Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

UNIMORE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche

Direttore: Prof. Mauro Soldati

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

CLASSE LM54

CARATTERIZZAZIONE CHIMICO E CHIMICO FISICA DELLA FILIERA DEL GORGONZOLA DOP: un approccio preliminare

Relatore:

Prof. Andrea Marchetti

Dr.ssa Veronica D'Eusanio

Tesi di Laurea di:

Mattia Pietropaolo

Correlatore:

Dr. Mirco Rivi

Anno accademico 2025/2026

Indice

1. SCOPI ... 1

2. TRACCIABILITÀ ED AUTENTICITÀ DEI PRODOTTI AGRO ALIMENTARI ... 3

1.1 Legislazione ... 6

1.2 Indicatori di tracciabilità ... 8

1.3 Il frazionamento isotopico ... 10

2.3.1. Il rapporto isotopico del carbonio ... 12

2.3.2. Il rapporto isotopico dell'ossigeno ... 15

2.3.3. La notazione Delta ... 17

3. GORGONZOLA DOP ... 19

3.1 Agroalimentare Internazionale ed Italiano ... 19

3.2 La filiera produttiva del Gorgonzola "DOP" ... 22

3.3 Zona di produzione ... 24

3.4 Il metodo produttivo ... 25

3.4.1 Il legame con il territorio ... 26

3.5 Origine ed etichettatura ... 27

3.6 Costituenti nutrizionali del Gorgonzola ... 29

4. CAMPIONAMENTO ... 31

4.1. Campioni di latte ... 32

5. TECNICHE ANALITICHE ... 33

5.1 Determinazione dell'indice di rifrazione ... 33

5.2 Determinazione del pH ... 34

5.3 Polarimetria ... 34

5.4. Determinazione della densità ... 35

5.5. Headspace Solid Phase Micro Extraction abbinata a Gas cromatografia-Spettrometria di massa, HS-SPME GC/MS ... 35

5.5.1. Principio di funzionamento ... 38

5.5.2. Chimica delle fibre SPME ... 38

5.6. Determinazione del contenuto elementare ... 41

5.7. Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) ... 43

5.7.1 Determinazione del $\delta^{13}C$ degli amminoacidi mediante LC-LiquiFace-IRMS ... 43

5.7.3. Determinazione del $\delta^{18}O$ dell'acqua mediante iso FLOW-IRMS ... 48

5.7.4. Spettrometro di massa IRMS ... 50

5.7.4.1. Sorgente di ionizzazione ... 51

5.7.4.2 Analizzatore di massa a settore magnetico ... 52

5.7.4.3 Multicollettore a Coppe di Faraday ... 54

6. METODI DI TRATTAMENTO DEI DATI 57
6.1 Analisi delle componenti principali, PCA 57
6.2. Visualizzazione dei dati mediante Box Plot 59
7. RISULTATI E DISCUSSIONE 63
7.1 Caratteristiche chimico-fisiche del bulk 63
7.1.1. Densità ed Indice di rifrazione 66
7.1.2 Valori di pH 68
7.1.3 Contenuto di Lattosio 69
7.1.4 Analisi del contenuto elementare CHNS 70
7.2 Rapporto isotopico dell'ossigeno nell'acqua 74
7.2.1 Accuratezza e precisione 76
7.3 Caratterizzazione qualitativa del profilo volatile mediante HS-SPME-GC/MS 79
7.3.1. Acidi grassi 80
7.3.2. Chetoni 83
7.3.3. Composti solforati 86
7.3.4. Alcoli 90
7.3.5 Esteri 91
7.3.6 Aldeidi 94
7.3.7 Composti aromatici 95
7.4. Profilo dei composti organici volatili (VOC) trattato mediante analisi delle componenti principali (PCA). 98
7.5 Rapporto isotopico del carbonio 100
7.5.1 Sviluppo ed ottimizzazione del metodo 100
7.5.2 Ottimizzazione della separazione degli analiti tramite cromatografia 100
8. CONCLUSIONI 102
9. PROCEDURE, MATERIALI E STRUMENTAZIONE 103
9.1 PROCEDURE 103
9.1.1. Procedura per la determinazione dell'indice di rifrazione 103
9.1.2. Procedura per la determinazione della densità 103
9.1.3. Procedura per la determinazione del pH 103
9.1.4. Procedura per la determinazione del contenuto di lattosio 104
9.1.5 Procedura per la determinazione del contenuto elementare 104
9.1.6 Procedura per la determinazione del rapporto isotopico del carbonio 104
9.1.7 Procedura per la determinazione del rapporto isotopico dell'ossigeno dell'acqua 104
9.1.8 Procedura di campionamento della frazione volatile di campioni di latte, formaggio fresco e gorgonzola. 105

9.1.9 Procedura di analisi qualitativa della frazione volatile di campioni di latte, formaggio fresco e gorgonzola. 106
9.2 Materiali 107
9.3 Strumentazione 108
10. BIBLIOGRAFIA 112
Appendice 1 117
Appendice 2 118
Appendice 3 122

1. SCOPI

Il presente lavoro fa parte delle attività di ricerca svolte presso il Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche dell'Università di Modena e Reggio Emilia durante il periodo di internato per la predisposizione della tesi di Laurea. L'argomento trattato rientra all'interno delle tematiche di sviluppo di tecniche analitiche o approcci metodologici in grado di contribuire all'aumento delle conoscenze sulla tracciabilità, il controllo qualità e l'autenticità di materie prime e prime-seconde, utilizzate nelle filiere di prodotti agro-alimentari, e dei relativi prodotti finiti.

In seguito alla grande crescita del settore food sono aumentate esponenzialmente repliche di prodotti, di qualità superiore rispetto a mere imitazioni, in questo mercato molto ampio la richiesta da parte dei consumatori per alimenti autentici e certificati con marchi legati all'origine e/o al metodo di produzione, come DOP, IGP, è aumentata e ricercata.

I prodotti italiani hanno una forte rappresentanza e sono un riferimento a livello globale per la loro qualità. La protezione di questo status, ovvero della denominazione "Made in Italy" necessita di una tutela che non può essere solo a livello politico ma deve essere supportata anche con strumenti scientifici in grado di fornire indicazioni oggettive relativamente alle caratteristiche peculiari dei diversi prodotti.

Le informazioni ottenute sulle variabili qualitative e quantitative permettono di comprendere e risalire efficacemente alla territorialità, l'originalità e l'autenticità dei prodotti alimentari, garantendo la conformità del processo produttivo e la provenienza delle materie prime.

In questo caso particolare, l'obiettivo delle attività di ricerca è quello di sviluppare tecniche e metodologie analitiche a supporto delle conoscenze relative a prodotti lattiero-caseari con particolare riferimento al Gorgonzola DOP.

Il Gorgonzola è uno degli alimenti simbolo del nord Italia ed in particolare delle regioni Piemonte e Lombardia. Le caratteristiche che lo rendono un prodotto unico sono certamente quelle correlate alla sua filiera produttiva: territorio delimitato, latte proveniente da allevamenti certificati posizionati all'interno della zona d'origine, alimentazione degli animali regolamentata e processo produttivo strettamente regolato dal disciplinare di produzione sotto il controllo e la tutela dell'omonimo consorzio.

Tutto questo fa sì che il Gorgonzola sia un alimento ampiamente apprezzato dai consumatori come confermato dai dati di consumo interno e soprattutto dal valore dell'export.

Dall'altro lato, scarsi sono gli studi scientifici volti alla caratterizzazione e tutela del prodotto nazionale. Sebbene il numero di lavori scientifici sui formaggi erborinati, categoria alla quale

afferisce il Gorgonzola, sia elevato, quelli di ambito strettamente chimico sui temi della qualità, origine e tutela del prodotto nazionale sono pochi e spesso finalizzati alla sola descrizione degli aspetti microbiologici dei processi di fermentazione del latte o inoculo di lieviti e muffe.
Pertanto, una caratterizzazione sistematica dell'intera filiera, almeno per le produzioni nazionali, è quantomeno lacunosa.
L'evoluzione delle tecniche analitiche moderne, affiancata ai metodi di prova più consolidati, consente oggi di adottare un approccio scientifico rigoroso per la caratterizzazione dei prodotti alimentari. Attraverso l'integrazione di variabili sia quantitative che qualitative, è infatti possibile valutare in modo efficace parametri fondamentali quali l'autenticità, l'originalità e la territorialità delle filiere agroalimentari. Tale metodologia permette di ricavare dati oggettivi capaci di attestare non solo la conformità dei processi produttivi, ma anche la reale origine geografica delle materie prime impiegate.
In questo contesto si colloca il presente lavoro di tesi, svolto dal gruppo di ricerca di Chimica Analitica dedicato alla tracciabilità di prodotti a denominazione d'origine. La strategia d'indagine si avvale sia di indicatori primari, come i rapporti isotopici di elementi, le specie radiogeniche e la composizione elementare, sia di indicatori secondari, basati sul profilo di specifiche specie chimiche o su impronte strumentali (tracciati cromatografici e spettrometrici), accanto a una caratterizzazione generale dei campioni, l'attività sperimentale si è concentrata sulla determinazione dei rapporti isotopici del carbonio $^{13}C/^{12}C$ e dell'ossigeno $^{18}O/^{16}O$. Nello specifico, l'analisi isotopica del carbonio è stata focalizzata sugli amminoacidi presenti nel latte, mentre la misura del rapporto isotopico dell'ossigeno è stata condotta sulla molecola dell'acqua estratta dai campioni tal quali.

2. TRACCIABILITÀ ED AUTENTICITÀ DEI PRODOTTI AGRO ALIMENTARI

La garanzia che ogni prodotto che raggiunge la tavola dei consumatori rispetti gli standard produttivi e di qualità è una prerogativa sempre più ricercata da quest'ultimi. La caratterizzazione mediante un approccio chimico rappresenta è un potente alleato per la conoscenza dei tratti caratteristici di ogni alimento, incluso il suo processo produttivo, che viene immesso sul mercato e che arriva sulle nostre tavole.

Sulla base di questi presupposti, il concetto di "qualità" è diventato sempre più rilevante a livello globale al punto da richiedere una definizione generale e condivisa del suo significato. La norma ISO 8402:1994 definisce il termine qualità come "*la totalità degli aspetti e delle caratteristiche di un prodotto o di un servizio che influiscono sulle capacità di soddisfare ad un bisogno dichiarato o implicito"*.

Successivamente, il concetto viene reso più generale dalle rivisitazioni delle norme ISO 9000, la norma ISO 9000:2015 sposta l'attenzione dal servizio/prodotto al processo e/o l'insieme dei processi aziendali con cui questo viene creato, ovvero:

"*la qualità è l'insieme delle caratteristiche e delle proprietà di un prodotto, di un processo o di un servizio, le quali conferiscono ad esso la capacità di soddisfare le esigenze implicite o espresse del cliente"*. Volendo generalizzare e riunire i presupposti delle due definizioni potremmo concludere che solo da processi ben gestiti e controllati nascono buoni prodotti e/o servizi.

Sebbene il legislatore abbia cercato, attraverso la stesura della norma, di eliminare il carattere di soggettività del termine "qualità", è abbastanza evidente che l'ambito agro-alimentare, per sue caratteristiche, mantiene ancora tratti dipendenti dal grado di "soddisfazione" delle singole persone limitando l'oggettività della definizione e spesso, nel linguaggio comune del consumatore, creando una contrapposizione, errata, tra il termine qualità e quelli di buono e cattivo. Ovviamente, il concetto di qualità di un alimento deve essere considerato in modo più ampio all'interno della sua filiera produttiva come somma di diversi fattori in aggiunta ai caratteri gustativi.

Nel caso specifico di questa indagine preliminare, l'approccio olistico per la caratterizzazione della filiera produttiva del formaggio Gorgonzola DOP è basato su questi principi.

La caratterizzazione chimica delle materie prime, dei semilavorati fino al prodotto finito è realizzata partendo da un campionamento realizzato grazie alla collaborazione instaurata tra i ricercatori del gruppo di ricerca ed uno dei caseifici della zona di Novara impegnato in questo tipo di produzione. Riguardo questi passaggi è necessario comprendere profondamente tutti i processi

fisici, chimici e biologici che prendono parte nell'iter produttivo e che sono alla base delle manipolazioni delle materie di partenza: senza questa conoscenza garantire la qualità e salubrità di un prodotto risulterebbe difficile da soddisfare.
Ad oggi i consumatori dispongono di conoscenze più approfondite rispetto al passato e la loro consapevolezza è andata ad accrescersi negli anni, portandoli ad essere selettivi e critici verso la scelta di un alimento. Questa maggiore attenzione nasce da diverse motivazioni quali:

1. Valorizzazione del territorio: predilezione per i prodotti a "chilometro zero, Km0," e/o prodotti locali. Questa scelta è in parte basata sul desiderio di sostenere l'economia locale garantendosi prodotti più freschi e "tracciati";
2. Percezione di salute e genuinità: i delle filiere Bio o poco processati sono spesso considerati più genuini. In alcuni casi sono caratterizzati da un profilo organolettico superiore e hanno concreti benefici per il benessere personale;
3. Diffidenza verso i prodotti importati: la diffidenza nei confronti di alimenti importati o di provenienza extra-territoriale è in parte dovuta al timore di standard di produzione meno rigidi e al desiderio di tutelare le tipicità culinarie;
4. Sostenibilità ed etica di produzione: la crescente sensibilità verso le pratiche agricole a basso impatto ambientale quali l'agricoltura biodinamica, la tutela della biodiversità e il rispetto del benessere animale negli allevamenti sono tipici esempi di pratiche ritenute sostenibili ed etiche per l'ambiente e i consumatori [1].

In relazione a ciò, concetti come la "tracciabilità" e "l'autenticità" dei prodotti sono diventati via via sempre più centrali. Un alimento è tracciabile all'interno della filiera produttiva quando è possibile identificare tutto il percorso nel quale questo viene prodotto [2], seguendo l'intero processo, a monte, da dove provengono le materie prime, fino a valle, come si presenta alla fine del ciclo produttivo. Questa peculiarità del prodotto/processo permette di identificare eventuali contaminazioni o eventuali rischi per la salute pubblica secondo un approccio "From Farm to Fork/Table [3]. Al contempo, un prodotto è autentico quando la sua descrizione informativa rispecchia in modo veritiero le sue caratteristiche organolettiche e chimico fisiche, riferendosi ad un alimento che è privo di qualsiasi forma di frode alimentare e adulterazione, un prodotto genuino e corrispondente all'originale [4].
È opportuno riportare definizioni specifiche delle azioni da cui si intende proteggere uno specifico alimento o una filiera produttiva, per poter comprendere appieno che tipo di conseguenze possono avere queste sui produttori, sui consumatori e sull'immagine del prodotto/territorio stesso. La

motivazione più comune che porta alla contraffazione di un alimento è quella di ridurre i costi di produzione. Da un punto di vista normativo esistono diversi livelli di contraffazione ai quali sono associati o associabili diversi rischi, anche per la salute, per il consumatore finale.
Pertanto, è possibile parlare di prodotti:

1. Sofisticati: aggiunta di sostanze estranee per migliorare artificiosamente l'aspetto o la qualità del prodotto;
2. Adulterati: modifica della composizione reale tramite sottrazione di elementi pregiati o aggiunta di ingredienti di minor valore;
3. Alterati: degrado naturale delle caratteristiche del prodotto dovuto a condizioni di cattiva conservazione o al trascorrere del tempo;
4. Contraffatti: produzione ex-novo o vendita di un alimento sotto un falso marchio, nome o denominazione.

Tra gli strumenti a disposizione dei produttori per dare una maggiore riconoscibilità al prodotto in termini di tutela legale e garantire in modo implicito la sua autenticità e sicurezza; il sistema basato sulle Indicazioni Geografiche o marchi di produzione sono certamente quelli che, ad oggi, hanno prodotto i maggiori benefici, anche economici, sia per i produttori che per i consumatori.

1.1 Legislazione

La tutela e la valorizzazione delle produzioni agroalimentari caratterizzate da uno specifico legame con il territorio sono supportate, a livello europeo, da un articolato sistema normativo volto a proteggere le denominazioni registrate e a fornire ai consumatori informazioni affidabili sull'origine e sulle caratteristiche dei prodotti [5].

Il quadro normativo europeo relativo alle indicazioni geografiche ha subito nel tempo diverse evoluzioni. Una prima disciplina organica è stata introdotta con il Regolamento (CEE) n. 2081/92, relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine dei prodotti agricoli e alimentari [6]. Successivamente, la normativa è stata aggiornata attraverso i Regolamenti (CE) n. 509/2006, relativo alle specialità tradizionali garantite, e n. 510/2006, riguardante la protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine. Tali disposizioni sono state successivamente riunite e riorganizzate nel Regolamento (UE) n. 1151/2012 sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari [7].

Il quadro normativo è stato ulteriormente aggiornato con il Regolamento (UE) 2024/1143, attualmente vigente, relativo alle indicazioni geografiche dei vini, delle bevande spiritose e dei prodotti agricoli, nonché alle specialità tradizionali garantite e alle indicazioni facoltative di qualità per i prodotti agricoli. Tale regolamento ha abrogato il precedente Regolamento (UE) n. 1151/2012 e costituisce oggi il principale riferimento normativo europeo in materia.

Nell'ambito dei regimi di qualità dell'Unione Europea assumono particolare rilevanza la Denominazione di Origine Protetta (DOP), l'Indicazione Geografica Protetta (IGP) e la Specialità Tradizionale Garantita (STG).

La "**Denominazione di Origine Protetta (DOP)**" identifica un prodotto originario di un luogo, di una regione o, in casi eccezionali, di un determinato Paese, le cui qualità o caratteristiche sono dovute essenzialmente o esclusivamente a uno specifico ambiente geografico e ai relativi fattori naturali e umani. Per i prodotti DOP, tutte le fasi di produzione previste devono svolgersi all'interno della zona geografica delimitata [6];

L'"**Indicazione Geografica Protetta (IGP)**" identifica invece un prodotto originario di un determinato luogo, regione o Paese, per il quale una determinata qualità, reputazione o altra caratteristica sia essenzialmente attribuibile alla sua origine geografica. A differenza della DOP, è sufficiente che almeno una delle fasi della produzione si svolga nella zona geografica delimitata. [6];

La "**Specialità Tradizionale Garantita (STG)**" tutela invece il carattere tradizionale di un prodotto, con particolare riferimento al metodo di produzione o trasformazione, alla composizione oppure all'impiego di materie prime o ingredienti tradizionali. A differenza di DOP e IGP, la STG non presuppone necessariamente un legame con una specifica area geografica [7].

I regimi di qualità dell'Unione Europea consentono pertanto di identificare e tutelare produzioni caratterizzate da specifici requisiti di origine, qualità o tradizionalità. Le denominazioni registrate e i relativi simboli europei permettono inoltre al consumatore di riconoscere i prodotti conformi ai rispettivi disciplinari e contribuiscono alla protezione delle produzioni da usi impropri, imitazioni ed evocazioni.

Corre l'obbligo ricordare che la presenza di questi marchi sulle confezioni dei prodotti, un tempo associata erroneamente alla qualità dell'alimento stesso (i marchi DOP ed IGP erano in molti casi associati alla qualità dell'alimento: *marchi di qualità*) rappresenta un valore aggiunto e una tutela legale per il produttore che aderisce a quella specifica filiera produttiva. Ciò significa che nel passaggio tra le vecchie denominazioni, DOC, DOCG, ecc. un tempo utilizzate nell'ambito enologico, alle attuali DOP e IGP si è persa la parte di controllo analitico del prodotto, un tempo obbligatoria e garantita dalla denominazione (Denominazione di Origine Controllata) a fronte di una "Protezione" legale del marchio. Il controllo dell'alimento ci può essere ma non rappresenta un obbligo di legge.

1.2 Indicatori di tracciabilità

Nell'ambito degli studi di autenticità e tracciabilità degli alimenti possono essere impiegate numerose tecniche analitiche, selezionate in funzione della matrice, degli analiti di interesse e dell'informazione richiesta. Nel settore lattiero-caseario, tali approcci sono stati applicati a differenti matrici, tra cui latte, formaggi freschi e stagionati e altri prodotti derivati [8]. La complessità delle matrici alimentari e la molteplicità dei fattori che possono influenzarne la composizione rendono tuttavia difficile ricondurre l'origine o l'autenticità del prodotto a un singolo parametro analitico. Sebbene ciascuna tecnica possa fornire informazioni specifiche e potenzialmente discriminanti, un approccio multiparametrico, basato sull'integrazione di dati di diversa natura, consente generalmente una caratterizzazione più completa, olistica, e robusta del prodotto ed eventualmente della relativa filiera.
In questo contesto, gli indicatori utilizzati negli studi di tracciabilità possono essere distinti, in termini generali, in due principali categorie:

1. Indicatori primari o direttamente correlati all'origine: comprendono parametri la cui variabilità può essere ricondotta, almeno in parte, alle caratteristiche geologiche, climatiche e ambientali del territorio o alle materie prime utilizzate. Rientrano in questa categoria, ad esempio, la composizione isotopica di alcuni elementi e, in determinati contesti, il profilo elementare. Tali indicatori possono fornire informazioni sul legame tra prodotto e ambiente di origine, sebbene la loro capacità discriminante dipenda dalle caratteristiche delle aree considerate e dalla variabilità naturale dei parametri analizzati.
2. Indicatori indiretti (o secondari): comprendono parametri associati alla composizione complessiva della matrice e influenzati da numerosi fattori, quali origine delle materie prime, alimentazione animale, condizioni ambientali, processi tecnologici, maturazione e conservazione. In questa categoria possono rientrare profili di composti organici, parametri chimico-fisici, caratteristiche spettroscopiche e altre impronte strumentali. L'analisi congiunta di numerose variabili, spesso supportata da strumenti statistici multivariati, può consentire di evidenziare analogie e differenze tra gruppi di campioni e di sviluppare modelli di classificazione o discriminazione.

Tra le tecniche maggiormente impiegate per la caratterizzazione delle matrici agroalimentari rientrano quelle cromatografiche, spettrometriche e spettroscopiche. Particolare rilevanza assumono le tecniche cromatografiche, eventualmente accoppiate alla spettrometria di massa, che

permettono la separazione, l'identificazione e, quando opportunamente validate, la quantificazione di numerose specie chimiche presenti anche in matrici complesse.

La cromatografia liquida (LC) trova ampia applicazione nella determinazione di composti non volatili e termolabili e può essere associata a differenti sistemi di rilevazione in funzione degli analiti di interesse. L'elevata versatilità della tecnica ne consente l'impiego in numerosi ambiti della caratterizzazione agroalimentare. Tuttavia, l'analisi di matrici complesse richiede frequentemente procedure preliminari di estrazione, purificazione e preparazione del campione, che possono incidere significativamente sui tempi complessivi dell'analisi.

