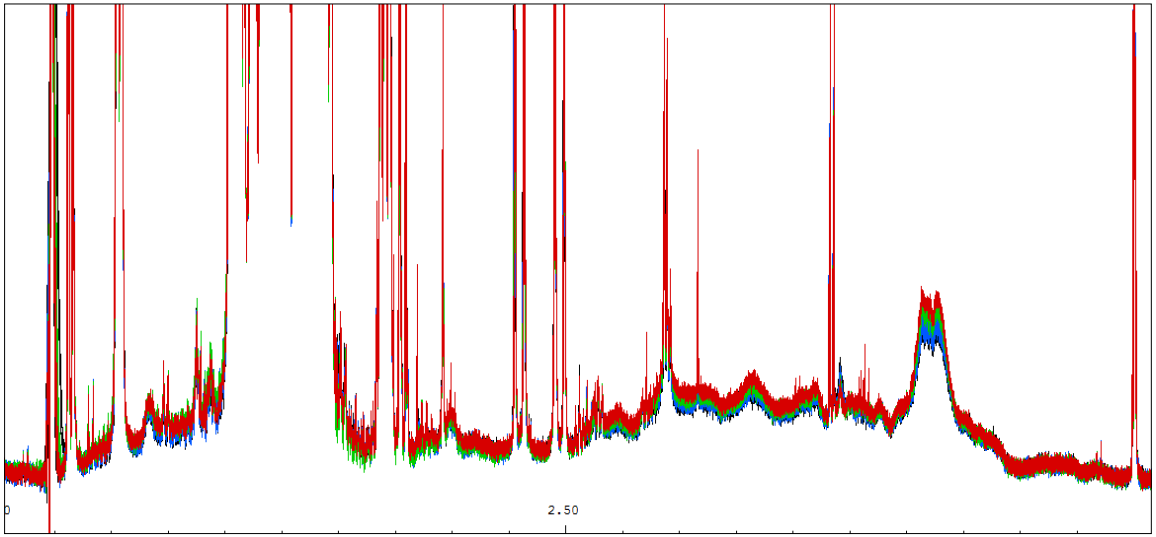


La somiglianza maggiore al campione «fresco» si ha con i campioni congelati in assenza di NaN_3

Studio di stabilità - NMR

Alla ricerca del profilo più somigliante…..

Figura 9. 12 Spettri ^1H HR-NMR del latte appena prelevato con aggiunta di diverse quantità di NaN_3 estratti in D_2O (tre repliche dovute alla preparazione in triplicato dei 4 campioni a diverse aggiunte).



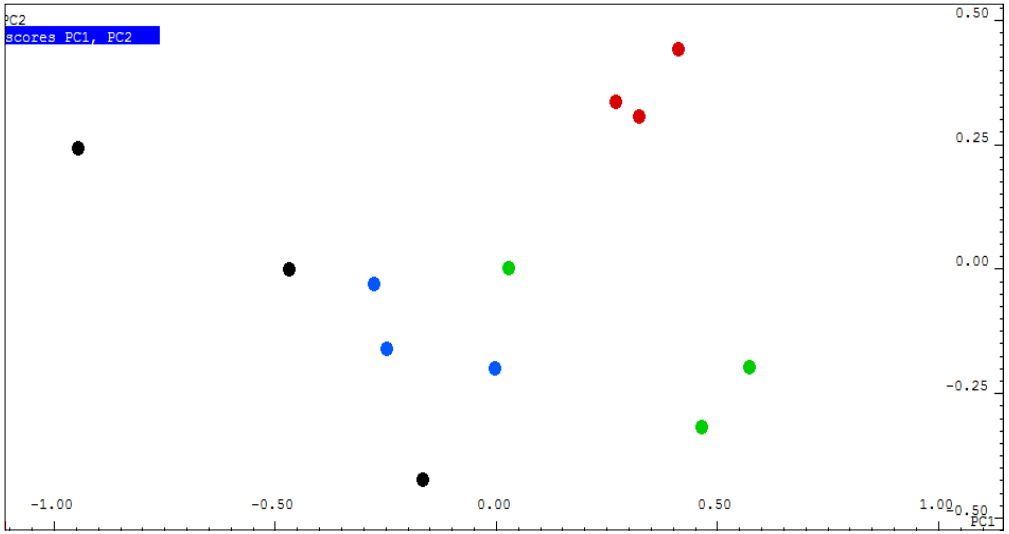
nero: campioni di latte appena prelevato senza NaN_3 estratti in D_2O (A0)
blu: campioni di latte appena prelevato con 10mg/50ml di NaN_3 estratti in D_2O (A10)
verde: campioni di latte appena prelevato con 40mg/50ml di NaN_3 estratti in D_2O (A40)
rosso: campioni di latte appena prelevato con 160mg/50ml di NaN_3 estratti in D_2O (A160)
L'immagine riporta un ingrandimento di una zona degli spettri NMR evidenziando la linea di base

Il profilo dei metaboliti presenta variazioni che aumentano all'aumentare della quantità di stabilizzante aggiunta

Studio di stabilità - NMR

Alla ricerca del profilo più somigliante…..

Figura 8. PCA Score Plot (PC1 vs PC2) di spettri ^1H HR-NMR del latte appena prelevato con aggiunta di diverse quantità di NaN_3 estratto in D_2O



nero: campioni di latte appena prelevato senza NaN_3 estratti in D_2O (A0)
blu: campioni di latte appena prelevato con 10mg/50ml di NaN_3 estratti in D_2O (A10)
verde: campioni di latte appena prelevato con 40mg/50ml di NaN_3 estratti in D_2O (A40)
rosso: campioni di latte appena prelevato con 160 mg/50ml di NaN_3 estratti in D_2O (A160)
I tre campioni per ogni concentrazione di NaN_3 sono dovuti alla preparazione in triplicato dei 4 campioni a diverse aggiunte
I grafici sono relativi a indagine PCA condotta senza scalatura sugli spettri e applicando pareto scaling sulle variabili

Il profilo dei metaboliti presenta variazioni che aumentano all'aumentare della quantità di stabilizzante aggiunta

Studio di stabilità - NMR

CONCLUSIONI

- La matrice “latte di massa” mostra all’analisi ^{1}H HR-NMR un **profilo dei metaboliti che varia nel tempo**.
- **La diminuzione della temperatura ostacola tale processo** ma non lo elimina completamente.
- **L’aggiunta di stabilizzante NaN_3 ostacola tale processo** ma non lo elimina.
- **La diminuzione della temperatura di conservazione ha l’effetto più importante ai fini dello studio sulla conservazione dei campioni.**

Studio di stabilità - NMR

CONCLUSIONI

Dalle prove eseguite emerge che il miglior metodo di conservazione dei campioni di latte di massa è il **congelamento** da effettuarsi preferibilmente il giorno stesso del prelievo, al fine di diminuire il più possibile la variabilità dei profili metabolici nel tempo.

E' importante conservare la catena del freddo nei passaggi intermedi dal prelievo sul campo fino all'analisi in laboratorio.

..... Grazie a .....

Alessandra per i 7 anni di collaborazione
e
tutti voi per la cortese attenzione

Contatti:
g.migliorati@izs.it
s.milone@izs.it