La gascromatografia (GC) è invece particolarmente adatta alla separazione e all'analisi di composti volatili e semivolatili e, quando accoppiata alla spettrometria di massa, consente di ottenere informazioni sia qualitative sia quantitative sul profilo di numerose classi di composti. Per tale motivo, la GC-MS è largamente utilizzata nella caratterizzazione della frazione volatile degli alimenti e nello studio dei composti responsabili dell'aroma, nonché nella ricerca di marker associati all'origine, al processo produttivo o allo stato di conservazione.

Accanto a queste tecniche, un ruolo particolarmente rilevante negli studi di autenticità e tracciabilità agroalimentare è rivestito dalla spettrometria di massa dei rapporti isotopici (Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS). Tale tecnica consente di determinare con elevata precisione le variazioni naturali nei rapporti tra isotopi stabili di elementi leggeri, quali $^{2}H/^{1}H$, $^{13}C/^{12}C$, $^{18}O/^{16}O$, $^{15}N/^{14}N$ e $^{34}S/^{32}S$. La composizione isotopica di un prodotto alimentare può essere influenzata da diversi fattori, tra cui l'origine geografica delle materie prime, le condizioni climatiche e idrologiche, il metabolismo delle specie vegetali e animali, le pratiche agricole e l'alimentazione animale [9] [10].

I rapporti isotopici possono pertanto rappresentare utili indicatori dell'origine e della storia produttiva di una matrice alimentare. La loro interpretazione richiede tuttavia particolare cautela, poiché uno stesso intervallo di composizione isotopica può essere osservato in prodotti provenienti da aree geografiche differenti. La distribuzione degli isotopi stabili nell'ambiente è infatti il risultato dell'interazione di numerosi fattori e non necessariamente permette di associare in maniera univoca un determinato valore a una specifica area geografica.

Per aumentare la capacità descrittiva e discriminante dell'approccio analitico, risulta pertanto vantaggioso integrare le informazioni isotopiche con ulteriori parametri chimici e chimico-fisici. L'impiego combinato di differenti tecniche consente di ottenere un profilo multiparametrico, o fingerprint analitico, della matrice, potenzialmente più efficace rispetto all'utilizzo di un singolo indicatore per la caratterizzazione dell'origine e della filiera produttiva.

1.3 Il frazionamento isotopico

Gli isotopi sono atomi appartenenti allo stesso elemento chimico, caratterizzati dal medesimo numero atomico (Z), e quindi dallo stesso numero di protoni, ma da un differente numero di neutroni e, conseguentemente, da un diverso numero di massa (A). Poiché la configurazione elettronica è sostanzialmente la stessa, gli isotopi di uno stesso elemento presentano proprietà chimiche molto simili. Le differenze di massa determinano tuttavia variazioni, generalmente di piccola entità, nel comportamento fisico e chimico delle specie che li contengono. Tuttavia, tali differenze sono alla base dei fenomeni di frazionamento isotopico, ovvero della variazione delle rispettive abbondanze percentuali tra sostanze, fasi o comparti differenti. Poiché tali variazioni sono generalmente dipendenti dalla massa, gli isotopi leggeri e pesanti possono essere distribuiti in maniera differente durante specifici processi naturali.
In natura, gli isotopi stabili di alcuni elementi, tra cui idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno e zolfo, sono presenti in proporzioni che possono variare in funzione dei processi fisici, chimici e biologici a cui sono sottoposte le sostanze che li contengono.

I fenomeni di frazionamento isotopico possono essere ricondotti principalmente a due categorie: il frazionamento cinetico e il frazionamento all'equilibrio.
Il frazionamento cinetico si manifesta prevalentemente durante processi unidirezionali o non all'equilibrio ed è associato alle differenti velocità con cui specie isotopicamente diverse partecipano a una trasformazione fisica, chimica o biochimica. A parità di temperatura, le molecole contenenti isotopi più leggeri presentano mediamente velocità maggiori rispetto alle corrispondenti specie contenenti isotopi più pesanti e possono quindi partecipare più rapidamente ad alcuni processi di diffusione, evaporazione o reazione. Un esempio è rappresentato dall'evaporazione dell'acqua, durante la quale la fase vapore tende a risultare relativamente arricchita negli isotopi più leggeri rispetto alla fase liquida residua.
Il frazionamento isotopico all'equilibrio si verifica invece quando due specie o fasi possono scambiarsi isotopi fino al raggiungimento dell'equilibrio termodinamico. Tale fenomeno è principalmente associato alle differenze nelle energie vibrazionali e nelle energie di legame delle molecole contenenti isotopi diversi. In termini generali, gli isotopi più pesanti tendono a essere maggiormente stabilizzati nei legami più forti e nelle specie caratterizzate da frequenze vibrazionali più elevate. L'entità del frazionamento dipende inoltre dalla temperatura e tende generalmente a diminuire al suo aumento.

La composizione isotopica osservata in una matrice agroalimentare deriva pertanto dall'interazione di numerosi processi ambientali, biologici e tecnologici. Le caratteristiche isotopiche di una determinata area geografica o di una particolare materia prima possono essere trasferite, con eventuali modificazioni dovute ai processi di frazionamento, agli organismi vegetali e animali e, successivamente, ai prodotti da essi derivati [11]. Per queste ragioni, i rapporti tra isotopi stabili possono fornire informazioni relative all'origine delle materie prime, alle condizioni ambientali e ai processi biologici e produttivi che hanno contribuito alla formazione dell'alimento. La **Tabella 2.1** riassume i principali rapporti isotopici impiegati negli studi di autenticità e tracciabilità agroalimentare, evidenziandone il significato biogeochimico, le principali applicazioni nell'individuazione di possibili frodi o non conformità e le matrici alimentari nelle quali trovano maggiore impiego.

Tabella 2.1: Panoramica dei marker utilizzati per la classificazione delle diverse matrici. In particolare, sono riportati i diversi rapporti isotopici, i relativi processi naturali che causano il frazionamento isotopico e gli utilizzi pratici.

Impronta isotopica	Interpretazione biogeochimica	Esempio di applicazione nella frode alimentare	Prodotti interessati
Carbonio	Origine botanica *(fotosintesi C3, C4 e CAM)*	Adulterazione *(es. aggiunta zuccheri esogeni)*	Miele, distillati/liquori, vino, olio d'oliva, burro, aromi, ecc.
Azoto	Processi del suolo, tipologia di fertilizzazione delle piante	Falsa etichettatura *(differenziazione tra biologico e convenzionale)*	Frutta, verdura, carne, ecc.
Zolfo	Condizioni locali del suolo, prossimità alla linea di costa	Origine del prodotto	Frutta, verdura, carne, miele, ecc.
Ossigeno	Principalmente legato alle precipitazioni locali/regionali e quindi all'area geografica	Annacquamento delle bevande, identificazione dell'origine geografica del prodotto	Caffè, vino, distillati/liquori, acqua, zucchero, carne, ecc.
Idrogeno	Legato alle precipitazioni locali/regionali e quindi all'area geografica	Annacquamento delle bevande, identificazione dell'origine del prodotto	Caffè, vino, distillati/liquori, acqua, zucchero, carne, ecc.

In questo lavoro di tesi, i rapporti isotopici determinati sono: rapporto isotopico ossigeno $^{18}O/^{16}O$, e carbonio negli amminoacidi,$^{13}C/^{12}C$.

2.3.1. Il rapporto isotopico del carbonio

Il carbonio presenta in natura due isotopi stabili, ^{12}C e ^{13}C, con abbondanze relative pari rispettivamente a circa il 98.9% e l'1.1%. La differenza di massa tra i due isotopi determina piccoli effetti isotopici nei processi fisici, chimici e biochimici, che possono modificare il rapporto $^{13}C/^{12}C$ delle diverse matrici naturali attraverso fenomeni di frazionamento isotopico.

Nel caso del carbonio, uno dei principali fenomeni responsabili delle differenze nella composizione isotopica della materia organica è rappresentato dalla fotosintesi. Durante la fissazione della CO2 atmosferica, infatti, le specie vegetali discriminano in misura differente tra $^{12}CO_2$ e $^{13}CO_2$ in funzione della via fotosintetica utilizzata. Ne deriva una diversa composizione isotopica del carbonio nei tessuti vegetali, che può successivamente essere trasferita lungo l'intera catena alimentare.

Sulla base del meccanismo di assimilazione della CO_2, le piante terrestri possono essere suddivise in tre principali gruppi fotosintetici:

- **Piante C3:** utilizzano il ciclo di Calvin-Benson, nel quale il primo prodotto stabile della fissazione della CO_2 è un composto a tre atomi di carbonio, il 3-fosfoglicerato. Questa via fotosintetica è la più diffusa tra le specie vegetali e caratterizza numerose colture e specie arboree, tra cui frumento, riso, soia, vite e numerose essenze forestali. La maggiore discriminazione nei confronti del ^{13}C determina valori di $\delta^{13}C$ generalmente più negativi rispetto a quelli osservati nelle piante C4.
- **Piante C4:** utilizzano un meccanismo di fissazione iniziale della CO_2 basato sull'enzima fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEP-carbossilasi), con formazione di un primo prodotto a quattro atomi di carbonio, l'ossalacetato. Tale meccanismo riduce la discriminazione isotopica nei confronti del ^{13}C e determina pertanto valori di $\delta^{13}C$ meno negativi rispetto alle piante C3. A questo gruppo appartengono importanti specie di interesse agronomico, tra cui mais, canna da zucchero e sorgo. Le piante C4 risultano particolarmente competitive in condizioni caratterizzate da elevate temperature, intensa radiazione solare e, frequentemente, limitata disponibilità idrica.
- **Piante CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*):** utilizzano una strategia fotosintetica caratterizzata dalla separazione temporale delle fasi di fissazione della CO_2. L'assorbimento della CO_2 avviene prevalentemente durante le ore notturne, quando gli

stomi sono aperti, mentre durante il giorno gli stomi rimangono generalmente chiusi, riducendo le perdite di acqua per traspirazione. Tale adattamento è caratteristico di numerose specie succulente e xerofite, tra cui cactus e agave. La composizione isotopica delle piante CAM può presentare un intervallo relativamente ampio, in funzione della proporzione con cui vengono utilizzate le diverse modalità di fissazione del carbonio.

Le differenze tra i principali metabolismi fotosintetici determinano quindi intervalli caratteristici di composizione isotopica del carbonio. In termini generali, le piante C3 presentano valori di $\delta^{13}C$ più negativi, tipicamente compresi nell'intervallo $-35 < \delta^{13}C < -20$ ‰, mentre le piante C4 mostrano valori meno negativi, generalmente compresi tra circa $-16 < \delta^{13}C < -9$ ‰. Le piante CAM possono invece assumere valori intermedi o parzialmente sovrapposti agli intervalli delle piante C3 e C4, in relazione alla specifica modalità di fissazione adottata e alle condizioni ambientali [12].

La distribuzione delle specie C3 e C4 è influenzata dalle condizioni climatiche e ambientali: le prime risultano generalmente predominanti negli ambienti temperati e relativamente freschi, mentre le seconde sono maggiormente diffuse in ambienti caratterizzati da temperature elevate e intensa irradianza [1]. Tale relazione non implica tuttavia l'esistenza di un semplice gradiente geografico del rapporto $^{13}C/^{12}C$ con la latitudine, poiché la composizione isotopica della vegetazione dipende dall'interazione tra metabolismo fotosintetico, specie vegetale e condizioni ambientali. Nel settore agroalimentare, queste differenze rappresentano un importante strumento di tracciabilità. La composizione isotopica del carbonio delle piante utilizzate nell'alimentazione animale può infatti riflettersi nei tessuti e nei prodotti di origine animale. Nel settore lattiero-caseario, in particolare, il rapporto isotopico del carbonio può fornire informazioni sulla composizione della dieta degli animali e, indirettamente, sui sistemi di allevamento e sulle pratiche produttive associate a specifiche filiere. La distinzione tra alimentazioni prevalentemente basate su specie C3, come molte essenze foraggere, e diete contenenti quantità significative di specie C4, come il mais, rappresenta pertanto una delle principali applicazioni del $\delta^{13}C$ nella caratterizzazione isotopica del latte e dei prodotti derivati. Le principali caratteristiche dei diversi metabolismi fotosintetici e i relativi intervalli di composizione isotopica sono riassunti nella **Tabella 2.2** e in forma grafica nella **Figura 2.1**.

Tabella 2.2: Classificazione delle piante in base al relativo ciclo fotosintetico e corrispondente intervallo di valori del rapporto isotopico $\delta^{13}C$.

Tipologia di Pianta	*Ciclo fotosintetico*	*Rapporto Isotopico* $\delta^{13}C$
C3	Ciclo di Calvin	$-35 \leq \delta^{13}C \leq -20$
C4	Ciclo di Hatch-Slack	$-16 \leq \delta^{13}C \leq -9$
CAM	Fissazione di anidride carbonica di tipo C3-like o C4 like in base alle condizioni ambientali	$-34 \leq \delta^{13}C \leq -10$

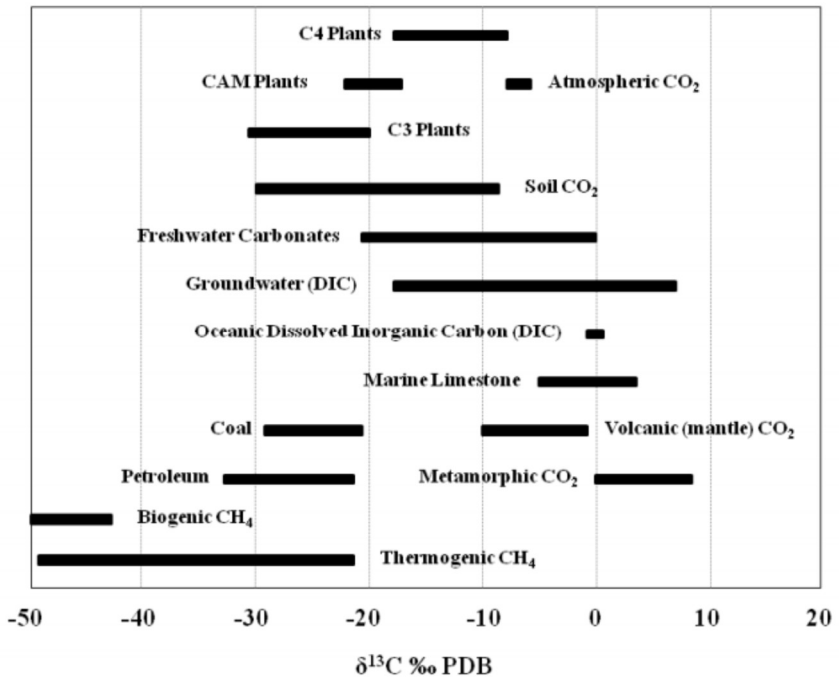


Figura 2.1: Intervalli di rapporto isotopico $\delta^{13}C$ relativamente ai diversi cicli fotosintetici utilizzati dai vegetali (segnalati da una freccia) rispetto ad altri serbatoi.

2.3.2. Il rapporto isotopico dell'ossigeno

Analogamente a quanto osservato per il carbonio, anche la composizione isotopica dell'ossigeno varia in natura in conseguenza di processi di frazionamento. Nel caso dell'ossigeno presente nella molecola dell'acqua, tali variazioni sono strettamente associate ai processi che caratterizzano il ciclo idrologico, in particolare evaporazione, condensazione e precipitazione.

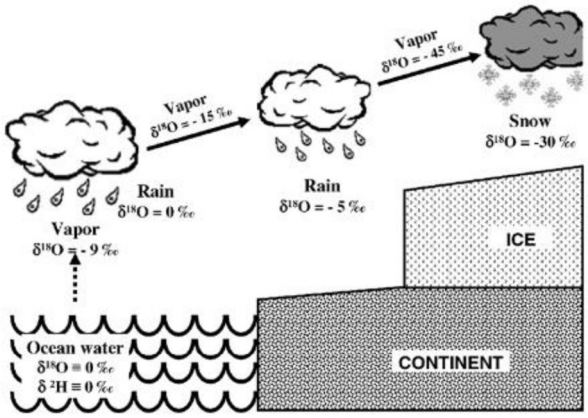


Figura 2.2: Effetti climatici e geografici sul frazionamento isotopico dell'ossigeno durante i processi di evaporazione, condensazione e precipitazione.

La **Figura 2.2** rappresenta in modo chiaro e comprensibile i processi associati al ciclo naturale dell'acqua.

Durante la fase di evaporazione si verifica un frazionamento isotopico tra la fase liquida e quella vapore. Le molecole d'acqua contenenti l'isotopo più leggero, ^{16}O, passano preferenzialmente nella fase vapore rispetto a quelle contenenti ^{18}O. Di conseguenza, il vapore prodotto risulta relativamente impoverito in ^{18}O rispetto alla fase liquida di origine, mentre l'acqua residua tende a essere relativamente arricchita nell'isotopo più pesante. Il processo opposto si verifica durante la condensazione: le molecole contenenti ^{18}O vengono preferenzialmente incorporate nella fase condensata rispetto a quelle contenenti ^{16}O. Le precipitazioni risultano pertanto isotopicamente più arricchite in ^{18}O rispetto al vapore atmosferico dal quale si formano. Contestualmente, il vapore residuo si impoverisce progressivamente nell'isotopo pesante. Durante il trasporto delle masse d'aria dalle aree oceaniche verso le regioni continentali, i successivi eventi di condensazione e precipitazione determinano quindi un progressivo impoverimento in ^{18}O del vapore atmosferico

residuo. Le precipitazioni che si formano nelle fasi successive del trasporto tendono, di conseguenza, a presentare valori di $\delta^{18}O$ progressivamente più negativi. Tale comportamento può essere descritto, in prima approssimazione, mediante un processo di distillazione di Rayleigh.

La composizione isotopica delle acque meteoriche non dipende tuttavia da un unico parametro geografico, ma dall'interazione di diversi fattori climatici e ambientali. Tra questi assumono particolare rilevanza la temperatura, la latitudine, l'altitudine, la distanza dalla costa o continentalità, l'origine e la traiettoria delle masse d'aria, la stagionalità e l'entità delle precipitazioni. La combinazione di tali fenomeni determina una distribuzione spaziale e temporale caratteristica dei valori di $\delta^{18}O$ nelle precipitazioni e, successivamente, nelle acque superficiali e sotterranee [12]. Questa variabilità rappresenta il presupposto per l'impiego della composizione isotopica dell'ossigeno negli studi di tracciabilità geografica dei prodotti agroalimentari. L'acqua utilizzata dagli organismi vegetali e animali riflette infatti, almeno in parte, la composizione isotopica delle risorse idriche disponibili nell'area di origine. Nel caso dei prodotti lattiero-caseari, il valore di $\delta^{18}O$ dell'acqua del latte è correlato alla composizione isotopica dell'acqua assunta dall'animale e può pertanto fornire informazioni di carattere geografico e climatico.

Tale relazione non deve tuttavia essere considerata come una semplice trasmissione diretta della firma isotopica dell'acqua ambientale al prodotto finale. La composizione isotopica dell'acqua del latte può essere influenzata anche dalla dieta, dalla stagione, dal metabolismo, dai processi fisiologici dell'animale e dai fenomeni di frazionamento associati al bilancio idrico. Il $\delta^{18}O$ dell'acqua del latte rappresenta quindi un indicatore potenzialmente utile della provenienza geografica, la cui interpretazione risulta più affidabile quando integrata con ulteriori informazioni isotopiche e chimiche.

2.3.3. La notazione Delta

Negli studi di composizione isotopica, l'informazione di maggiore interesse non è generalmente rappresentata dall'abbondanza assoluta dei singoli isotopi, bensì dalle variazioni del rapporto tra due isotopi dello stesso elemento. Tali variazioni, sebbene generalmente di piccola se non piccolissima entità, riflettono i fenomeni di frazionamento che si verificano durante i processi fisici, chimici e biologici e possono pertanto fornire informazioni sull'origine e sulla storia della matrice analizzata. La spettrometria di massa isotopica, IRMS, consente di determinare con elevata precisione il rapporto (R) tra l'isotopo più pesante e quello più leggero di uno stesso elemento, ad esempio $^{13}C/^{12}C$ o $^{18}O/^{16}O$. Per i motivi sopra esposti, un confronto oggettivo tra i valori sperimentalmente misurati necessita di un riferimento comune, standard, in modo da creare una scala di valori referenziata. A questo proposito, i risultati vengono espressi mediante la notazione delta (δ), che rappresenta la differenza relativa tra il rapporto isotopico del campione e quello associato ad uno standard internazionale di riferimento [11]:

$$\delta = [(RIsamp - RIstd)/RIstd] * 1000$$

Semplificata come:

$$\delta = (RIsamp/RIstd - 1) * 1000$$

In tale formulazione, δ esprime lo scostamento del rapporto isotopico del campione rispetto a quello del materiale di riferimento, mentre RI_{samp} e RI_{std} sono, rispettivamente, il rapporto isotopico del campione e dello standard di riferimento. La moltiplicazione per un fattore 1000 consente di esprimere il valore in parti per mille ‰ e permette di esprimere in maniera più conveniente le piccole differenze relative osservate tra i due rapporti. Pertanto, il rapporto tra l'isotopo ^{m}X, più pesante, e l'isotopo ^{n}X, più leggero, viene espresso come $\delta^{m}X$ (‰). Un valore di δ positivo indica che il rapporto tra isotopo pesante e isotopo leggero nel campione è maggiore rispetto a quello della scala di riferimento; il campione risulta quindi relativamente arricchito nell'isotopo pesante. Al contrario, un valore negativo indica un rapporto inferiore rispetto al riferimento e, pertanto, un

relativo impoverimento nell'isotopo pesante. Un valore pari a 0 ‰ indica invece che il rapporto isotopico del campione coincide con quello definito dal riferimento. La **Figura 2.3** esplicita graficamente la modalità di lettura del parametro $\delta\ ^{0}/_{00}$. Lo stesso schema può essere utilizzato per il carbonio.

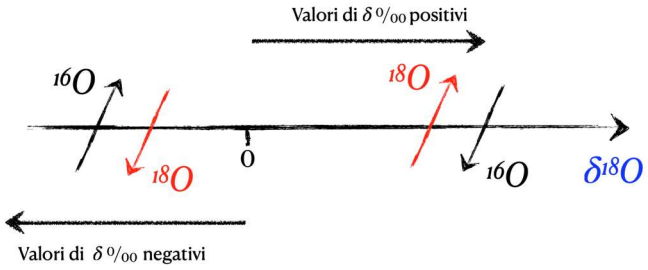


Figura 2.3: andamento del parametro δ ‰ in funzione della variazione della concentrazione degli isotopi considerati.

L'entità dei fenomeni di frazionamento isotopico dipendenti dalla massa è generalmente maggiore per gli elementi leggeri e tende a diminuire all'aumentare della massa relativa degli isotopi coinvolti. Per tale motivo, gli isotopi stabili degli elementi leggeri, quali idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno e zolfo, risultano particolarmente utili nello studio dei processi naturali e nelle applicazioni di tracciabilità. Per gli elementi oggetto del presente lavoro, la composizione isotopica del carbonio viene espressa come $\delta^{13}C$ rispetto alla scala internazionale VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite, $R(^{13}C/^{12}C) = 0.011113 \pm 0.000022$)[https://iupac.org/the-isotopic-composition-of-vpdb/], mentre la composizione isotopica dell'ossigeno dell'acqua viene espressa come $\delta^{18}O$ rispetto alla scala internazionale VSMOW-SLAP (Vienna Standard Mean Ocean Water-Standard Light Antarctic Precipitation, $R(^{18}O/^{16}O) = 0.0020052 \pm 0.0000009$) [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12022467/]. Nella pratica analitica, la riferibilità dei risultati a tali scale viene garantita mediante l'impiego di materiali di riferimento opportunamente caratterizzati e utilizzati per la calibrazione e la normalizzazione delle misure isotopiche.

3. GORGONZOLA DOP

3.1 Agroalimentare Internazionale ed Italiano

Il settore agroalimentare svolge un ruolo di primo piano nell'economia nazionale, per il suo ruolo strategico nello sviluppo economico e nella competitività a livello internazionale. Come settore primario è un punto fermo in un contesto globale in continua evoluzione, immerso in transizioni demografiche, instabilità geopolitica e nuove abitudini d'acquisto dei consumatori. Infatti, il settore lo si può considerare un pilastro dell'economia mondiale: a giustificare questo status è l'alto valore complessivo racchiuso lungo tutta la filiera, che va dalla produzione agricola fino alla vendita dei prodotti finiti. Il valore economico, a livello globale, che ruota attorno a questo settore è stimato in 14.4 trilioni di dollari [14]. Il valore della produzione agricola primaria tocca i 5 mila miliardi di dollari e punta a un incremento del 14% nell'arco del prossimo decennio (entro il 2034). Ancor più rilevante è il comparto Food & Beverage comprensivo di trasformazione, retail e ristorazione che vale oggi 9.4 mila miliardi di dollari ed è proiettato a toccare quota 11.8 mila miliardi entro il 2031, sostenuto da una crescita media annua del 3.75%.

L'alto valore economico si riflette anche sull'impiego totale nel settore, che riguarda il 39% della forza lavoro globale, approssimabile ad un miliardo di persone. L'occupazione non è omogeneamente diffusa ma varia tra i continenti: nei pasi africani arriva al 60% e in Asia al 40%. Sempre sul lato occupazionale, situazioni diverse si osservano nei paesi più avanzati da un punto di vista economico: in Europa l'occupazione raggiunge il 14.2% mentre nelle Americhe è stimata al 22.2% [14].

Riguardo lo scambio commerciale i principali esportatori sono i paesi più sviluppati, tra questi i più rilevanti sono Stati Uniti, Brasile, Paesi Bassi, Germania, Cina, Francia, Canada, Spagna e Italia. I paesi del continente europeo si distinguono per la loro capacità di esportare prodotti alimentari con un alto valore aggiunto. Al contempo, nel ruolo degli importatori, ritroviamo alcune delle potenze mondiali già citate: Stati Uniti, Cina, Unione Europea, Giappone e Regno Unito. Negli ultimi anni il settore ha attraversato una fase di profondo cambiamento. Se l'espansione demografica e la crescita della classe media nelle economie emergenti hanno inciso sulla domanda di cibo, il comparto ha dovuto fare i conti con l'impennata dei costi energetici e delle materie prime, oltre alle crescenti instabilità geopolitiche che hanno bloccato le catene di approvvigionamento.

Di conseguenza, anche i consumatori hanno modificato le loro abitudini e le loro attenzioni, progressivamente si prende sempre di più in considerazione il prezzo dell'alimento con un occhio anche alla sua "qualità".

Da diversi anni i consumatori europei hanno aumentato l'interesse verso prodotti più salubri e funzionali: storia del prodotto unitamente ad una narrazione della filiera produttiva che includa anche il territorio d'origine sono caratteri descrittivi sempre più importanti per la scelta finale. Il concetto di benessere è ormai diventato centrale per i consumatori, spingendo il mercato globale del wellness alimentare oltre quota 1.800 miliardi di dollari. Questo cambio di passo è dato da una domanda sempre più orientata verso soluzioni nutrizionali funzionali, alimenti a base vegetale e prodotti caratterizzati da un minore contenuto di zuccheri, grassi e alcol. In questo scenario, l'agroalimentare si attesta tra i motori trainanti del Made in Italy. Considerando l'intera filiera produttiva dalla fase agricola alla trasformazione, fino a logistica e distribuzione, il settore ha chiuso il 2023 con un fatturato di oltre 660 miliardi di euro e un valore aggiunto pari a 141 miliardi. Un peso economico rilevante che poggia su una rete di 791 mila aziende e impiega più di 3 milioni di persone (di cui 580 mila nel comparto industriale).

La rilevanza del settore agroalimentare e vitivinicolo si rispecchia nella grande selezione di prodotti a denominazione DOP, IGP e STG. L'Italia può vantare il maggior numero di prodotti alimentari con IG, 858, il più alto tra tutti i paesi europei (la Francia, secondo paese per numero di denominazioni registrate, ha un distacco di oltre 100 prodotti). Le esportazioni del comparto hanno evidenziato un andamento particolarmente solido: tra il 2019 e il 2025 sono cresciute a un ritmo medio annuo dell'8.1%, nettamente al di sopra del +5% messo a segno dall'export nazionale complessivo. Questo trend ha portato le vendite internazionali a quota 72.5 miliardi di euro nel 2025, trainate per 62.5 miliardi dall'industria alimentare, bevande e tabacco per i restanti 10 miliardi dai prodotti dell'agricoltura, con un aumento del 5% rispetto all'annata precedente. La crescita è stata sostenuta da diversi comparti, tra cui altri prodotti alimentari (+12.7%), prodotti agricoli (+9.4%), formaggi e latticini (+13.7%), carni (+10.4%) e prodotti da forno e farinacei (+3%). Le vendite di frutta e ortaggi sono rimaste stabili, mentre si è registrata una contrazione per bevande (-2.5%), in particolare il vino (-3.7% a 7.8 miliardi di euro), e per oli e grassi (-8.6%), con un calo rilevante dell'olio di oliva (-20% a 2.5 miliardi).

Analizzando le produzioni delle singole regioni, troviamo l'Emilia-Romagna al primo posto nell'export, con 13,1 miliardi di euro (+8%), seguita a breve distanza da Lombardia (11.8 miliardi, +8%), Veneto (10.5 miliardi, +4.8%) e Piemonte (10.2 miliardi, +8.6%). Si distinguono inoltre per

una crescita a doppia cifra la Sicilia, che raggiunge 1.9 miliardi (+11%), e il Friuli-Venezia Giulia, a quota 1.8 miliardi (+11.6%).

Per quanto riguarda il formaggio Gorgonzola DOP, il suo impatto in termini di dati economici è di rilievo. Infatti, sulla base dei dati macroeconomici riportati nell'ultimo rapporto ISMEA-QUALIVITA 2025 relativo alle produzioni agroalimentari DOP, IGP ed STG, il formaggio Gorgonzola è al 5^0 posto della classifica globale dei prodotti alimentari DOP e al 4^0 di quella dei formaggi dopo Grana Padano, Parmigiano Reggiano e della Mozzarella di Bufala Campana. Il valore economico alla produzione è stimato in 460 milioni di euro mentre al consumo la cifra è quasi raddoppiata.

Nel primo semestre di quest'anno la produzione di Gorgonzola DOP è stata di 2.581.021 forme, rimanendo stabile (+0.40%) rispetto al primo semestre 2025. Nel mese di giugno gli aumenti hanno riguardato sia le province di produzione lombarde (+2.17%) che quelle piemontesi (+5.26%) [15]. Anche le esportazioni registrate nel primo trimestre 2026 rimangono stabili (+0.1%). Le vendite estere di Gorgonzola DOP si sono attestate a 6.350 tonnellate, la maggior parte delle quali (5.508 tonnellate) dirette al mercato europeo. Tra i paesi di destinazione del prodotto è confermato il primato della Francia, che ha importato 121.228 forme (+1.1%), a fronte della flessione della Germania (109.394 forme; -11,5% sul primo trimestre 2025) che consolida comunque la seconda posizione. Tra i Paesi comunitari si segnalano gli eccellenti risultati di Polonia (+13%), Lussemburgo (+14.4%), Austria (+25.3%) e Paesi Bassi (+26%). In ambito extra-UE, la leadership spetta al Giappone (prossimo alle 10 mila forme; +16.4%), davanti al Regno Unito che segna un recupero pari al +4.2% (8.610 forme). *(Dati Clal)*

È innegabile come il "Gorgonzola" sia uno dei simboli più importanti del "Made in Italy", ciò giustificato dal giro economico che vi è intorno e i numerosi paesi nel quale è esportato (91).

3.2 La filiera produttiva del Gorgonzola “DOP”

Tra i prodotti della trasformazione del latte, il Gorgonzola DOP è il formaggio che da qualche anno ha meglio performato nelle indagini condotte dall’agenzia ISMEA-Qualivita. Da un punto di vista produttivo, il Gorgonzola rappresenta uno dei formaggi più complessi da realizzare, a causa delle difficoltà nel monitorare e controllare le trasformazioni chimiche e biochimiche che avvengono durante il passaggio dal latte alla pasta semidura, e successivamente al formaggio erborinato stagionato, nelle sue varianti dolce (cremosa) e piccante. Tale complessità è determinata dall’azione simultanea o sequenziale di enzimi, fermenti-batteri e muffe, i quali agiscono in sinergia o in fasi successive per trasformare le diverse componenti chimiche del latte, principalmente la frazione proteica e gli zuccheri, nel formaggio erborinato a pasta cremosa o semidura, tanto apprezzato in tutto il mondo per le sue caratteristiche sensoriali uniche. La filiera produttiva è descritta all’interno del Disciplinare della denominazione di Origine Protetta “Gorgonzola”: in questo documento sono riportate tutte le specifiche riguardo la zona di produzione, gli ingredienti, il metodo di ottenimento, la dieta degli animali e le regole per l’impacchettamento e l’etichettatura del prodotto finito. Il Gorgonzola è aggiunto alla lista dei prodotti D.O.P a far data dal 12 Giugno 1996 e contestualmente riconosciuto e registrato dall’Unione Europea con il regolamento CE n°1107/96. Successivamente, con il Decreto del 24 aprile 2002, il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali ha ufficialmente affidato al Consorzio per la tutela l'incarico di formulare proposte per la disciplina di produzione e per il miglioramento qualitativo della stessa, con particolare attenzione ai requisiti di sicurezza alimentare. Inoltre, il Consorzio ricopre anche la funzione di ente collaboratore del Ministero nelle attività di vigilanza e tutela della denominazione protetta contro abusi, atti di concorrenza sleale, contraffazioni e utilizzi impropri della denominazione registrata. Il nome “Gorgonzola” gode di una solida protezione legale ai sensi dell’art. 13, comma 1, lett. *b)* del Regolamento (CE) n. 510/2006. Questa normativa preserva la denominazione registrata da qualsiasi tentativo di evocazione, imitazione o usurpazione, vietandone l'uso improprio anche quando l'effettiva provenienza del prodotto è dichiarata, oppure quando il nome è tradotto o affiancato da espressioni quali “stile”, “tipo”, “alla maniera di” o simili [16]. Con il passare degli anni il disciplinare è stato rivisto e modificato, ad oggi il testo a cui si fa riferimento è pubblicato sulle gazzette ufficiali dell’Unione Europea e della Repubblica Italiana, rispettivamente con le normative n L.244/1 del 22/09/2017 e n L.244 18/10/2017 [17]. Tale disciplinare definisce un insieme stringente di prescrizioni che regolamentano non soltanto le caratteristiche organolettiche e chimico-fisiche del prodotto finale,

ma anche la selezione delle materie prime e i processi di trasformazione consentiti per l'impiego della denominazione "Gorgonzola".

Nel dettaglio il disciplinare fornisce quelle che devono essere le zone di produzione (Art. 2), il metodo di ottenimento (Art.4), il legame con l'ambiente geografico (Art.5), gli elementi che ne comprovano l'origine (Art.6) e l'etichettatura (Art.7). Non di minore importanza sono le caratteristiche che deve presentare il prodotto, riportate nell'Art.3 e riassunte nella **Tabella 3.1.**

Tabella 3.1: Riassunto delle caratteristiche e dei limiti legislativi imposti dal consorzio per la tutela del formaggio "Gorgonzola" D.O.P.

Ambito	Parametro	Specifiche del disciplinare
Caratteristiche	Forma/Scalzo	Forma cilindrica con facce piane, scalzo (≥ 13 cm)
	Dimensioni forma	Diametro compreso fra 20 cm e 32 cm
	Crosta	Di colore grigio e/o rosato, non edibile
	Pasta	Unita, di colore bianco o paglierino, con la tipica erborinatura (venature blu-verdastre e/o grigio-azzurre)
	Parte grassa	≥ 48% sulla sostanza secca
Tipologie in commercio	Forma Dolce	• Peso: 9.0 kg – 13.5 kg • Sapore: Dolce • Stagionatura: 50 – 150 giorni
	Forma Piccante	• Peso: 9.0 kg – 13.5 kg • Sapore: Decisamente piccante • Stagionatura: 80 – 270 giorni
	Forma Piccola piccante	• Peso: 5.5 kg – 8.9 kg • Sapore: Decisamente piccante • Stagionatura: 60 – 200 giorni

3.3 Zona di produzione

Secondo il disciplinare, il formaggio Gorgonzola DOP deve essere lavorato e stagionato nelle province di: Bergamo, Biella, Brescia, Como, Cremona, Cuneo, Lecco, Lodi, Milano, Monza, Novara, Pavia, Varese, Verbano-Cusio-Ossola, Vercelli, nonché i seguenti comuni appartenenti alla provincia di Alessandria: Casale Monferrato, Villanova Monferrato, Balzola, Morano Po, Coniolo, Pontestura, Serralunga di Crea, Cereseto, Treville, Ozzano Monferrato, San Giorgio Monferrato, Sala Monferrato, Cellamonte, Rosignano Monferrato, Terruggia, Ottiglio, Frassinello Monferrato, Olivola, Vignale, Camagna, Conzano, Occimiano, Mirabello Monferrato, Giarole, Valenza, Pomaro Monferrato, Bozzole, Valmacca, Ticineto, Borgo San Martino e Frassineto Po [17]. Una visione d'insieme del territorio di produzione è riportata in **Figura 3.1.**

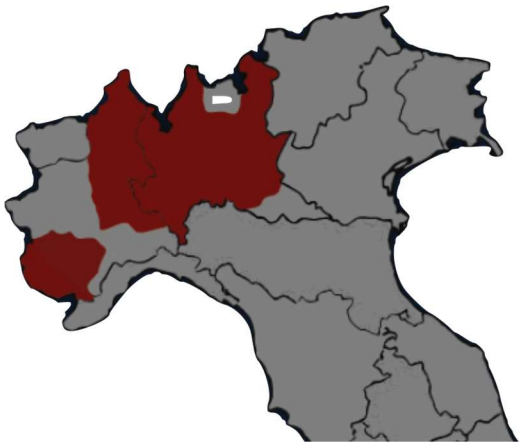


Figura 3.1: In marrone è evidenziata la zona di produzione del formaggio Gorgonzola DOP.

3.4 Il metodo produttivo

La condizione necessaria affinché si possa parlare di filiera DOP nella produzione del Gorgonzola è che gli allevamenti delle bovine che producono il latte destinato alla trasformazione in formaggio siano ubicati nella zona di origine prevista dal disciplinare. Inoltre, anche l'alimentazione degli animali deve seguire le indicazioni contenute nel disciplinare e, nello specifico, la sostanza secca degli alimenti per le bovine, su base annuale, deve provenire per almeno il 50% dalla zona di produzione. Stabiliti questi due requisiti, la denominazione DOP prevede, inoltre, che tutte le fasi successive della lavorazione del latte e di trasformazione in formaggio, sino al confezionamento, avvengano obbligatoriamente all'interno dell'area stabilita dal disciplinare.

Riassumendo:

1. Il latte di vacca intero proveniente dalla zona di produzione viene pastorizzato, sono aggiunti fermenti lattici e una sospensione di spore di *Penicillium* e lieviti selezionati, addizionati con caglio di vitello ad una temperatura compresa nell'intervallo 28°C – 36°C;
2. Si forma la cagliata, che viene tagliata e successivamente posta negli appositi stampi per lo spurgo del siero. Le forme così ottenute, dopo qualche giorno, sono sottoposte a salatura a secco continua. Questa fase è condotta in celle frigorifere ad una temperatura compresa tra i 18°C e 24°C;
3. La fase successiva è la foratura: dopo circa 3 settimane di riposo in celle fredde, la forma è forata con lunghi aghi metallici. Mediante questa operazione è inoculato il *Penicillium Roqueforti*, un fungo appartenete alla famiglia *Aspergillaceae* che accresce la tipica venatura verde-blu del prodotto. La foratura favorisce anche l'azione dell'ossigeno nella parte interna della pasta;
4. Infine, la stagionatura, che può variare in base ai tipi di forma, avviene in ambienti con temperature controllate fra -1°C e 7°C e con umidità relativa nell'intervallo 85% - 100%.

L'immissione in commercio del Gorgonzola DOP può avvenire sotto forma di forme intere, mezze forme tagliate orizzontalmente oppure in singole porzioni, purché tutte siano preventivamente certificate dall'organismo di controllo autorizzato e avvolte nel caratteristico foglio di alluminio goffrato. Quest'ultimo, oltre ad adempiere a specifiche prescrizioni tecniche, reca il marchio distintivo della denominazione che ne attesta la tracciabilità e l'origine. Il disciplinare regola, inoltre, la vendita in frazioni preconfezionate, per le quali non è obbligatoria la presenza del foglio

di alluminio, a patto che derivino da forme o frazioni la cui origine sia stata regolarmente certificata e che le operazioni siano approvate dall'organismo di controllo o da un ente da esso delegato. Per quanto riguarda la vendita al dettaglio diretto, sono consentite due principali modalità di porzionamento: il taglio su richiesta contestuale del consumatore e il confezionamento in loco destinato alla vendita diretta. In entrambi i casi, per garantire l'autenticità e la riconoscibilità del prodotto, è fatto obbligo di mantenere visibile o parzialmente presente sulla porzione il foglio d'alluminio goffrato originale [17].

3.4.1 Il legame con il territorio

I prodotti a denominazione sono motore di sviluppo dell'economia rurale dei territori coinvolti con le produzioni agricole sia in termini assoluti che di sviluppo sostenibile consentendo una maggior redditività. Per i prodotti di "maggior qualità", l'incremento di prezzo è connesso, oltre al valore intrinseco dell'alimento (determinato dai costi delle materie prime, costi di produzione, ecc.), anche dal "valore simbolico" acquisito dall'alimento e dalle sinergie derivate dai territori di produzione.

Il legame indissolubile con il territorio di origine del Gorgonzola DOP si articola attraverso la combinazione di fattori sia naturali che umani. Da un lato, le peculiari condizioni pedoclimatiche dell'area delimitata dal disciplinare favoriscono la produzione di foraggi d'alta qualità per l'alimentazione delle bovine da latte e stimolano lo sviluppo del corredo microbiologico autoctono. Dall'altro, i fattori umani si esprimono nella secolare e complessa tradizione casearia locale. Fasi cruciali quali l'inoculo del latte con fermenti, lieviti selezionati e, da ultimo le spore di *Penicillium*, l'addizione del caglio di vitello a temperatura controllata, la salatura a secco e la caratteristica foratura delle forme durante la maturazione rappresentano un sapere artigianale tramandato nel tempo. È proprio la sinergia tra l'eccellenza della matrice foraggera e la maestria di queste pratiche di trasformazione a conferire al formaggio le sue distintive proprietà organolettiche e la tipica erborinatura.

3.5 Origine ed etichettatura

Secondo il disciplinare, ogni parte del processo produttivo deve essere accuratamente monitorata avendo cura di documentare per ogni passaggio le masse di prodotti in entrata ed uscita. Questa modalità operativa, estesa a tutte le parti coinvolte, allevatori, caseifici, centri di stagionatura, laboratori di porzionamento e confezione garantisce la possibilità di controllo della filiera da monte a valle e viceversa. Il piano dei controlli, sia periodici che a campione, sono regolamentati dall'ente di controllo autorizzato dal Ministero in collaborazione con il Consorzio di Tutela.

Tutti i soggetti, siano essi persone fisiche o giuridiche, inseriti negli appositi elenchi della filiera, sono sottoposti alle verifiche da parte dell'organismo di controllo autorizzato, in conformità a quanto stabilito dal disciplinare di produzione e dal pertinente piano di controllo.

Per riconoscere e distinguere il vero formaggio DOP Gorgonzola sono disposti due specifici marchi da apporsi nella zona di produzione e di stagionatura, al fine di consentire all'organismo di controllo autorizzato di verificare, prima di apporre i contrassegni, che il prodotto possieda le caratteristiche organolettiche e qualitative descritte nel presente disciplinare di produzione [17].

I marchi da apporre sul prodotto autorizzati sono due:

1. All'origine (**Figura 3.2**) posto su entrambe le facce piane, contenente il numero di identificazione del caseificio, ottenuto applicando le matrici distribuite dal consorzio di Tutela, incaricato dal ministero delle politiche agricole alimentari e forestali;

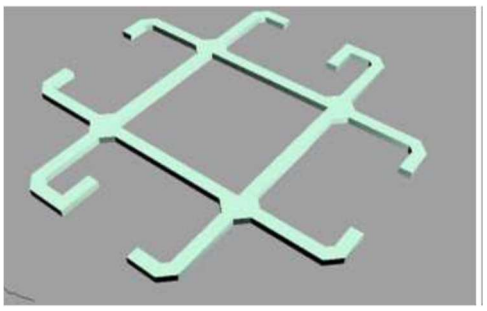


Figura 3.2: Marchio assegnato all'origine, contenente i numeri di identificazione del caseificio.

2. All'immissione sul mercato, a seguito del raggiungimento dei requisiti previsti per la commercializzazione del prodotto, il formaggio viene avvolto nel caratteristico foglio di

alluminio goffrato (**Figura 3.3**). Tale confezionamento riguarda sia le forme intere sia le mezze forme con taglio orizzontale, garantendo la visibilità del marchio d'origine recante il numero identificativo del caseificio sulla faccia piana e riportando sul resto dell'alluminio il marchio, a tutela dell'autenticità e della tracciabilità del prodotto in conformità a quanto pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale* n. 127 del 15 maggio 1975. Sul foglio di alluminio figurano la Denominazione di Origine Protetta "Gorgonzola", il relativo simbolo comunitario DOP e, laddove pertinente, l'indicazione "piccante" per le forme più stagionate, piccole piccanti e i loro derivati.

Figura 3.3: Logo del consorzio per la tutela del formaggio Gorgonzola DOP.

Prima del rilascio in commercio, il formaggio preconfezionato in frazioni deve recare, nel campo visivo principale, le seguenti etichette:

- La denominazione di origine protetta "Gorgonzola" accompagnata dal simbolo dell'Unione della DOP;
- La dicitura 'piccante', per il prodotto ottenuto dalla forma 'piccante' e 'piccola piccante' di formaggio che beneficia della DOP 'Gorgonzola', da riportare accanto o al di sotto della Denominazione di Origine Protetta 'Gorgonzola', utilizzando caratteri grafici di dimensioni inferiori a quelli utilizzati per quest'ultima.

In base alla tipologia di Gorgonzola vanno rispettati gli appositi criteri di etichettatura.

3.6 Costituenti nutrizionali del Gorgonzola

La composizione chimica del Gorgonzola presenta quantità elevate di macronutrienti quali grassi e proteine ed è caratterizzata dall'assenza di carboidrati in quantità apprezzabili. È una matrice ricca di nutrienti, oltre alla componente acquosa presenta [18]:

1. **Grassi (Lipidi):** la frazione maggiore è composta da acidi grassi saturi, dove il più presente è l'acido palmitico (C16), il secondo acido grasso più presente è l'acido oleico (C18);
2. **Proteine:** nella frazione proteica troviamo numerosi amminoacidi, tra cui i più presenti, acido glutammico, acido aspartico, prolina, leucina, lisina;
3. **Sali minerali e vitamine:** sodio, calcio, fosforo e potassio sono gli elementi più abbondanti. Il formaggio è caratterizzato da una elevata concentrazione di vitamine quali: vitamina A, vitamina E, vitamina B2, B6, B12, Niacina e Riboflavina.
4. **Chetoni e composti volatili:** prodotti dall'azione delle muffe Penicillium Roqueforti sui grassi, responsabili del tipico profumo e sapore del formaggio [16].
5. **Metaboliti secondari della muffa** [19]:

- **Roquefortina C**: Alcaloide neuroattivo presente in concentrazioni molto basse e non pericolose.
- **Acido micofenolico**: Metabolita con proprietà inibitorie, sicuro alle dosi assunte con il formaggio.
- **Andrastina A**: Sostanza inattiva dal punto di vista tossicologico nel prodotto finito.
- **Tossina PR**: Instabile nel formaggio, viene rapidamente convertita in composti non nocivi come la PRina.

In **Tabella 3.2** sono riportati i valori nutrizionali del formaggio Gorgonzola DOP per 100g di prodotto [16]:

Tabella 3.2: valori nutrizionali del formaggio Gorgonzola DOP.

Energia	1299 KJ / 314Kcal
Grassi di cui: Acidi grassi saturi Acidi grassi monoinsaturi Acidi grassi polisaturi	27 g 19 g 6.1 g 0.7 g
Carboidrati di cui Zuccheri	0 g 0 g
Proteine	18 g
Sale	1.6 g
Calcio	530 mg – 66 %
Fosforo	280 mg – 40 %

4. CAMPIONAMENTO

I campioni di latte e di formaggio fresco destinati alla produzione di Gorgonzola D.O.P. sono stati gentilmente forniti da Alce S.r.l. Il campionamento ha interessato la filiera produttiva di un unico caseificio, azienda Angelo Baruffaldi, Castellazzo Novarese (NO). L'azienda raccoglie il latte proveniente da una decina di allevamenti selezionati nelle province di Novara e Milano.

Il numero di campioni raccolti per la realizzazione di questa indagine preliminare ammonta a:

- 51 campioni di latte destinati alla produzione di Gorgonzola DOP;
- 51 campioni di formaggio fresco ottenuti dai corrispondenti lotti di latte.

A ciascun campione di latte è stato associato il corrispondente campione di formaggio fresco ottenuto dalla relativa produzione, consentendo così di mantenere una tracciabilità tra materia prima e prodotto nelle diverse sessioni operative. Il campionamento è stato realizzato nel periodo compreso tra settembre 2025 e giugno 2026 e articolato in due campagne principali: la prima da settembre a dicembre 2025 e la seconda da marzo a giugno 2026. Nel corso di ciascuna campagna sono stati effettuati prelievi con cadenza settimanale, per un totale di 25 campioni di latte e 25 campioni di formaggio fresco, nella prima campagna, e 26 campioni di latte e 26 campioni di formaggio fresco nella seconda. Per ciascun campione di latte è stata prelevata un'aliquota di 100 mL direttamente dalle confezioni fornite dal produttore. Tutti i campioni sono stati conservati ad una temperatura di -20 °C fino al momento di esecuzione delle diverse prove analitiche. La scelta di congelare i campioni è stata un vincolo imprescindibile a causa dei vincoli tra il prelievo dei campioni e la loro consegna presso il laboratorio.

A partire dal lotto di produzione associato al campione di latte prelevato il 31 marzo 2026, è stata inoltre monitorata l'evoluzione del Gorgonzola DOP durante la sua stagionatura. A tale scopo sono stati raccolti 10 campioni rappresentativi di differenti stadi di maturazione. Anche questi campioni sono stati forniti direttamente dal produttore e conservati a -20 °C fino al momento delle analisi.

4.1. Campioni di latte

I campioni di latte analizzati provengono da allevamenti situati nelle province di Novara e Milano. La **Figura 4.1** mostra la distribuzione geografica degli allevamenti dai quali sono stati raccolti i campioni inclusi nello studio.

La **Tabella 4.1** riporta la distribuzione dei campioni di latte relativi ai due campionamenti nel periodo dell'indagine.

Tabella 4.1: Distribuzione dei campioni di latte nelle differenti serie e nei relativi periodi di campionamento.

N° BOX	N° Campioni di Latte	Periodo
1	12	Settembre/Ottobre/Novembre
2	13	Novembre/Dicembre
3	12	Marzo/Aprile/Maggio
4	14	Maggio/Giugno

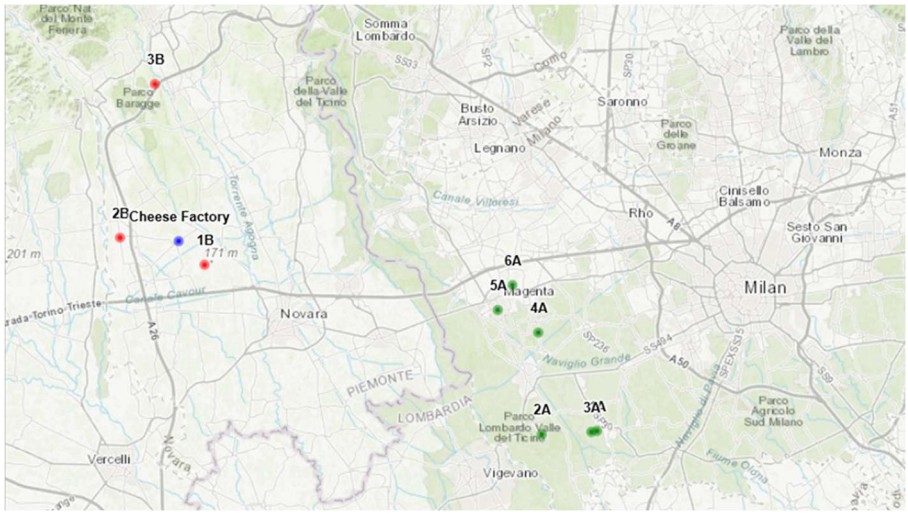


Figura 4.1: Mappa della Provincia di Novara e Milano e relative indicazioni riguardanti la posizione geografica dei campioni di latte analizzati durante il lavoro di tesi.

5. TECNICHE ANALITICHE

La caratterizzazione analitica più estesa è stata condotta sui campioni di latte. Sui campioni di formaggio fresco e di Gorgonzola DOP a differenti stadi di maturazione è stata invece effettuata la caratterizzazione della frazione volatile mediante HS-SPME-GC/MS. L'estensione delle ulteriori analisi ai campioni di formaggio potrà costituire l'oggetto di studi successivi, con l'obiettivo di approfondire la caratterizzazione dell'intera filiera produttiva.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è la caratterizzazione di prodotti lattiero-caseari appartenenti alla filiera del Gorgonzola DOP, con particolare attenzione ai campioni di latte destinati alla trasformazione. A tale scopo è stato adottato un approccio multiparametrico, basato sia sulla determinazione di parametri chimici e chimico-fisici di caratterizzazione generale, sia sull'analisi della composizione isotopica del carbonio e dell'ossigeno. Questi ultimi parametri sono stati studiati al fine di valutarne il potenziale impiego nella caratterizzazione delle materie prime e nella tracciabilità della filiera. Le attività analitiche sono state svolte nel periodo compreso tra gennaio e settembre 2026. La caratterizzazione dei campioni di latte ha previsto la determinazione dell'indice di rifrazione, del pH, della densità, del contenuto di lattosio mediante polarimetria e della composizione elementare.

Successivamente sono state effettuate le determinazioni isotopiche relative alla misura del rapporto $^{18}O/^{16}O$ e la massa a punto del metodo per il rapporto $^{13}C/^{12}C$ per i principali amminoacidi presenti nel latte.

5.1 Determinazione dell'indice di rifrazione

L'indice di rifrazione (n) di un mezzo è definito come il rapporto tra la velocità della luce nel vuoto (c) e la velocità di propagazione della luce nel mezzo considerato (v) (**Eq. 5.1**):

$$n = \frac{c}{v} \qquad \textbf{(Eq. 5.1)}$$

L'indice di rifrazione è una grandezza adimensionale e dipende, oltre che dalla natura e dalla composizione del campione, dalla temperatura e dalla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata. Per ottenere risultati confrontabili, tali condizioni devono pertanto essere opportunamente controllate [20].

La rifrazione della luce all'interfaccia tra due mezzi caratterizzati da differenti indici di rifrazione è descritta dalla legge di Snell (**Eq. 5.2**):

$$n_1 \cdot \sin\alpha = n_2 \cdot \sin\beta \qquad \textbf{(Eq. 5.2)}$$

Dove n_1 e n_2 rappresentano gli indici di rifrazione dei due mezzi, mentre α e β sono rispettivamente l'angolo di incidenza e l'angolo di rifrazione, misurati rispetto alla normale alla superficie di separazione.

Nei rifrattometri digitali, la determinazione dell'indice di rifrazione è generalmente basata sulla misura dell'angolo critico-limite associato al fenomeno della riflessione interna totale all'interfaccia tra il prisma dello strumento e il campione. Il sistema ottico rileva la posizione della transizione tra la regione illuminata e quella oscura e, sulla base dell'angolo critico misurato e dell'indice di rifrazione noto del prisma, determina l'indice di rifrazione del campione.

Le determinazioni sono state effettuate alla temperatura di 20.00 ± 0.05 °C.

5.2 Determinazione del pH

La determinazione è stata effettata mediante un pHmetro dotato di elettrodo a vetro. Il principio di misura si basa sulla differenza di potenziale che si instaura attraverso la membrana di vetro dell'elettrodo e che dipende dall'attività degli ioni idrogeno nel campione.

Prima delle analisi, il sistema è stato calibrato utilizzando soluzioni tampone certificate a pH 4.00 e 7.00. Successivamente, l'elettrodo è stato immerso direttamente nel campione e il valore di pH è stato registrato dopo la stabilizzazione del segnale.

5.3 Polarimetria

La polarimetria è una tecnica analitica basata sulla capacità delle sostanze otticamente attive di ruotare il piano di polarizzazione della luce linearmente polarizzata. Il lattosio, essendo una molecola chirale, presenta attività ottica e può pertanto essere determinato mediante misura della rotazione ottica di una soluzione opportunamente preparata. In un polarimetro, la radiazione emessa dalla sorgente viene polarizzata e fatta attraversare una cella contenente il campione. La

presenza di specie otticamente attive determina una rotazione del piano di polarizzazione di un angolo α, la cui entità dipende dalla natura dell'analita, dalla sua concentrazione, dalla lunghezza del cammino ottico, dalla temperatura e dalla lunghezza d'onda della radiazione impiegata.

Il potere rotatorio specifico è definito dalla relazione:

$$[\alpha]_{\lambda}^{T} = \frac{\alpha}{C \cdot L} \qquad \textbf{(Eq. 5.3)}$$

Dove $[\alpha]_{\lambda}^{T}$ rappresenta il potere rotatorio specifico alla temperatura T e alla lunghezza d'onda λ, α è la rotazione osservata espressa in gradi, L è la lunghezza del tubo polarimetrico espressa in decimetri e C è la concentrazione della specie otticamente attiva espressa in g mL^{-1}. La determinazione è stata effettuata alla temperatura di 20.00 ± 0.05 °C e alla lunghezza d'onda di 589 nm, previa misura del bianco. La concentrazione di lattosio è stata quindi ricavata a partire dalla rotazione ottica osservata, utilizzando il valore del potere rotatorio specifico adottato nelle condizioni sperimentali.

5.4. Determinazione della densità

La densità dei campioni è stata determinata mediante metodo gravimetrico, confrontando la massa di un volume noto di campione con quella dello stesso volume di acqua ultra pura Milli Q, mantenendo costante la temperatura a 25.00 ± 0.05 °C.

5.5. Headspace Solid Phase Micro Extraction abbinata a Gas cromatografia-Spettrometria di massa, HS-SPME GC/MS

La microestrazione in fase solida (SPME, Solid Phase Micro Extraction) è una tecnica estremamente versatile di preparazione del campione, campionamento, ed introduzione dello stesso all'interno di un sistema di iniezione, introdotta all'inizio degli anni Novanta dal gruppo di ricerca del prof. Janusz Pawliszyn presso l'Università di Waterloo (Ontario, Canada). La tecnica consente di integrare diverse procedure quali: ***i)*** la fase di estrazione e pre-concentrazione di analiti

e, ***ii)*** nel caso dell'accoppiamento con la gascromatografia, la loro successiva introduzione diretta nel sistema strumentale. Il dispositivo SPME è costituito da un supporto, generalmente in silice fusa o materiale metallico, rivestito da una fase estraente opportunamente selezionata in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche degli analiti di interesse. Il rivestimento può essere costituito da materiali polimerici non porosi, nei quali prevalgono fenomeni di assorbimento, oppure da materiali porosi o compositi, nei quali il processo di estrazione può coinvolgere prevalentemente fenomeni di adsorbimento superficiale. Una delle principali caratteristiche della SPME è il ridotto o nullo impiego di solventi organici durante la fase estrattiva. Rispetto alle tradizionali tecniche di estrazione con solvente, l'SPME permette, inoltre, di ridurre il numero di fasi di preparazione del campione e può essere facilmente automatizzata, risultando particolarmente adatta per eseguire prove su un elevato numero di campioni [21].

La SPME può essere utilizzata secondo differenti modalità. Nell'estrazione diretta (DI-SPME, Direct Immersion SPME) la fibra viene immersa direttamente nella matrice liquida, mentre nella modalità spazio di testa (HS-SPME, Headspace SPME) la fibra viene esposta alla fase gassosa in equilibrio con un campione liquido o solido. Quest'ultima configurazione è particolarmente adatta allo studio dei composti volatili e semivolatili e presenta il vantaggio di ridurre il contatto diretto tra il rivestimento della fibra e i componenti non volatili della matrice. Durante l'estrazione, gli analiti vengono trasferiti dalla matrice alla fase estraente attraverso processi di trasferimento di massa e di ripartizione. Al termine del tempo di estrazione prestabilito, la fibra viene ritratta all'interno dell'ago di protezione e trasferita nell'iniettore del gascromatografo, dove le diverse specie chimiche sono desorbite termicamente e introdotte nella colonna cromatografica per la successiva separazione e rilevazione.

Nel caso della HS-SPME applicata a un campione liquido, il sistema può essere descritto considerando tre fasi: il campione in fase liquida, lo spazio di testa e il rivestimento della fibra. Il bilancio di massa relativo ad una specie generica può essere espresso come:

$$C_0 V_s = C_f^{\infty} V_f + C_h^{\infty} V_h + C_s^{\infty} V_s \qquad \textbf{(Eq. 5.4)}$$

Dove C_o è la concentrazione iniziale dell'analita, mentre C^{∞}_s, C^{∞}_h e C^{∞}_f indicano rispettivamente le concentrazioni dell'analita nel campione, nello spazio di testa e nel rivestimento della fibra in condizioni di equilibrio. V_s, V_h e V_f rappresentano i relativi volumi delle tre fasi.

La trattazione matematica del principio di funzionamento della tecnica può subire manipolazioni e approssimazioni che rendono le equazioni più pratiche e di comprensione più semplice. Ciò non

toglie che la teoria alla base rimanga complessa e presenti ulteriori complicazioni quando la fibra presenta più fasi, come nelle fibre composite [22] [23]. L'utilizzo per scopi quantitativi è tutt'altro che semplice in virtù delle difficoltà riconducibili al principio di funzionamento e all'individuazione di un meccanismo unico, assorbimento o adsorbimento, di operatività. La tecnica si presta, infatti, ad un uso per scopi qualitativi, consentendo il monitoraggio in tutte le modalità, on-line, at-line e off-line. La quantità di analita estratta dalla fibra dipende, infatti, non soltanto dalla concentrazione iniziale nel campione, ma anche dai coefficienti di distribuzione e dai volumi relativi delle diverse fasi. La prestazione della tecnica è fortemente influenzata dalle caratteristiche chimico-fisiche degli analiti e della matrice, nonché dalle condizioni operative. La scelta del rivestimento, la temperatura e il tempo di estrazione, l'agitazione, il volume del campione e dello spazio di testa, il pH e la forza ionica rappresentano alcuni dei principali parametri che possono modificare l'efficienza estrattiva nonché la specificità e la selettività del dispositivo. La loro ottimizzazione e il rigoroso controllo delle condizioni sperimentali sono pertanto fondamentali per garantire ripetibilità e riproducibilità del metodo.

Grazie alla possibilità di estrarre e preconcentrare direttamente i composti presenti, la tecnica HS-SPME trova ampia applicazione nella caratterizzazione della frazione volatile di matrici alimentari complesse, tra cui latte e prodotti lattiero-caseari. La **Figura 5.1** rappresenta il processo di campionamento attraverso tecnica HS-SPME e schematizza la modalità di utilizzo del dispositivo durante il campionamento dello spazio di testa di un campione in fase liquida.

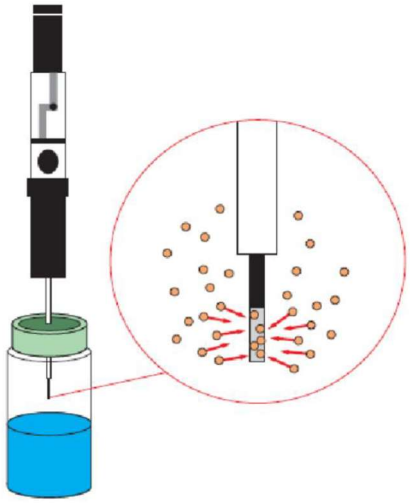


Figura 5.1: Rappresentazione schematica del processo di estrazione mediante tecnica HS-SPME.

5.5.1. Principio di funzionamento

Nel caso di un campione liquido analizzato mediante HS-SPME, il trasferimento degli analiti dalla matrice alla fibra avviene attraverso due principali processi di distribuzione: tra il campione e lo spazio di testa e, successivamente, tra lo spazio di testa e il rivestimento della fibra. La distribuzione tra fase liquida e spazio di testa dipende dalla volatilità dell'analita e dalla sua affinità relativa per le due fasi. I composti maggiormente volatili tendono generalmente a essere presenti in proporzione maggiore nella fase gassosa, mentre le specie caratterizzate da minore volatilità o da maggiore affinità per la matrice rimangono prevalentemente nella fase condensata. In sistemi reali e complessi, come le matrici alimentari, tale distribuzione dipende non soltanto dalla pressione di vapore del composto puro, ma anche dalle interazioni tra l'analita e gli altri componenti presenti in matrice.

Successivamente, gli analiti presenti nello spazio di testa interagiscono con il rivestimento della fibra SPME. Il meccanismo di campionamento dipende dalla natura del materiale utilizzato. Nei rivestimenti polimerici liquidi, come il polidimetilsilossano (PDMS), prevale un meccanismo di assorbimento e gli analiti si distribuiscono nell'intero volume della fase estraente. Nei rivestimenti contenenti materiali porosi, come divinilbenzene (DVB) o Carboxen (CAR), prevalgono invece fenomeni di adsorbimento sulle superfici e all'interno dei pori del materiale.

La selettività della fibra deriva quindi dall'insieme delle interazioni tra analita e rivestimento. Tra le principali interazioni ricordiamo: le forze di dispersione, le interazioni dipolo-dipolo e, quando compatibili con la fase estraente, la formazione di legami a idrogeno, oltre alle caratteristiche dimensionali e alla porosità dei materiali adsorbenti.

Al termine dell'estrazione, la fibra viene trasferita nell'iniettore del gascromatografo, dove l'aumento della temperatura e il flusso del gas di trasporto favoriscono il desorbimento degli analiti dal rivestimento e il loro trasferimento alla colonna cromatografica.

5.5.2. Chimica delle fibre SPME

La selettività e l'efficienza estrattiva della tecnica SPME dipendono in larga misura dalla natura chimica e dalle caratteristiche strutturali del rivestimento della fibra. I materiali impiegati possono

presentare comportamento prevalentemente assorbente, adsorbente oppure combinare entrambi i meccanismi. Tra i principali rivestimenti utilizzati nelle applicazioni SPME rientrano:

- PDMS – polidimetilsilossano,
- PA – poliacrilato,
- PDMS/DVB – polidimetilsilossano / divinilbenzene,
- PEG – polietilenglicole,
- CW/TPR – carbowax / resina stampata,
- CAR/PDMS – carboxen / polidimetilsilossano,
- DVB/CAR/PDMS – divinilbenzene / carboxen / polidimetilsilossano,
- C18 – silice funzionalizzata con catene alchiliche C18.

La scelta della fase estraente viene effettuata sulla base delle proprietà chimico-fisiche degli analiti di interesse, quali polarità, volatilità, massa molecolare e dimensioni, oltre che delle caratteristiche della matrice. In termini generali, una maggiore affinità tra analita e rivestimento favorisce il trasferimento della specie dalla matrice alla fase estraente e, conseguentemente, ne aumenta l'efficienza di estrazione.

I rivestimenti costituiti da polimeri non porosi, come il PDMS, operano prevalentemente mediante un meccanismo di assorbimento/ripartizione, nel quale gli analiti si suddividono all'interno del volume della fase polimerica. I materiali porosi, come DVB e CAR, agiscono invece principalmente attraverso fenomeni di adsorbimento sulla superficie e all'interno dei pori. In questi ultimi casi, la dimensione e la distribuzione dei pori contribuiscono in modo significativo alla selettività verso molecole caratterizzate da differenti dimensioni e volatilità.

Le fibre costituite da più materiali, come PDMS/DVB, CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS, combinando differenti meccanismi di estrazione consentono di ampliare l'intervallo di composti estraibili. In particolare, rivestimenti multicomponente possono risultare vantaggiosi nella caratterizzazione del profilo volatile di matrici complesse, nelle quali coesistono specie appartenenti a diverse classi chimiche e caratterizzate da un ampio intervallo di volatilità.

La scelta della fibra rappresenta pertanto una fase fondamentale nello sviluppo di un metodo HS-SPME. Sebbene alcuni rivestimenti ad ampio spettro consentano l'estrazione simultanea di numerose classi di composti, la tecnica non può essere considerata intrinsecamente non selettiva: la natura chimica, la porosità e lo spessore del rivestimento determinano infatti una selettività specifica nei confronti degli analiti. Un'appropriata selezione della fase estraente permette quindi di modulare il profilo dei composti estratti in funzione degli obiettivi analitici [23].

5.6. Determinazione del contenuto elementare

L'analisi elementare consente la determinazione quantitativa del contenuto di carbonio (C), idrogeno (H), azoto (N) e zolfo (S) in un'ampia varietà di matrici. Negli analizzatori CHNS, la determinazione si basa, generalmente, sulla combustione completa del campione ad alta temperatura in atmosfera arricchita di ossigeno, seguita dalla conversione degli elementi costitutivi in specie gassose semplici e quantitativamente determinabili. Il campione, accuratamente pesato e racchiuso in una capsula metallica, viene introdotto nel reattore di combustione, dove l'elevata temperatura e la presenza di ossigeno favoriscono una rapida ossidazione della matrice. Il carbonio viene convertito principalmente in biossido di carbonio (CO_2), l'idrogeno in acqua (H_2O), lo zolfo in biossido di zolfo (SO_2), mentre l'azoto dà origine inizialmente a diverse specie ossidate. Il flusso gassoso viene successivamente fatto passare attraverso un reattore di riduzione, nel quale gli ossidi di azoto vengono convertiti ad azoto molecolare (N_2) e l'eventuale ossigeno in eccesso viene rimosso. Le specie gassose prodotte vengono quindi separate e successivamente quantificate mediante un sistema di rivelazione, generalmente basato sulla misura della conducibilità termica. La quantità di ciascun gas rilevato viene correlata, mediante opportuna taratura, alla massa dell'elemento corrispondente presente nel campione, consentendo di esprimere il risultato come percentuale in massa.

Un analizzatore elementare CHNS è costituito principalmente da:

- Sistema di pesata, costituito da una microbilancia analitica utilizzata per determinare con elevata precisione la massa del campione;
- Capsula portacampione, generalmente in stagno, nella quale viene racchiusa l'aliquota destinata alla prova;
- Reattore di combustione, mantenuto ad alta temperatura e alimentato con ossigeno, nel quale avviene l'ossidazione completa del campione;
- Reattore di riduzione, utilizzato per convertire gli ossidi di azoto ad azoto molecolare e rimuovere l'ossigeno residuo;
- Sistemi di purificazione e trattamento del flusso gassoso, finalizzati alla rimozione di eventuali interferenti;
- Sistema di separazione, generalmente costituito da una colonna cromatografica di tipo PLOT, che consente di separare le diverse specie gassose prodotte durante la combustione;

- Rivelatore a conducibilità termica (TCD, Thermal Conductivity Detector), utilizzato per la determinazione quantitativa dei gas separati.

L'analisi elementare CHNS rappresenta una tecnica ampiamente utilizzata per la caratterizzazione della composizione globale di matrici organiche e di numerosi materiali. L’accuratezza e la precisione della determinazione dipendono tuttavia da un’adeguata preparazione del campione, dalla sua omogeneità, dalla corretta calibrazione/taratura dello strumento e dalla completa combustione della matrice.

5.7. Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)

La determinazione della composizione isotopica del carbonio e dell'ossigeno è stata effettuata mediante spettrometria di massa dei rapporti isotopici (IRMS, *Isotope Ratio Mass Spectrometry*), utilizzando differenti sistemi di preparazione e introduzione del campione in funzione dell'elemento preso in esame. Nel presente lavoro, la composizione isotopica del carbonio è stata determinata a livello dei singoli amminoacidi presenti nel latte mediante un sistema LC-IRMS costituito da un cromatografo liquido accoppiato ad una interfaccia, LiquiFace (Elmentar Italia Srl), per l'ossidazione per via chimica degli analiti di interesse e ad uno spettrometro di massa in alta risoluzione, isoprime precisION (Elementar Italia Srl) dedicato alla misura di rapporti isotopici di elementi leggeri quali Idrogeno, Carbonio, Ossigeno, Azoto e Zolfo. La composizione isotopica dell'ossigeno è stata invece determinata relativamente alla molecola di acqua presente nei campioni mediante il sistema di equilibrazione tipo isoFLOW (Elementar Italia Srl), anch'esso accoppiato allo spettrometro isoprime precisION. I due sistemi differiscono principalmente per il meccanismo attraverso il quale l'informazione isotopica dell'analita viene trasferita a una specie gassosa idonea alla misura mediante IRMS.

5.7.1 Determinazione del $\delta^{13}C$ degli amminoacidi mediante LC-LiquiFace-IRMS

a determinazione del $\delta^{13}C$ degli amminoacidi presenti nei campioni di latte e nel prodotto finito, Gorgonzola DOP, rappresenta una sfida analitica estremamente complessa in considerazione delle peculiarità della tecnica analitica utilizzata.

Infatti, per questo tipo di prova, il setup strumentale prevede l'impiego di un sistema LC-IRMS (*Liquid Chromatography–Isotope Ratio Mass Spectrometry*), che consente di effettuare l'analisi isotopica di singoli composti sfruttando un approccio di tipo "*compound-specific isotope analysis*, CSIA". La maggiore difficoltà della prova rispetto ad una normale caratterizzazione e quantificazione degli amminoacidi presenti risiede nel fatto che la separazione cromatografica, nel caso della misura del $\delta^{13}C$ non può sfruttare una separazione in fase inversa tradizionale, ovvero utilizzare una fase mobile costituita da acqua e modificatore organico. Per questo motivo, il processo di separazione degli amminoacidi sfrutta meccanismi multipli di interazione soluto-fase stazionaria con una fase mobile 100 % acquosa.

Per decenni, la progettazione delle fasi stazionarie per la cromatografia liquida (LC) è stata dominata dall'obiettivo di eliminare le interazioni multiple o "indesiderate" che si verificano durante le separazioni. Ad esempio, nella cromatografia a scambio ionico e a esclusione ionica in modalità singola, le interazioni non ioniche sono generalmente considerate fattori che complicano la separazione e, di conseguenza, sono classificate come “indesiderate”. Tuttavia, esiste un modo per sfruttare le interazioni multiple nella fase stazionaria: le colonne a modalità mista o mixed-mode.

Le colonne progettate per separazioni a modalità mista sono in grado di separare un'ampia gamma di composti utilizzando diverse modalità di separazione. Tali modalità possono essere controllate e variate agendo sulla fase mobile. Grazie alla presenza di un gruppo integrato per la formazione di coppie ioniche, queste fasi stazionarie non richiedono l'aggiunta di reagenti specifici nella fase mobile per trattenere e separare composti polari ionizzabili. È stato dimostrato che queste fasi separano efficacemente ioni organici e inorganici sfruttando le modalità a scambio ionico, nel caso di analiti con carattere basico e a esclusione ionica per analiti con caratteristiche acide. Le fasi stazionarie/colonne possono essere utilizzate anche per separazioni efficienti in modalità singola a fase inversa (RP), nonché in diverse combinazioni delle tre modalità citate. Modalità di separazione differenti offrono selettività diverse della colonna. Nella maggior parte dei casi, le separazioni richiedono una fase mobile semplice, composta da acetonitrile, acqua e un acido o un tampone salino. L'aspetto fondamentale è formulare una fase mobile con forza sufficiente a eluire sia i composti ionici che quelli non ionici; la presenza di ioni nella fase mobile è infatti necessaria per favorire l'eluizione dei composti ionizzabili.

Una delle caratteristiche principali di queste colonne/fasi stazionarie è la loro resistenza al fenomeno di “dewetting” (perdita di bagnabilità) anche con fasi mobili acquose al 100% ed è stabile sia in condizioni puramente organiche che fortemente acide, fino a un pH di 0. Eventuali interazioni dovute a silanoli o alla chelazione di metalli sono completamente eliminate e non compromettono l'efficienza della separazione.

La cromatografia a modalità mista offre molteplici tipi di interazione per numerosi analiti. La presenza di tali interazioni consente di sfruttare le modifiche alla fase mobile con maggiore efficacia rispetto alla tradizionale cromatografia a fase inversa. I composti ionizzabili possono interagire con la fase stazionaria attraverso meccanismi di fase inversa, scambio ionico o esclusione ionica. La quantità di acido nella fase mobile (ovvero la forza del tampone) influenza la ritenzione dovuta all'interazione di scambio ionico, proprio come la componente organica

condiziona la ritenzione nella separazione a fase inversa (ovvero le interazioni idrofobiche). Di conseguenza, le quantità di modificatori organici e acidi sono entrambe fondamentali per controllare la ritenzione degli analiti ionizzabili. In questo lavoro di tesi è stata scelta una colonna operante in modalità mixed mode della ditta Sielc: ovvero, la Primesep 100A.

La fase stazionaria della colonna Primesep 100 è in grado di interagire con diverse tipologie di analiti in svariati modi. Tali proprietà offrono molteplici possibilità per regolare la selettività della colonna. Qualora due o più picchi non risultino risolti mediante le tradizionali tecniche a fase inversa o a scambio ionico, la colonna a modalità mista può rappresentare uno strumento efficace per individuare le condizioni di separazione ottimali.

Nel caso specifico della separazione di amminoacidi, la fase stazionaria utilizzata è costituita da una struttura di bulk a base di silice porosa, porosità 100 A^0.

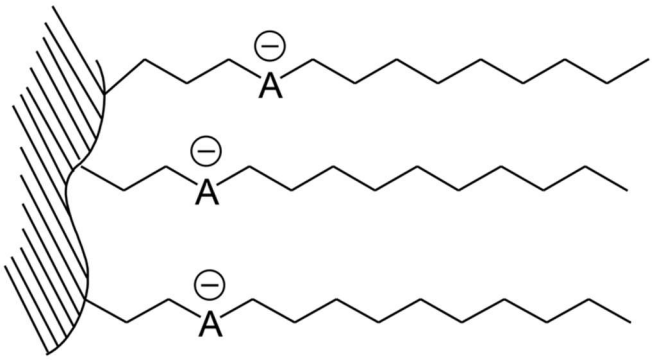


Figura 5.2: schema struttura fase stazionaria operante in modalità mix mode con possibilità di interazione di tipo cationico.

Grazie alla presenza del gruppo acido di accoppiamento, A^-, la colonna Primesep 100 non richiede reagenti l'aggiunta di additivi a coppia ionica nella fase mobile per trattenere e separare composti polari ionizzabili. Il ligando è costituito, generalmente, da una catena a 12 atomi di carbonio (C12), vedi **Figura 5.2**, e il suo gruppo funzionale acido presenta un pKa di circa 1. Le funzionalità di fase inversa e di scambio cationico sono integrate in un'unica molecola, garantendo così buona riproducibilità e stabilità. La separazione dei diversi amminoacidi è realizzata attraverso l'implementazione di una eluizione a gradiente di composizione dove il solvente A è acqua e il modificatore è costituito da una soluzione di acido solforico, H_2SO_4, 0.2 M. Ulteriori dettagli sul metodo di prova saranno forniti nel capitolo 9 dedicato a Materiali e Procedure.

Nell'accoppiamento LC-IRMS, all'uscita dalla colonna cromatografica, l'eluato viene trasferito all'interfaccia LiquiFace, il cui compito è convertire quantitativamente il carbonio organico degli analiti separati in CO_2 mediante ossidazione chimica in fase liquida (*wet chemical oxidation*). Tale conversione rappresenta un passaggio fondamentale dell'analisi, poiché un'ossidazione completa e riproducibile è necessaria per preservare l'informazione isotopica originaria degli analiti e minimizzare eventuali fenomeni di frazionamento.

Lo schema dell'interfaccia LiquiFace utilizzata è riportato in **Figura 5.3**.

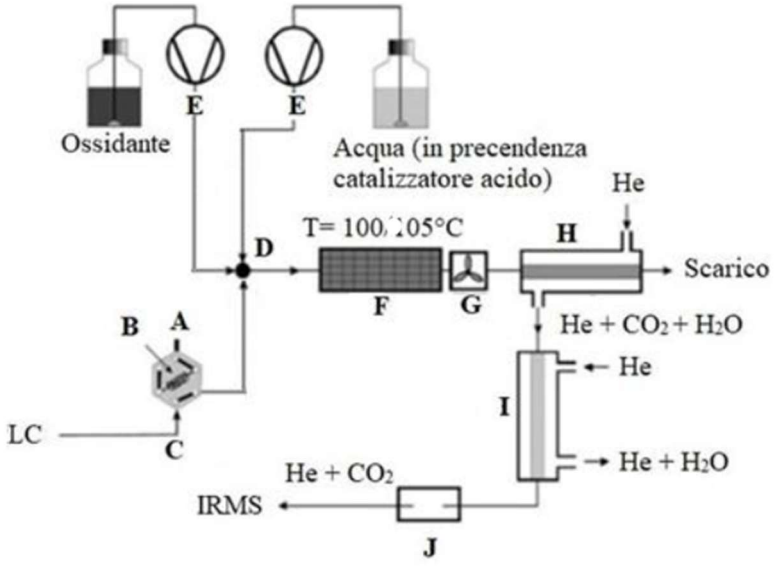


Figura 5.3. Schema dell'interfaccia LiquiFace accoppiata al sistema LC-IRMS. **A:** valvola Rheodyne; **B:** loop di campionamento; **C:** ingresso dell'eluato proveniente dal sistema LC; **D:** raccordo di miscelazione (*T-piece*); **E:** pompa peristaltica; **F:** reattore di ossidazione; **G:** sistema di raffreddamento; **H:** unità di separazione della CO_2 dalla fase liquida; **I:** sistema di essiccamento mediante membrana Nafion®; **J:** interfaccia *open split*.

All'interno dell'interfaccia, l'eluato proveniente dal sistema cromatografico viene miscelato con una soluzione acquosa di perossidisolfato di sodio, utilizzato come agente ossidante, e con una soluzione di acido ortofosforico. I reagenti vengono introdotti mediante una pompa peristaltica multicanale e miscelati con il flusso proveniente dal sistema LC prima dell'ingresso nel reattore di ossidazione [24]. Nel reattore, mantenuto a temperatura controllata, il carbonio organico degli analiti viene ossidato a CO_2. Il flusso in uscita viene successivamente raffreddato e inviato all'unità di separazione gas-liquido, nella quale la CO_2 viene estratta dalla fase acquosa e trasferita a un flusso di elio. Il gas viene quindi fatto passare attraverso una membrana Nafion®, utilizzata per

rimuovere il vapore acqueo residuo. La CO_2 essiccata viene infine trasferita, mediante il sistema *open split*, allo spettrometro di massa per la determinazione del rapporto isotopico $^{13}C/^{12}C$.

L'efficienza e la riproducibilità della conversione sono influenzate da diversi parametri operativi dell'interfaccia. Nell'ambito dell'ottimizzazione del metodo sono stati pertanto considerati, in particolare:

- la quantità di analita introdotta nel sistema;
- la temperatura del reattore di ossidazione;
- il flusso dell'eluato inviato all'interfaccia LiquiFace;
- il flusso di elio nel sistema di separazione della CO_2.

L'ottimizzazione di tali parametri è finalizzata all'ottenimento di un processo di conversione il più ripetibile e riproducibile possibile oltre ad una adeguata intensità del segnale misurato su ciascuna coppa di Faraday.

5.7.3. Determinazione del $\delta^{18}O$ dell'acqua mediante iso FLOW-IRMS

La composizione isotopica dell'ossigeno dell'acqua presente nei campioni è stata determinata mediante il sistema iso FLOW accoppiato ad uno spettrometro di massa isoprime precisION. La determinazione si basa sull'equilibrazione isotopica tra l'ossigeno presente nelle molecole d'acqua del campione e quello della CO_2 introdotta nello spazio di testa di un vial opportunamente sigillato.

Per ciascuna analisi, 200 µL di campione sono stati trasferiti in un vial successivamente posto all'interno di un opportuno sistema di campionamento termostatato e facente parte del sistema iso FLOW. La temperatura viene mantenuta costante durante l'intero processo di equilibrazione, poiché il frazionamento isotopico tra CO_2 e H_2O è dipendente dalla temperatura e sue eventuali variazioni possono influenzare il risultato finale.

Prima dell'equilibrazione, lo spazio di testa del vial è sottoposto a flussaggio con elio allo scopo di rimuovere l'aria atmosferica e minimizzare la presenza di CO_2 all'interno del vial. Successivamente viene introdotta una miscela contenente CO_2 ed elio, utilizzata come gas di equilibrazione. Il vial viene pressurizzato e mantenuto nelle condizioni previste dal metodo per il tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio isotopico.

Durante questa fase avviene lo scambio scambio degli isotopi dell'ossigeno tra l'acqua del campione e la CO_2 presente nello spazio di testa. Il processo può essere rappresentato schematicamente mediante la seguente **Reazione 5.1** di scambio isotopico:

$$O_2 + H_2{}^{18}O \leftrightarrow C^{16}O^{18} + H_2{}^{16}O \qquad \textbf{(Reazione 5.1)}$$

Al raggiungimento dell'equilibrio, la composizione isotopica dell'ossigeno della CO_2 presente nello spazio di testa risulta correlata a quella dell'acqua del campione attraverso il fattore di frazionamento isotopico CO_2–H_2O, il cui valore dipende dalla temperatura. La misura della composizione isotopica della CO_2 consente pertanto di determinare direttamente il valore di $\delta^{18}O$ dell'acqua del campione. L'impiego di condizioni rigorosamente controllate di temperatura e tempo di equilibrazione è quindi essenziale per garantire la comparabilità e la riproducibilità delle determinazioni [25]. Al termine del periodo di equilibrazione, un'aliquota della CO_2 presente nello spazio di testa viene prelevata automaticamente dal sistema iso FLOW e utilizzata per il

riempimento del loop di campionamento. Il gas viene successivamente trasferito, mediante un flusso di elio, verso il sistema di purificazione e quindi allo spettrometro di massa. Prima dell'introduzione nell'IRMS, la CO_2 viene privata del vapore acqueo residuo attraverso gli appositi sistemi di rimozione dell'umidità presenti nell'interfaccia, comprendenti il sistema UltiTrap e la membrana Nafion® nella configurazione strumentale utilizzata. La CO_2 essiccata viene infine trasferita allo spettrometro attraverso l'interfaccia *open split* [26].

Lo schema del sistema iso FLOW accoppiato allo spettrometro di massa isoprime precisION è riportato in **Figura 5.4**:

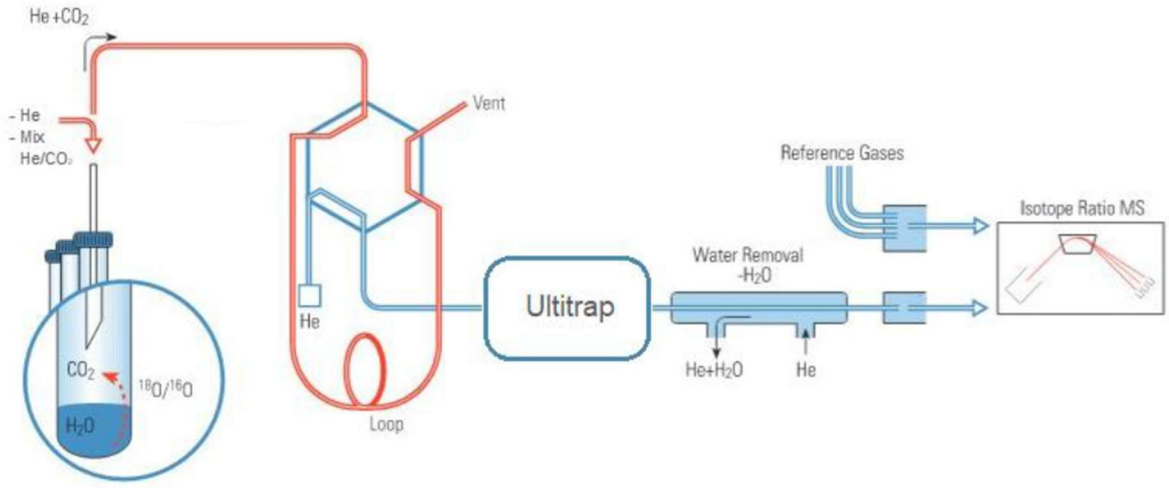


Figura 5.4: Schema del sistema iso FLOW accoppiato allo spettrometro di massa per la determinazione del $\delta^{18}O$ dell'acqua mediante equilibrazione isotopica CO_2–H_2O.

All'interno dello spettrometro di massa, la CO_2 viene ionizzata e le correnti ioniche corrispondenti alle diverse specie isotopiche della CO_2 vengono misurate simultaneamente. I segnali ottenuti vengono utilizzati per determinare la composizione isotopica dell'ossigeno e, dopo normalizzazione mediante appropriati materiali di riferimento, il risultato viene espresso come $\delta^{18}O$ sulla scala internazionale VSMOW-SLAP.

La **Figura 5.5** riporta, a titolo esemplificativo, il profilo del segnale IRMS ottenuto durante l'analisi di un campione di latte intero. Il tracciato relativo alla CO_2 equilibrata con il campione viene confrontato con i segnali del gas di riferimento utilizzati dal sistema per la determinazione del rapporto isotopico.

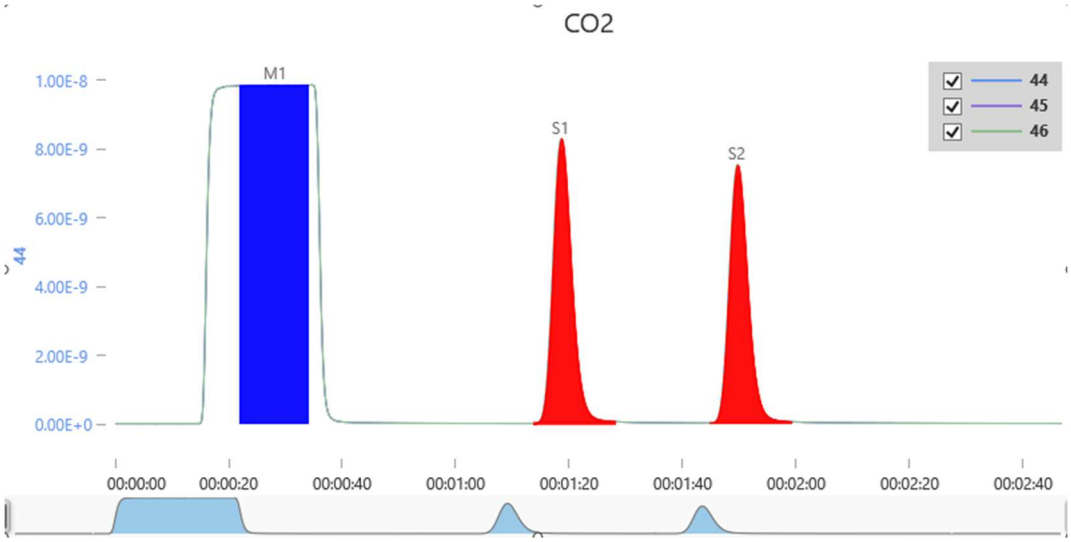


Figura 5.5: Spettro ottenuto tramite il sistema IRMS con interfaccia iso-Flow di un campione di latte: tratto rosso. In blu il segnale relativo alla CO_2 del gas di riferimento.

5.7.4. Spettrometro di massa IRMS

La spettrometria di massa dei rapporti isotopici (IRMS, *Isotope Ratio Mass Spectrometry*) è una tecnica specificamente progettata per la determinazione ad elevata precisione dei rapporti tra isotopi stabili. Trova particolare applicazione nello studio degli isotopi degli elementi leggeri, tra cui idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno e zolfo [24]. A differenza della spettrometria di massa convenzionale, nella quale l'obiettivo principale è frequentemente l'identificazione o la quantificazione di specie caratterizzate da differenti rapporti massa/carica, l'IRMS è ottimizzata per misurare con elevata precisione piccole differenze nelle intensità di fasci ionici corrispondenti a specie isotopicamente differenti.

Uno spettrometro di massa IRMS può essere schematicamente suddiviso in tre componenti principali:

1. Sorgente di ionizzazione;
2. Analizzatore di massa;
3. Sistema multicollettore per la rivelazione dei fasci ionici.

La **Figura 5.6** riporta una rappresentazione schematica delle principali componenti di uno spettrometro di massa IRMS. La geometria effettiva dello strumento isoprime precisION utilizzato nel presente lavoro può differire dallo schema generale per quanto riguarda la disposizione dell'analizzatore e dei collettori.

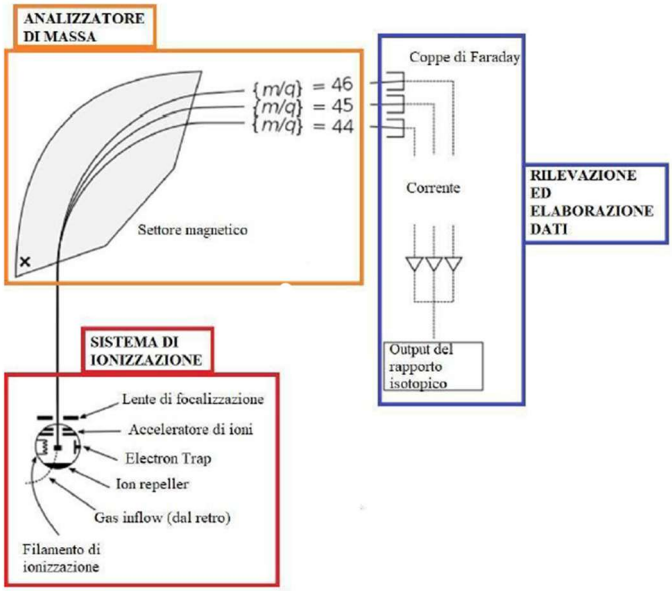


Figura 5.6: Schema generico di uno spettrometro di massa IRMS.

5.7.4.1. Sorgente di ionizzazione

La sorgente di ionizzazione ha il compito di convertire in modo stabile e riproducibile le molecole del gas proveniente dal sistema di introduzione in specie ioniche. Negli strumenti IRMS per isotopi stabili viene comunemente utilizzata una sorgente a ionizzazione elettronica (EI, *Electron Ionization*). All'interno della sorgente, un filamento riscaldato emette elettroni per effetto termoionico. Nel sistema isoprime precisION, il filamento di ionizzazione presenta un rivestimento a base di diossido di torio, particolarmente resistente alle condizioni operative associate anche all'accoppiamento LC-IRMS. Gli elettroni emessi vengono accelerati mediante una differenza di potenziale e attraversano la regione contenente il gas analizzato.

L'interazione tra gli elettroni ad elevata energia e le molecole del gas può determinare l'allontanamento di un elettrone dalla molecola neutra, con formazione di uno ione molecolare positivo, come riportato nella **Reazione 5.2**:

$$e- + M \rightarrow M+\cdot + 2e-$$ **(Reazione 5.2)**

La sorgente è inoltre dotata di opportuni elementi elettrostatici e magnetici finalizzati a controllare la traiettoria degli elettroni, aumentare l'efficienza di ionizzazione e focalizzare gli ioni prodotti in un fascio diretto verso l'analizzatore di massa.

Nel caso delle determinazioni effettuate nel presente lavoro, la specie gassosa sottoposta a ionizzazione è la CO_2. La sorgente produce pertanto ioni molecolari della CO_2 caratterizzati da differenti composizioni isotopiche: nello specifico gli ioni a diverso rapporto *m/z* misurati sono il 44, 45 e 46.

5.7.4.2 Analizzatore di massa a settore magnetico

Gli ioni prodotti nella sorgente vengono accelerati attraverso una differenza di potenziale (V). Per uno ione di massa (m), carica (z) e velocità (v), l'energia potenziale elettrica acquisita viene convertita in energia cinetica secondo la relazione:

$$zV = \frac{1}{2}mv^2$$ **(Eq. 5.5)**

Il fascio ionico accelerato entra successivamente in un campo magnetico (B), orientato perpendicolarmente alla direzione di moto degli ioni. In tali condizioni, sugli ioni agisce la forza di Lorentz:

$$F_B = zBv$$ **(Eq. 5.6)**

La forza magnetica determina la deviazione del fascio lungo una traiettoria approssimativamente circolare e gli ioni sono sottoposti ad una forza centripeta:

$$F_c = \frac{mv^2}{r}$$ **(Eq. 5.7)**

Dove r rappresenta il raggio di curvatura della traiettoria ionica.

Combinando le **Equazioni 5.5, 5.6 e 5.7** è possibile esplicitare il rapporto massa su carica *m/z* rispetto al campo magnetico, ottenendo l'**Equazione 5.8:**

$$\frac{m}{z} = \frac{1}{2}\frac{\vec{B}^2 \cdot r^2}{V}$$ **(Eq. 5.8)**

Dove:

- $\vec{B}$ è il campo magnetico applicato;
- r è il raggio di curvatura impartito;
- V potenziale di accelerazione dato dalla differenza di potenziale.

L'analizzatore a settore magnetico è classificabile come analizzatore di quantità di moto e un suo schema di base è riportato in **Figura 5.7**:

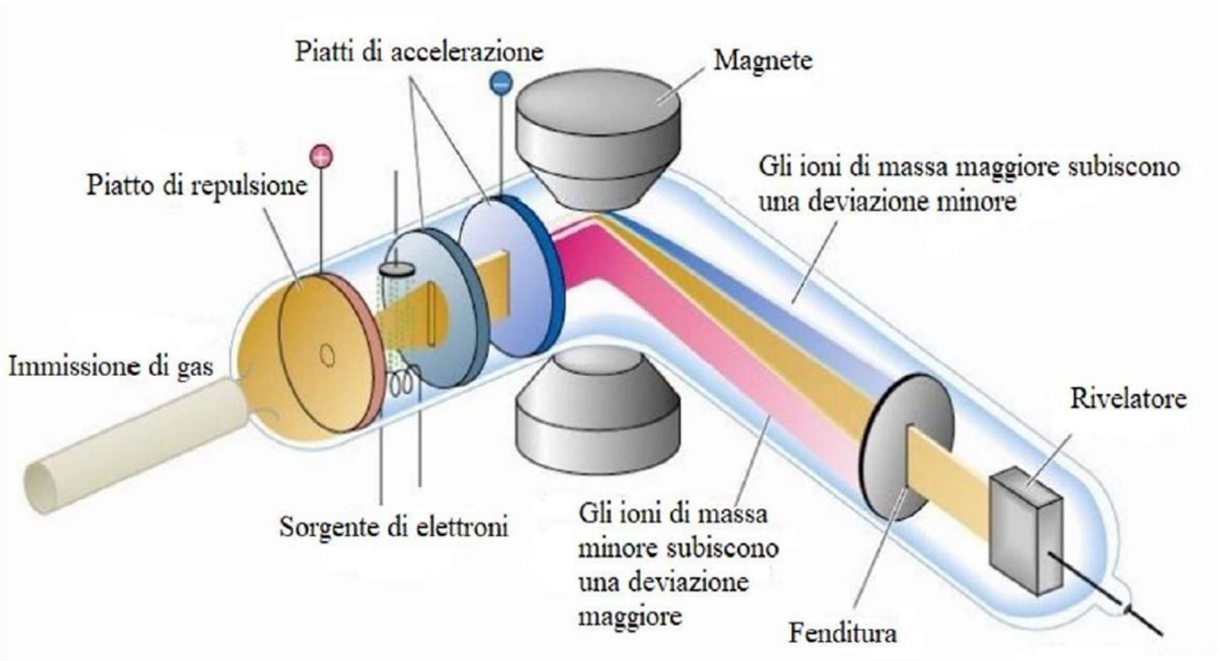


Figura 5.7: Analizzatore di massa a settore magnetico.

Dall'Eq. 5.8 emerge che, a parità di campo magnetico e potenziale di accelerazione, ioni caratterizzati da differenti rapporti *m/z* seguono traiettorie con differenti raggi di curvatura. Il settore magnetico consente quindi di disperdere spazialmente i diversi fasci ionici sulla base del loro rapporto (*m/z*).

A differenza di uno spettrometro di massa operante mediante scansione sequenziale del campo magnetico, gli strumenti IRMS utilizzano una configurazione multicollettore, nella quale i fasci ionici corrispondenti ai rapporti *m/z* di interesse vengono indirizzati simultaneamente verso differenti rilevatori. In questo modo è possibile misurare nello stesso intervallo temporale le intensità delle specie isotopiche necessarie al calcolo del rapporto isotopico. La misura simultanea rappresenta un requisito fondamentale per ottenere rapporti isotopici ad elevata precisione. Eventuali variazioni temporali dell'intensità complessiva del fascio, dovute ad esempio a fluttuazioni nell'introduzione del campione o nell'efficienza della sorgente di ionizzazione,

interessano infatti contemporaneamente i segnali misurati. Il calcolo del rapporto tra tali segnali riduce quindi l'influenza delle variazioni comuni e migliora la precisione della determinazione isotopica.

5.7.4.3 Multicollettore a Coppe di Faraday

Dopo la separazione nel settore magnetico, i fasci ionici corrispondenti ai diversi rapporti massa/carica devono essere rivelati e convertiti in segnali elettrici misurabili. Nella spettrometria di massa sono disponibili differenti sistemi di rivelazione, tra cui moltiplicatori di elettroni, microchannel plates e coppe di Faraday. Nella spettrometria di massa dei rapporti isotopici vengono comunemente utilizzati sistemi multicollettore costituiti da più coppe di Faraday, poiché consentono la misura simultanea delle correnti ioniche associate alle specie isotopiche di interesse. La coppa di Faraday può essere descritta come un collettore conduttivo progettato per intercettare il fascio ionico. Quando gli ioni positivi raggiungono la superficie interna della coppa, vengono neutralizzati mediante acquisizione di elettroni dal circuito esterno. Il conseguente flusso di carica genera una corrente elettrica proporzionale al numero di ioni raccolti nell'unità di tempo e, quindi, all'intensità del fascio ionico. La corrente generata è generalmente molto piccola e viene pertanto convertita e amplificata mediante un opportuno circuito elettronico ad elevata sensibilità. L'intensità del segnale ottenuto può quindi essere utilizzata per determinare il rapporto tra le correnti ioniche associate alle diverse specie isotopiche. Un possibile fenomeno interferente nella raccolta degli ioni è rappresentato dall'emissione di elettroni secondari. L'impatto di uno ione energetico sulla superficie del collettore può infatti determinare l'emissione di uno o più elettroni. Qualora tali elettroni riuscissero ad abbandonare il sistema di raccolta, la corrente misurata potrebbe non rappresentare correttamente la carica associata agli ioni incidenti. La geometria delle coppe di Faraday è pertanto progettata per favorire la raccolta degli ioni e limitare la perdita di elettroni secondari. A tale scopo possono essere impiegati opportuni elettrodi e campi elettrici di soppressione, in grado di trattenere gli elettroni emessi all'interno del collettore e ridurre il contributo di questo fenomeno alla misura.

Negli strumenti IRMS, più coppe di Faraday vengono disposte in posizioni differenti in corrispondenza delle traiettorie seguite dai fasci ionici separati dal settore magnetico. Questa configurazione consente di misurare simultaneamente le correnti associate ai diversi valori di *m/z* necessari per la determinazione del rapporto isotopico.

La corretta regolazione del sistema ionico viene verificata mediante l'osservazione del profilo del fascio in corrispondenza dei collettori. Una configurazione ottimale presenta una regione centrale relativamente piatta, comunemente definita flat top, nella quale piccole variazioni della posizione del fascio non determinano variazioni significative dell'intensità misurata. Tale condizione contribuisce a rendere la misura meno sensibile a piccoli spostamenti del fascio ionico dovuti, ad esempio, a variazioni del campo magnetico o del potenziale di accelerazione.

La **Figura 5.8** riporta schematicamente il principio di funzionamento di una coppa di Faraday:

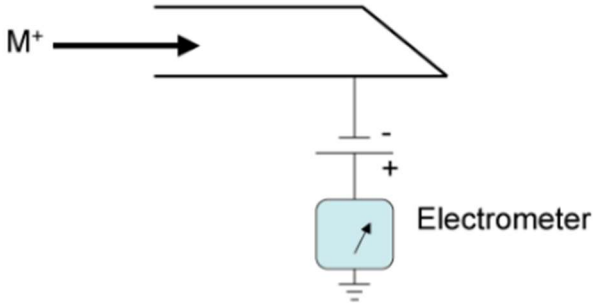


Figura 5.8: Rappresentazione schematica del principio di funzionamento di una coppa di Faraday.

La **Figura 5.9** mostra schematicamente un profilo caratterizzato dalla presenza della regione *flat top*, utilizzata per verificare il corretto posizionamento del fascio ionico rispetto al collettore.

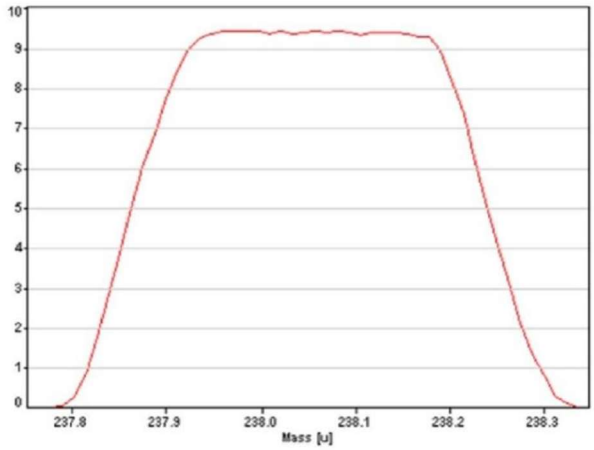


Figura 5.9: Rappresentazione del segnale Top-Flat tipico dei rivelatori a Coppe di Faraday.

La **Figura 5.10** riporta la configurazione dei collettori utilizzati nello spettrometro isoprime precisION per la misura simultanea dei fasci ionici della CO_2:

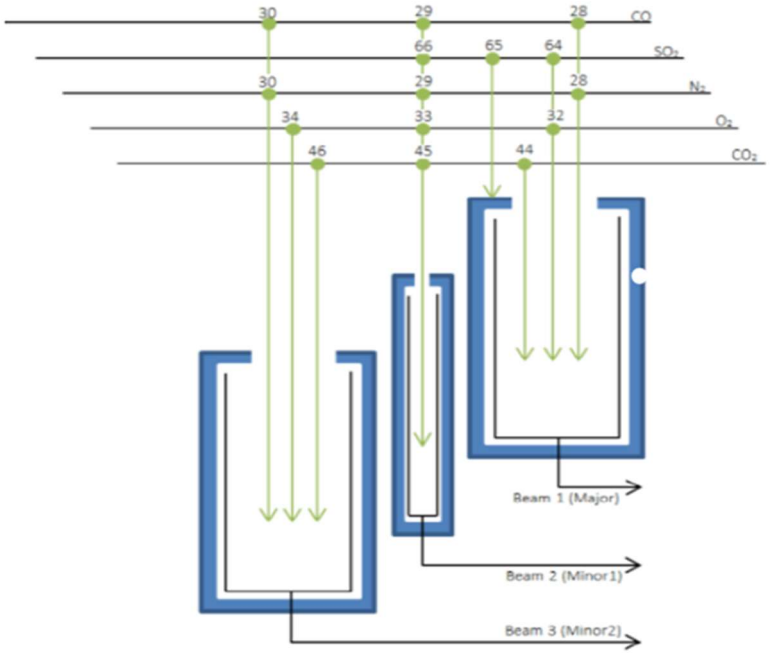


Figura 5.10: Multicollettore a coppe di Faraday presente nello spettrometro Isoprime precisION con relativi rapporti *m/z* per ogni coppa di misura in funzione della specie determinata.

6. METODI DI TRATTAMENTO DEI DATI

6.1 Analisi delle componenti principali, PCA

Nel presente studio è stata impiegata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA), una tecnica esplorativa di analisi multivariata che consente di ridurre la dimensionalità dello spazio delle variabili originali, preservando al contempo la massima informazione utile ed evidenziando eventuali correlazioni e relazioni reciproche tra i campioni e i parametri misurati.

Nello specifico, la matrice di dati in esame presenta una struttura in cui le righe corrispondono ai campioni analizzati (oggetti) e le colonne rappresentano le differenti variabili quantitative misurate. Attraverso l'algoritmo PCA, la varianza totale racchiusa nella matrice originaria viene scomposta in tre componenti fondamentali:

- **Score:** rappresentano le coordinate dei campioni nel nuovo spazio ridotto e ne descrivono il comportamento;
- **Loading:** definiscono i pesi e il contributo di ciascuna variabile originale nella costruzione delle componenti principali;
- **Residui:** quantificano la quota di varianza non spiegata e l'errore associato al modello.

Da un punto di vista geometrico, la PCA proietta lo spazio ad elevata dimensionalità definito dalle variabili reali in un nuovo sistema di coordinate a dimensione ridotta, i cui assi ortogonali costituiscono le componenti principali (PCs). La costruzione di tali assi segue un criterio di massimizzazione della varianza: la prima componente principale PC1 viene orientata lungo la direzione che descrive la massima quota di varianza dei dati; le componenti successive, tra loro mutualmente ortogonali, vengono individuate in modo iterativo per spiegare la varianza residua decrescente. La **Figura 6.1** illustra schematicamente la generazione delle componenti principali lungo le direzioni di massima varianza e la conseguente definizione del nuovo spazio metrologico.

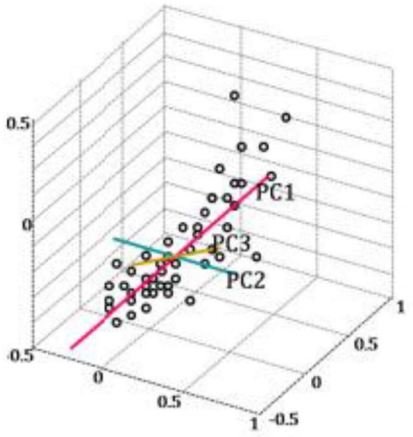


Figura 6.1: costruzione delle prime 3 componenti principali in uno spazio tridimensionale.

I factor score costituiscono le coordinate dei campioni (oggetti) all'interno del nuovo spazio definito dalle componenti principali, mentre i factor loading esprimono i pesi con cui ciascuna variabile originale contribuisce alla definizione delle singole PCs. La PCA rappresenta dunque un potente strumento di indagine, capace di estrarre informazioni cruciali e di evidenziare andamenti sistematici, raggruppamenti (cluster), anomalie e correlazioni tra campioni (tramite il grafico degli score) e variabili (tramite il grafico dei loading), che risulterebbero altrimenti difficili da individuare in dataset complessi e ad elevata dimensionalità.

Quando si analizzano variabili di natura eterogenea e/o caratterizzate da differenti unità e scale di misura, risulta fondamentale applicare un'opportuna trasformazione preliminare affinché tali parametri siano reciprocamente confrontabili. Nel presente lavoro di tesi, si è reso necessario sottoporre i dati a un processo di autoscalatura (autoscaling); ciò ha evitato che i composti presenti a concentrazioni maggiori esercitassero un peso dominante nel modello PCA rispetto ai composti in tracce, rischiando di mascherarne il contributo informativo. Tale pretrattamento prevede una centratura dei dati, ottenuta sottraendo a ciascun valore la media della relativa variabile, seguita da una scalatura a varianza unitaria, mediante divisione per la corrispondente deviazione standard.

Il modello matematico della PCA applicato alla matrice dei dati X assume quindi la seguente forma [20]:

$$X = TB^T + E = \sum_{a=1}^{A} t_a b_a^T + R$$

(Eq. 6.1)

Come **Eq. 6.1.** Dove T sono i valori degli scores, B sono i loadings, A è il numero di PC e R sono i residui.

6.2. Visualizzazione dei dati mediante Box Plot

Il box plot (o box-and-whisker plot, comunemente noto come diagramma a scatola e baffi) è una rappresentazione grafica ampiamente impiegata nell'analisi statistica per sintetizzare la distribuzione di un insieme di dati omogenei. Questo strumento risulta particolarmente efficace nel visualizzare con immediatezza la tendenza centrale, la dispersione e la simmetria dei dati, oltre a evidenziare la presenza di eventuali valori anomali (outlier).

La costruzione del box plot si basa sull'impiego di indici di posizione non parametrici, nello specifico la mediana e i quartili, i quali consentono di partizionare la distribuzione ordinata in quattro intervalli di pari frequenza (ciascuno pari al 25% delle osservazioni). La **Figura 6.2** illustra la struttura tipica di un box plot, dove la scatola (box) è delimitata inferiormente dal primo quartile (Q1, corrispondente al 25%) e superiormente dal terzo quartile (Q3, corrispondente al 75%); la linea orizzontale posta all'interno della scatola rappresenta la mediana (Q2 o 50%), ovvero il valore che divide a metà la distribuzione dei dati osservati.

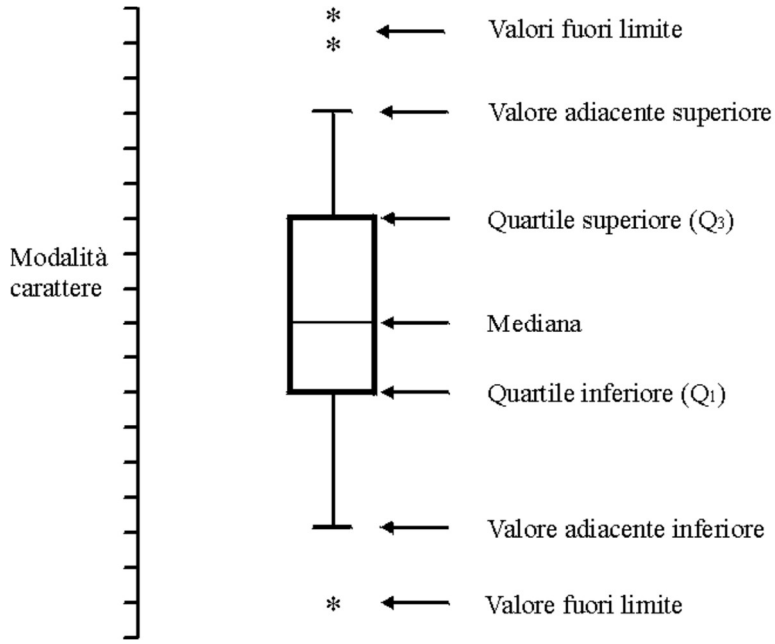


Figura 6.2: rappresentazione grafica di una distribuzione statistica tramite box plot.

Il box plot così strutturato offre una descrizione immediata della forma della distribuzione attraverso l'analisi dei valori adiacenti e delle distanze relative tra ciascun quartile e la mediana. In particolare, un'asimmetria nella lunghezza dei baffi o una posizione decentrata della mediana all'interno della scatola indicano la presenza di una distribuzione asimmetrica, condizione nella quale la mediana differisce dal valore medio.

Inoltre, l'ampiezza dell'intervallo interquartilico (IQR = Q3 - Q1) fornisce una misura della variabilità e della dispersione dei dati: un valore di IQR contenuto indica che il 50% centrale delle osservazioni è fortemente addensato attorno alla mediana, riflettendo un'elevata omogeneità del campione; al contrario, un intervallo più ampio è indice di una maggiore dispersione dei dati attorno al valore centrale.

Componenti del **Box plot**:

1. **Scatola (Box):**
   - **Mediana:** La linea all'interno della scatola rappresenta la mediana del dataset, cioè il valore centrale che divide il dataset in due parti uguali.
   - **Quartili:** La scatola stessa si estende dal primo quartile (Q1) al terzo quartile (Q3), coprendo il 50% dei dati. Il primo quartile rappresenta il 25% inferiore dei dati, mentre il terzo quartile rappresenta il 25% superiore, rispetto la mediana.
   - **Media:** Rappresentata dal posto all'interno della distribuzione dei dati che rappresenta il valore tipico del set di dati.
2. **Baffi (Whiskers):**
   - I baffi si estendono dalle estremità della scatola fino ai valori più piccoli e più grandi entro un certo intervallo, solitamente definito come 1.5 volte l'intervallo interquartile (IQR = Q3 - Q1). I baffi indicano quindi la dispersione dei dati all'interno di questo intervallo.
3. **Valori anomali (Outliers):**
   - I punti situati al di fuori dell'intervallo definito dai baffi, *, vengono considerati outliers, ovvero valori anomali. Questi valori sono indicati come punti isolati e possono indicare variazioni o anomalie significative nel dataset. Possono essere di due tipi: outliers superiori e inferiori.

Interpretazione del Box plot:

- **Simmetria:** Se la mediana è al centro della scatola e i baffi sono di lunghezza simile, la distribuzione è simmetrica.
- **Asimmetria:** Se la mediana è spostata verso un'estremità della scatola o i baffi hanno lunghezze diverse, la distribuzione è asimmetrica. Posso avere due tipi di asimmetrie: a dispersione negativa e positiva suggerite dalla posizione della mediana rispetto ai limiti del box plot, rispettivamente se la mediana è più vicina al limite inferiore (Q1) avremo una distorsione positiva nel caso invece la mediana sia prossima al limite superiore (Q3) avremo una dispersione negativa.
- **Dispersione:** La lunghezza della scatola e dei baffi indica quanto sono dispersi i dati. Una scatola lunga o baffi lunghi suggeriscono una grande variabilità nei dati.
- **Outliers:** I punti al di fuori dei baffi indicano valori anomali, che possono essere di interesse per ulteriori analisi.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 Caratteristiche chimico-fisiche del bulk

Le caratterizzazioni di base vengono eseguite per determinare i parametri di bulk, l'obiettivo è dare una prima informazione analitica riguardo i campioni, una caratterizzazione rapida per monitorare la natura dei campioni in ingresso. La determinazione viene eseguita su tutti i campioni di latte appartenenti alla filiera del gorgonzola DOP.

Le prove effettuate servono a determinare i seguenti parametri:

- Densità;
- Indice di rifrazione;
- pH;
- Determinazione del contenuto di lattosio;
- Determinazione del contenuto elementare.

Definito il quadro generale lo studio prosegue con la determinazione dei composti organici volatili e semi volatili tramite HS-SPME GC/MS e con la determinazione del rapporto isotopico dell'ossigeno $^{18}O/^{16}O$.

Per poter comprendere e interpretare in modo ottimale i valori riportati in seguito è necessario descrivere ed evidenziare la composizione del latte vaccino. l latte rappresenta uno dei sistemi alimentari naturali più complessi, in cui la composizione chimica non è semplicemente la somma dei singoli componenti, ma il risultato di un'organizzazione strutturale e funzionale finemente bilanciata. Acqua, grasso del latte, proteine, lattosio, minerali e vitamine formano una matrice biochimica integrata la cui stabilità, il valore nutrizionale e il comportamento tecnologico dipendono non solo dai rapporti quantitativi, ma anche dallo stato fisico-chimico di ciascun componente. Dal punto di vista fisico-chimico, il latte è un sistema multifase in cui coesistono soluzioni vere e proprie, strutture colloidali ed emulsioni. L'acqua costituisce la fase continua che fornisce il mezzo per tutte le reazioni e interazioni. Il lattosio e parte dei minerali sono disciolti nella fase acquosa, mentre le proteine formano una fase colloidale e i grassi costituiscono una fase di emulsione dispersa. Questa organizzazione è il risultato di un'ottimizzazione evolutiva, che consente sia un'elevata densità nutrizionale sia una buona stabilità fisica. La composizione chimica

del latte non può essere compresa senza considerare questa distribuzione di fasi, poiché qualsiasi cambiamento in una fase influenza inevitabilmente le altre. Le componenti sono [28]:

- **Acqua**: L'acqua costituisce la parte più consistente del latte e ne determina la natura liquida. Non è un diluente inerte, ma un elemento attivo nella stabilizzazione delle strutture proteiche, nella distribuzione dei minerali e nel mantenimento dell'equilibrio osmotico.
  Tutti i processi di diffusione e ionici nel latte avvengono attraverso la fase acquosa. Le modifiche a questa fase, siano esse dovute a diluizione, evaporazione o processi osmotici, comportano un completo riarrangiamento della composizione chimica e la perturbazione del naturale equilibrio del sistema;
- **Grassi**: Il grasso del latte rappresenta una fase dispersa composta da globuli di grasso stabilizzati da una membrana biologica. Dal punto di vista chimico, è una miscela lipidica estremamente complessa, ma funzionalmente agisce come un sottosistema emulsionato unitario. Il grasso determina il valore energetico, le proprietà sensoriali e gran parte del comportamento tecnologico del latte. Il suo stato strutturale – dimensione dei globuli, integrità della membrana e composizione lipidica – è un elemento essenziale della composizione chimica in senso lato. Le variazioni del contenuto di grasso influenzano fortemente la qualità percepita e l'idoneità alla lavorazione;
- **Proteine**: La composizione proteica del latte è fondamentale per la sua stabilità strutturale. Le proteine della caseina formano un sistema colloidale sotto forma di micelle stabilizzate da interazioni proteina-minerale. Le proteine del siero di latte sono presenti in vera soluzione e contribuiscono al valore biologico e funzionale del prodotto.
  In questo senso, la composizione chimica del latte è determinata non solo dalla quantità di proteine, ma anche dal modo in cui queste sono organizzate. Tale organizzazione definisce la risposta del latte all'acidità, alla temperatura e all'azione enzimatica, influenzando direttamente la qualità e i processi tecnologici;
- **Lattosio**: Il lattosio è il principale carboidrato presente nel latte e si trova interamente nella fase acquosa. Essendo chimicamente relativamente stabile, svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della pressione osmotica e dei processi microbiologici;
  La sua concentrazione è strettamente correlata al volume del latte e all'equilibrio tra gli altri componenti. In questo senso, il lattosio agisce come un regolatore chiave della composizione chimica, piuttosto che come una semplice fonte di energia;

- **Sostanze minerali**: La composizione minerale del latte comprende sia ioni disciolti che forme colloidali associate alla fase proteica. Calcio e fosforo stabilizzano le micelle di caseina, mentre i minerali alcalini regolano l'equilibrio elettrolitico;
  Dal punto di vista minerale, la composizione chimica del latte deve essere considerata come un equilibrio ionico sensibile alle variazioni di pH, temperatura e trattamenti tecnologici. Questa struttura ionica garantisce la stabilità e la capacità tampone del latte.
- **Vitamine**: Le vitamine e altri composti microattivi sono presenti in piccole quantità, ma contribuiscono in modo significativo al valore nutrizionale e all'attività biologica del latte. Sono distribuiti tra la fase grassa e quella acquosa e la loro presenza riflette sia l'origine biologica che il grado di trasformazione.

Va adesso anche sottolineato che questa composizione chimica è variabile e non è costante. Varia a seconda di fattori biologici come la razza, la fase di lattazione e lo stato di salute, nonché di condizioni esterne tra cui l'alimentazione, la stagione e le tecnologie di mungitura. Questa variabilità è naturale e non deve essere considerata un difetto, bensì una caratteristica dell'origine biologica del latte. La qualità non è determinata dalla stabilità assoluta, ma dall'armonia tra i componenti. La composizione chimica è riportata nella **Tabella 7.1**.

Tabella 7.1: composizione chimica del latte vaccino [29].

Componente	Percentuale Media (%)	Descrizione Chimica e Frazioni principali
Acqua	87,3% – 87,5%	È la matrice solvente del sistema.
Glucidi (Carboidrati)	4,6% – 5,0%	Rappresentati quasi totalmente dal lattosio, un disaccaride composto da glucosio e galattosio.
Lipidi (Grassi)	3,4% – 3,9%	Costituiti per il 98% da trigliceridi. Ricchi di acidi grassi saturi (~65-70%), monoinsaturi (~30%) e polinsaturi (~3-5%).
Proteine	3,2% – 3,4%	Divise in due frazioni principali: Caseine (~80%, organizzate in micelle fosfoproteiche con calcio e magnesio) e Sieroproteine

		(~20%, tra cui β-lattoglobulina e α-lattoalbumina).
Sali Minerali (Ceneri)	0,7% – 0,9%	Ricco di Calcio (120 mg/100g), Fosforo, Potassio, Magnesio e Zinco, biologicamente coordinati alle proteine.
Vitamine	Tracce	Idrosolubili (principalmente B2 e B12) e liposolubili (A, D, E nell'emulsione grassa).

Un'altra questione da affrontare è la relazione che c'è fra il latte prodotto da una mucca e la sua dieta, e perché è importante determinare le caratteristiche di questa matrice e ha senso controllarlo.

Le mucche per il Gorgonzola DOP seguono un'alimentazione a base di foraggi e mangimi controllati, spesso gestiti tramite il sistema unifeed, quindi una dieta standardizzata e omogenea che mescola foraggi e componenti secchi, di cui almeno il 50% prodotti nella zona dove è prodotto, garantendo la salute della bovina e la stabilità della produzione di latte. I prodotti che consuma nella sua alimentazione un bovino sono trinciati, foraggi, erba medica, mais, farina di mais, standardizzati e secchi che vengono consumati costantemente. Il foraggio destinato all'alimentazione è di color paglierino e favorisce la ruminazione dell'animale.

La differenza sostanziale che porta ad un formaggio a pasta bianca e non con sfumature verso il giallo è data dal fatto che la mucca non va a consumare erba verde da pascolo, che contenendo beta carotene conferirebbe un colore che riporta ad una forma ossidata e vecchia.

7.1.1. Densità ed Indice di rifrazione

L'indice di rifrazione è una grandezza fisica misurabile attraverso rifrattometri analogici o digitali. È una grandezza che in ambito alimentare, con particolare attenzione su prodotti lattiero-caseari, permette di ottenere informazioni riguardo il campione, ed è in grado, insieme ad altri parametri, come la densità, di garantire l'autenticità del prodotto smascherando frodi e alterazioni come l'annacquamento, infatti l'aggiunta di acqua riduce la densità e altera il suo indice di rifrazione caratteristico. L'analisi in parallelo impedisce sofisticazioni e adulterazioni meno elaborate.

In **Tabella 7.2** sono riportati i valori medi di indice di rifrazione e densità con le relative deviazioni standard, suddivisi confrontando i due periodi di campionamento. Vengono riportati i valori medi perché come si può osservare la deviazione standard associata ha un intervallo molto ristretto, i campioni sono omogenei rispetto a ciascun periodo e mese, e lo sono anche fra le due stagioni di campionamento. Verranno riportati i valori medi anche nelle **Tabelle 7.3 e 7.4** in seguito alle stesse considerazioni fatti in questo caso specifico.

Tabella 7.2: valori medi di indice di rifrazione e densità e rispettiva deviazione standard dei campioni di latte separati per periodi di campionamento, quali inverno: 25 campioni, di cui 1 campione di settembre, 10 campioni di ottobre, 8 campioni di novembre e 6 campioni di dicembre. Il numero di campioni estivi 26: 1 campioni di marzo, 9 campioni di aprile, 8 campioni di maggio, 8 campioni di giugno.

Periodo	**nD**	**ρ (g/mL)**
Inverno	1.343±0.001	1.03±0.01
Primavera	1.346±0.002	1.03±0.01

I valori misurati di densità rientrano nei limiti di legge imposto per le caratteristiche chimico-fisiche del latte, il valore standard per il latte intero a 15 °C deve rientrare tra 1,029 e 1,031 g/mL, secondo il Regolamento CE 853/2004 del Pacchetto Igiene [30], ciò garantisce la sua sicurezza e l'assenza di eventuali sofisticazioni. Mentre per quello che riguarda l'indice di rifrazione non ci sono limiti imposti da regolamenti ufficiali, da studi in letteratura viene riportato che il range di riferimento per il latte vaccino genuino è 1,3449 – 1,3480 [31].

Per verificare che i valori medi ottenuti siano o non siano significativamente differenti viene utilizzato il metodo statistico t test:

La statistica t viene calcolata con la seguente **Equazione 7.1**:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \qquad \textbf{(Eq.7.1)}$$

Se $p < 0.05$, la differenza fra le due medie è statisticamente significativa, se si decide di impostare il 5% come possibilità di commettere un errore di tipo 1 (falso positivo). Quindi se $p < 0.05$, c'è una probabilità del 5% o inferiore che la differenza fra i due gruppi sia causale.

L'indice di rifrazione medio dei campioni primaverili (1,34651 ± 0,00241) è risultato significativamente superiore rispetto a quello dei campioni invernali (1,34284 ± 0,00128). Il confronto mediante Welch's t-test per campioni indipendenti ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le due stagioni ($t = -7,65$; $p < 0,001$).

7.1.2 Valori di pH

Un ulteriore parametro chimico per garantire la freschezza della materia prima e l'idoneità a successive trasformazioni. I valori idonei per un campione di latte fresco varia fra i 6.5 e 6.8, deviazioni da questo range possono significare una non idoneità di quel campione di latte nella filiera produttiva di formaggi e gorgonzola. Infatti, la coagulazione del latte attraverso il caglio dipende dal pH del campione in questione, se troppo alcalino e se troppo acido le condizioni non permettono una corretta precipitazione delle proteine, portando ad una consistenza non adatta della cagliata, compromettendo la qualità del formaggio e la stagionatura.

Le motivazioni che portano ad un pH fuori dai valori richiesti possono essere una salute non ottimale dell'animale, oppure un metodo errato di conservazione, dove i batteri proliferano convertendo il lattosio in acido lattico e abbassando il pH.

In **Tabella 7.3** sono riportati i valori medi di pH su tutti i campioni suddivisi nei due periodi di campionamento.

Tabella 7.3: valori medi di pH e rispettiva deviazione standard dei campioni di latte separati per periodi di campionamento.

Periodi	pH
Inverno	6.593 ± 0.084
Primavera	6.535 ± 0.074

I valori medi concordano con i dati riportati da numerosi studi su questa matrice [32] e non si osserva una differenza pronunciata fra i due periodi di campionamento, confermando la freschezza e idoneità del latte a successive trasformazioni. Il pH medio dei campioni invernali (6.593 ± 0.084) è risultato significativamente superiore a quello dei campioni primaverili (6.535 ± 0.074), come evidenziato dal Welch's t-test per campioni indipendenti ($t = 2.75$, $p = 0.008$). Per valutare l'effetto

della stagione sui valori di pH dei campioni di latte, tenendo conto della variabilità associata alla provenienza dei campioni, è stato applicato un modello lineare a effetti misti. La stagione (inverno vs primavera) è stata considerata come effetto fisso, mentre la stalla di provenienza è stata inclusa nel modello come effetto casuale. Tale approccio è stato scelto in quanto il dataset presentava una struttura sbilanciata, con un numero differente di campioni per stalla e per stagione.

Il modello ha evidenziato un effetto significativo della stagione sul pH. In particolare, i campioni primaverili hanno mostrato valori di pH mediamente inferiori rispetto ai campioni invernali, con una differenza stimata pari a 0,057 unità di pH ($\beta = -0{,}057$; IC95%: $-0{,}097 – -0{,}017$; $p = 0{,}005$). Il pH medio stimato per i campioni invernali è risultato pari a 6,592, mentre quello dei campioni primaverili è risultato pari a circa 6,535. La varianza attribuibile all'effetto casuale della stalla è risultata prossima a zero, suggerendo che, nel presente dataset, la variabilità tra stalle contribuisce in misura limitata alla variabilità complessiva del pH rispetto all'effetto stagionale.

7.1.3 Contenuto di Lattosio

Il contenuto di lattosio nel latte è anch'esso un parametro indispensabile per verificare la conformità legale di un campione, controllare la qualità e verificare alterazioni o frodi. L'aggiunta fraudolenta di acqua è una delle più comuni e va a ridurre la concentrazione di solidi solubili, fra cui il lattosio, per questo motivo è importante determinare con certezza la sua concentrazione.

Come tecnica analitica per la sua determinazione in questo studio è stata usata la polarimetria.

Di seguito, in **Tabella 7.4** è riportato il valor medio sui campioni di latte suddivisi nei 2 periodi di campionamento.

Tabella 7.4: valori medi di contenuto di lattosio e rispettiva deviazione standard dei campioni di latte separati per periodi di campionamento.

Periodi	Lattosio %
Inverno	5.1±0.6
Primavera	5.2±0.7

I valori medi concordano con quelli di riferimento [33] e non si nota una differenza significativa fra i 2 periodi di campionamento.

7.1.4 Analisi del contenuto elementare CHNS

Nei campioni di latte liofilizzato si è proceduto a determinare il contenuto di idrogeno (H), carbonio (C), azoto (N) e zolfo (S). Determinare il contenuto elementare di un campione alimentare è importante al fine caratterizzare una materia prima che fa parte di una filiera produttiva, controllarne la qualità, eseguire una caratterizzazione nutrizionale e verificare la sicurezza del campione in esame.

I risultati dell'analisi elementare presentano differenze fra i campioni liofilizzati di latte intero e di latte scremato, ai quali è stata rimossa la frazione grassa tramite centrifugazione, presentano sostanziali differenze nella concentrazione di idrogeno, carbonio e azoto, mentre sono minimi i cambiamenti nel valore di zolfo.

Nella **Figura 7.1** sono riportate le % di azoto dei campioni interi e scremato, a loro volta divisi nei due periodi di campionamento primaverile e invernale. I campioni di latte intero hanno valori medi inferiori (inverno: 3.9 ± 0.3%, primavera: 4.0 ± 0.4%) rispetto ai campioni di latte scremato (inverno: 4.8 ± 0.7%, primavera: 5.4 ± 0.2%). Il valore riportato precedentemente è associato alla rispettiva deviazione standard.

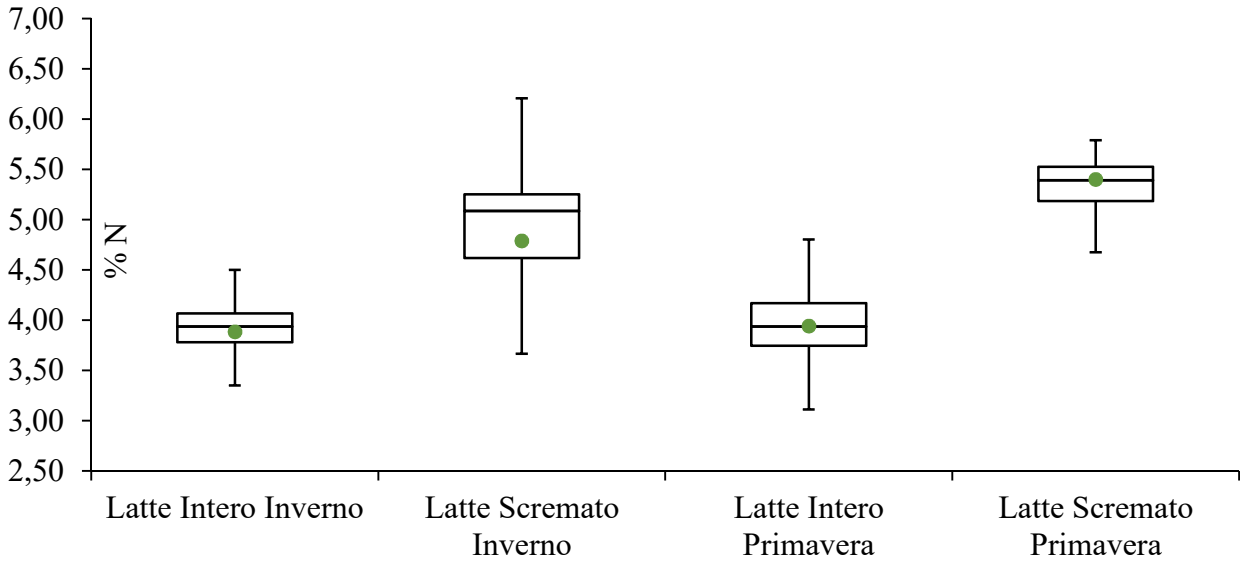


Figura 7.1: Distribuzioni boxplot del contenuto di azoto nei periodi invernali e primaverili per campioni di latti intero e scremato.

Per il latte intero, la stabilità è altissima. I valori intermedi (mediana e quartili) tra Inverno e Primavera sono pressoché sovrapponibili (mediana poco sotto il 4,0% N), anche se in primavera si osserva una dispersione leggermente maggiore nei valori. Mentre per il latte scremato si nota un incremento della mediana in Primavera (circa 5,4% N) rispetto all'Inverno (circa 5,1% N).

Il latte intero sia in inverno sia in primavera presenta la minore variabilità, scatole molto compatte e baffi stretti, indicando che il contenuto di azoto è molto omogeneo tra i campioni.

Il latte scremato invernale presenta la maggiore dispersione in assoluto, baffi da circa 3,7% a oltre 6,2% N. Inoltre, presenta un'asimmetria evidente: la mediana è spostata verso l'alto all'interno della scatola e il punto verde (media) è posizionato più in basso rispetto alla mediana, mentre il latte scremato primaverile mostra una variabilità contenuta rispetto all'inverno, con valori tutti concentrati nella fascia alta, tra 4,7% e 5,8% N.

Nella **Figura 7.2** sono riportate le % di carbonio dei campioni interi e scremati, a loro volta divisi nei due periodi di campionamento primaverile e invernale. I campioni di latte intero hanno valori medi inferiori (inverno: 43 ± 1%, primavera: 41 ± 0.9%) rispetto ai campioni di latte scremato (inverno: 51 ± 2%, primavera: 50 ± 2%). Il valore riportato precedentemente è associato alla rispettiva deviazione standard.

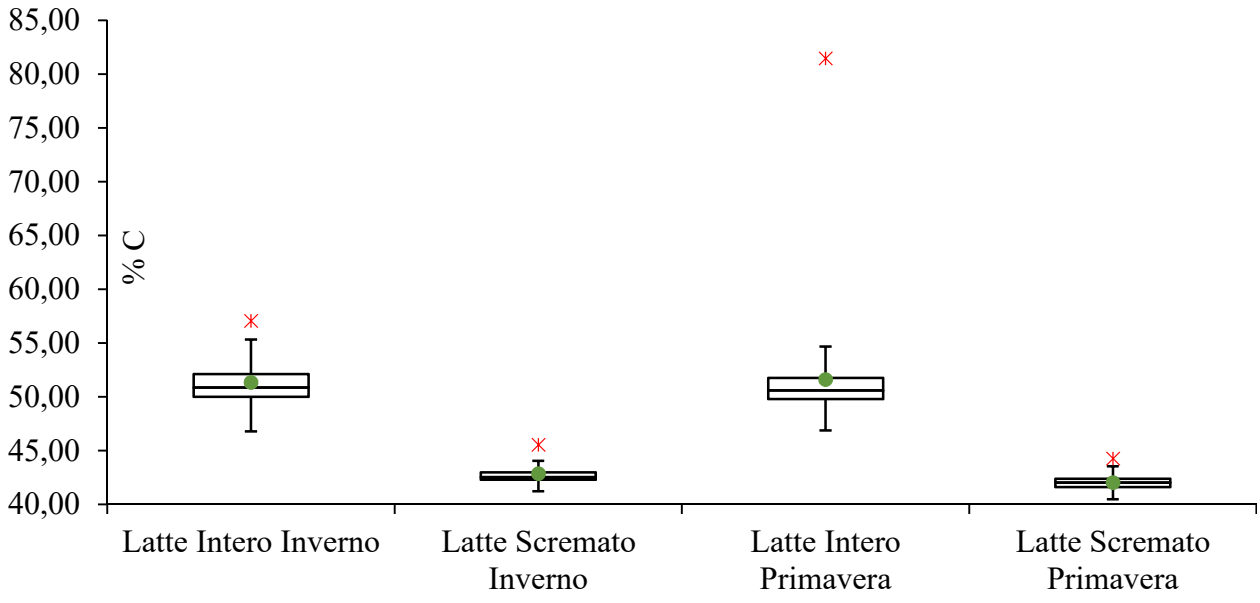


Figura 7.2: Distribuzioni boxplot del contenuto di carbonio nei periodi invernale e primaverili per campioni di latti intero e scremato.

Le distribuzioni complessive del latte intero, inverno e primavera e del latte scremato, inverno e primavera sono pressoché identiche tra le due stagioni. La stagione non altera significativamente

il contenuto medio o la variabilità standard di carbonio. I box sono molto stretti per tutti i gruppi, indicando una bassa variabilità della % C all'interno dello stesso tipo di latte. l dato più evidente è il valore anomalo nel Latte Intero Primavera, che raggiunge un picco di oltre l'81% C, imputabile a un potenziale errore di misurazione o contaminazione del campione.

Nella **Figura 7.3** sono riportate le % di idrogeno dei campioni interi e scremato, a loro volta divisi nei due periodi di campionamento primaverile e invernale. I campioni di latte intero hanno valori medi inferiori (inverno: 6.7 ± 0.3%, primavera: 6.6 ± 0.2%) rispetto ai campioni di latte scremato (inverno: 8.2 ± 0.3%, primavera: 8.1 ± 0.4%). Il valore riportato precedentemente è associato alla rispettiva deviazione standard.

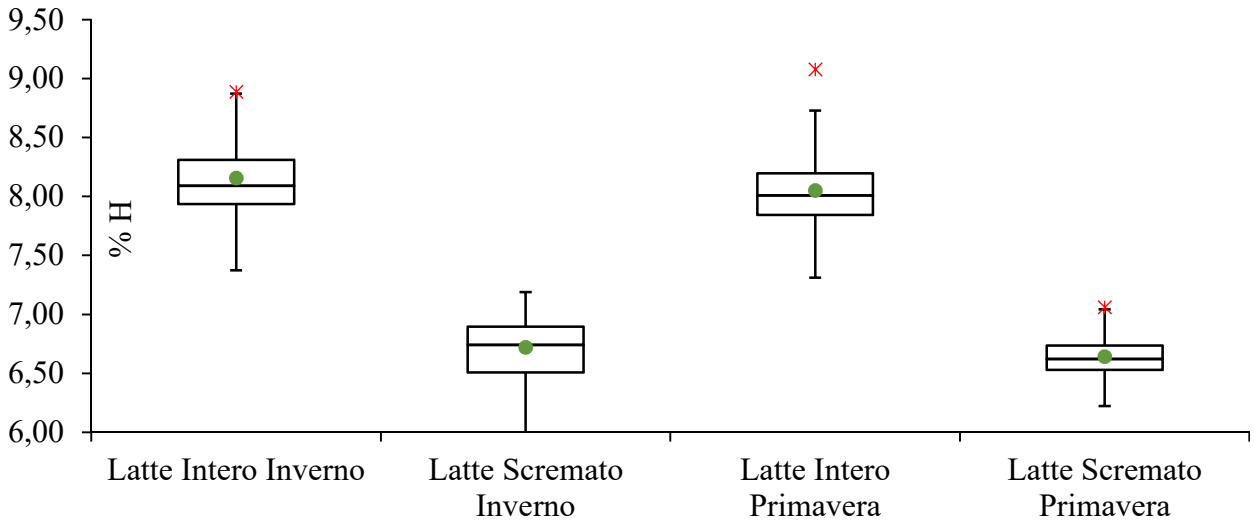


Figura 7.3: Distribuzioni boxplot del contenuto di idrogeno nei periodi invernali e primaverili per campioni di latti intero e siero.

Non si evidenziano variazioni significative tra inverno e primavera per nessuna delle due tipologie di latte, i box mostrano una dispersione limitata e una forma sostanzialmente simmetrica, la media rappresentata dal pallino verde e la mediana rappresentata dalla linea interna coincida quasi perfettamente.

Nella **Figura 7.4** sono riportate le % di zolfo dei campioni interi e scremato, a loro volta divisi nei due periodi di campionamento primaverile e invernale. I campioni di latte intero hanno valori medi inferiori (inverno: 0.11 ± 0.03%, primavera: 0.12 ± 0.03%) rispetto ai campioni di latte scremato (inverno: 0.15 ± 0.05%, primavera: 0.16 ± 0.05%). Il valore riportato precedentemente è associato alla rispettiva deviazione standard.

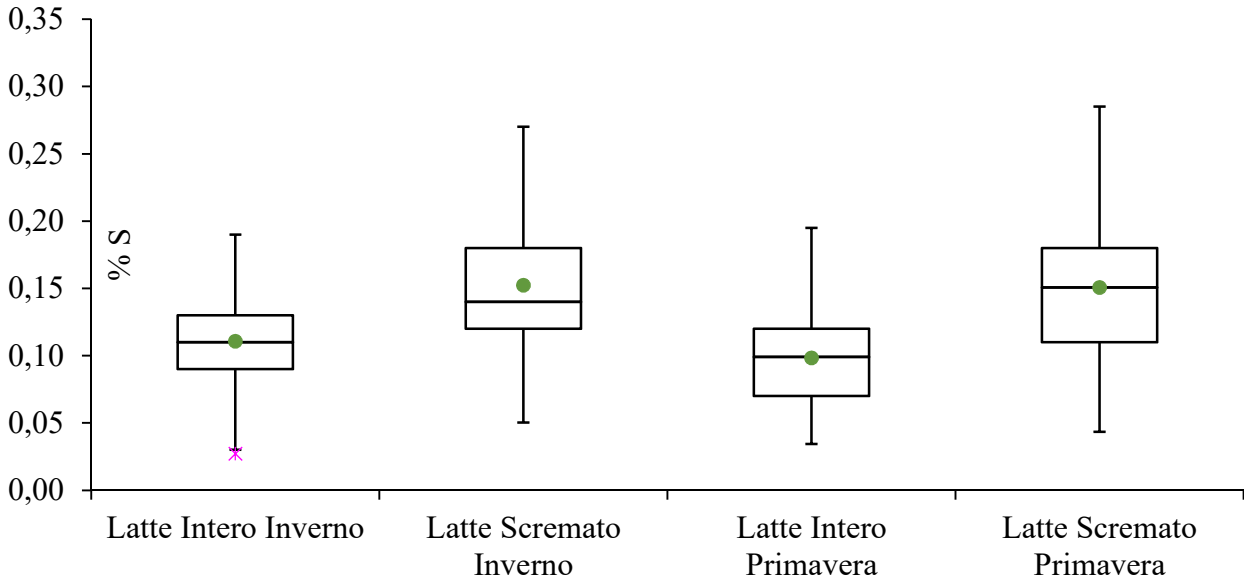


Figura 7.4: Distribuzioni boxplot del contenuto di zolfo nei periodi invernali e primaverili per campioni di latti intero e scremato.

Non si notano variazioni stagionali rilevanti per ciascuna matrice. Nel latte scremato le medie, pallini verdi, si collocano leggermente al di sopra delle mediane, segnalando un'asimmetria positiva, distribuzione con coda verso i valori alti, il latte scremato presenta anche una maggiore variabilità.

Le differenze fra campioni di latte scremato e intero possono essere attribuite alla rimozione della parte grassa tramite la centrifugazione. Mentre riguardo i periodi non vi sono differenze rilevanti fra il contenuto % di idrogeno, carbonio, azoto, zolfo.

7.2 Rapporto isotopico dell'ossigeno nell'acqua

La determinazione della composizione isotopica dell'ossigeno ($\delta^{18}O$) nell'acqua contenuta nelle matrici alimentari rappresenta uno strumento fondamentale per la tracciabilità geografica dei prodotti. Tale parametro è infatti strettamente correlato alle variabili climatiche caratteristiche della zona di origine. Poiché il fenomeno del frazionamento isotopico dell'ossigeno è un processo fortemente condizionato dalla temperatura, ogni area geografica impartisce all'alimento una specifica "impronta" di $\delta^{18}O$, definita dalla latitudine e dal clima regionale lungo l'intera filiera.

Le fonti di ossigeno in un animale e i suoi tessuti sono l'alimentazione e l'acqua destinata all'abbeveramento, nel caso specifico dell'ossigeno anche l'aria circostante [34]. $\delta^{18}O$ nell'acqua varia in modo prevedibile in base all'origine geografica, diminuendo dalle regioni costiere a bassa latitudine e bassa quota verso le regioni interne, ad alta latitudine e montane [35]. Il profilo isotopico del latte e dei suoi derivati è governato dal bilancio idrico dell'animale. L'acqua corporea della bovina deriva principalmente dall'acqua per l'abbeveramento, a cui si sommano l'acqua intrinseca dei foraggi e quella di origine metabolica. A causa dei processi di perdita idrica quali respirazione, traspirazione ed escrezione, l'acqua corporea presenta un valore medio di $\delta^{18}O$ leggermente più positivo, 3‰, rispetto all'acqua potabile assunta [36]. Sebbene fattori fisiologici e gestionali, come la razza, la stagione e la stabulazione, influiscano su questo equilibrio, il $\delta^{18}O$ della frazione acquosa del latte registra in modo fedele l'impronta isotopica del territorio di origine [37]. Un elemento determinante per la caratterizzazione geografica riguarda il tipo di alimentazione, l'uso di foraggio fresco arricchisce notevolmente il latte in $\delta^{18}O$ a causa dell'evapotraspirazione fogliare della pianta, rispetto all'impiego di diete secche o conservate [38].

Il principio analitico per la determinazione del $\delta^{18}O$, già trattato nel Capitolo 5, si basa sulla reazione di equilibrio e scambio isotopico tra l'ossigeno dell'acqua del campione e quello dell'anidride carbonica introdotta nello spazio di testa del vial. Affinché la misurazione del $\delta^{18}O$ risulti accurata, è necessario che il rapporto tra i coefficienti di attività dei due isotopi nella fase liquido-vapore rimanga costante e prossimo all'idealità (valore unitario). Tuttavia, nel caso di matrici complesse, le proprietà chimico-fisiche specifiche del campione possono alterare tale equilibrio ideale, introducendo scostamenti e potenziali errori nella quantificazione del $\delta^{18}O$ della frazione acquosa [39].

Si è proceduto all'analisi del $\delta^{18}O$ nella frazione acquosa dei campioni di latte fresco, sia intero, sia scremato. Non si sono notate differenze apprezzabili fra i campioni di latte intero e scremato, si è proceduto col riportare i risultati e la distribuzione dei soli campioni di latte intero.

Nella **Figura 7.5** viene riportato il valore di $\delta^{18}O$ nella frazione acquosa dei campioni di latte intero, in funzione della distribuzione dei campioni suddivisi nei mesi di campionamento, da dicembre a giugno si osserva un trend positivo nell'andamento dei valori di $\delta^{18}O$, in accordo con quelli delle precipitazioni di tali periodi durante l'anno solare e con studi presenti in letteratura [40] [41].

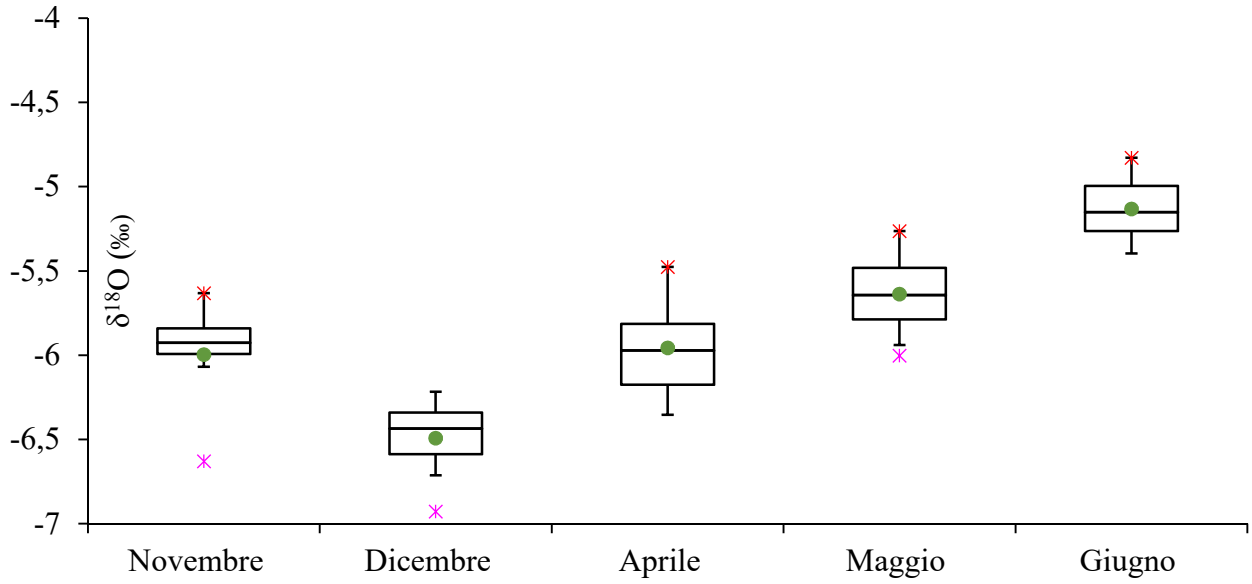


Figura 7.5: Distribuzione boxplot dei valori di $\delta^{18}O$ (‰) nella frazione acquosa dei campioni di latte suddivisi per mese di campionamento.

Il mese di dicembre presenta il valore mediano più basso dell'intero periodo. Nel periodo estivo a partire da aprile è presenta una crescita costante nei valori di $\delta^{18}O$.

I mesi di novembre e giugno mostrano scatole estremamente compatte, indicando una bassa variabilità tra i campioni analizzati in quei mesi. Nei mesi di dicembre, aprile e maggio, l'ampiezza delle scatole e la lunghezza dei baffi sono maggiori, evidenziando una maggiore eterogeneità nei valori isotopici dei campioni.

Nelle **Figure 7.6** e **7.7** sono riportati i valori di $\delta^{18}O$ delle precipitazioni nella zona europea nei mesi di novembre e maggio per comprenderne il cambiamento temporale.

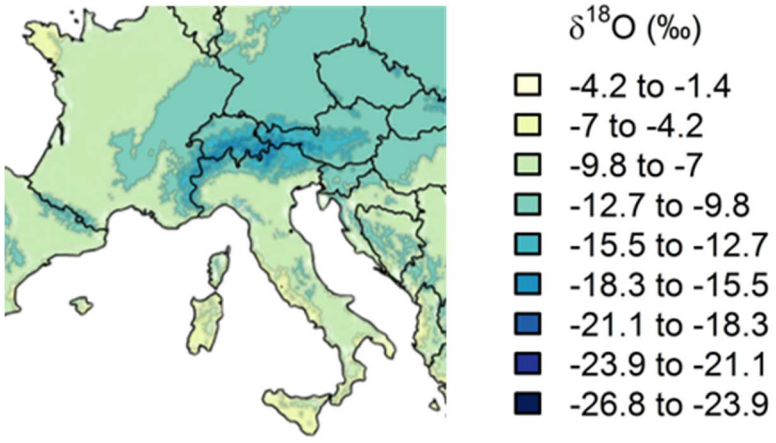


Figura 7.6: Mappa del rapporto isotopico $\delta^{18}O$ delle precipitazioni nella zona europea nel mese di novembre.

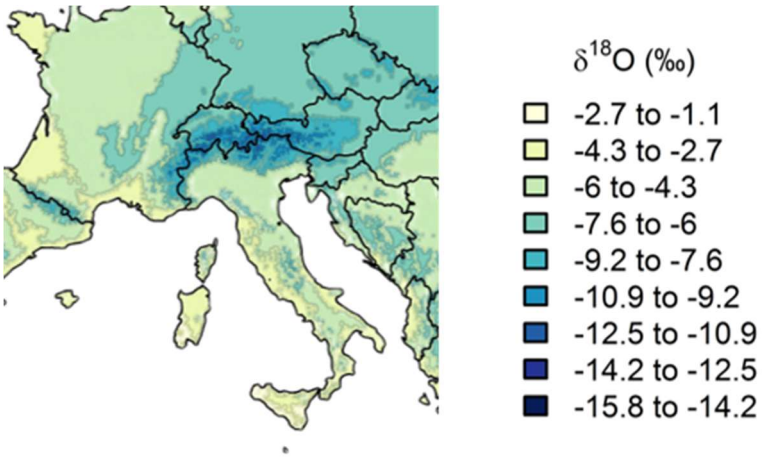


Figura 7.7: Mappa del rapporto isotopico $\delta^{18}O$ delle precipitazioni nella zona europea nel mese di maggio.

7.2.1 Accuratezza e precisione

L'accuratezza e la precisione intra-sessione del metodo sono state valutate attraverso la misura di un campione di acqua denominato "Standard neve" che non rientra tra gli standard primari certificati ma il cui $\delta^{18}O$ può essere considerato alla stregua di valor vero ($\delta^{18}O$ = -15.83 ± 0.x‰ V-SMOW), poiché il dato certificato è stato ottenuto mediante uno studio inter-laboratorio.

La **Figura 7.8** riporta i valori di $\delta^{18}O$ misurati sullo Standard neve in 9 determinazioni (stessa sessione di misura) e un intervallo di errore associati a quest'ultimo, quale l'intervallo di errore strumentale certificato dal costruttore pari a ± 0.20 ‰.

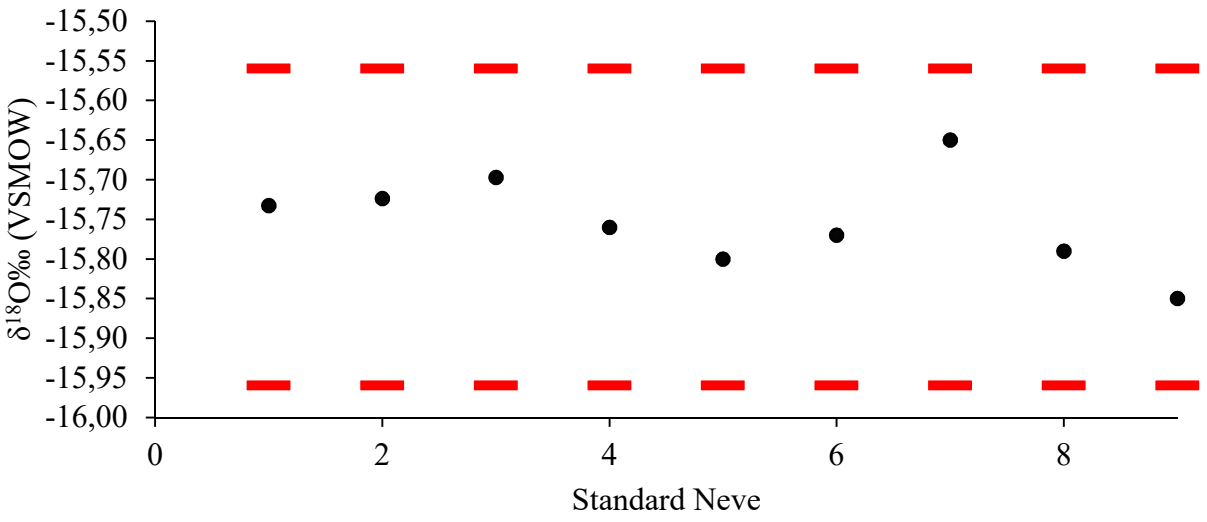


Figura 7.8: $\delta^{18}O$ dell'acqua misurati nello "Standard neve" con i relativi errori associati allo strumento, della sessione di misura del 13/07/2026. • $\delta^{18}O$ Standard neve; — — errore ± 0.20 ‰ rispetto al valore medio dei rapporti isotopici misurati.

La precisione inter-sessione viene valutata in seguito al confronto fra i valori di pendenza delle rette di taratura costruite per la determinazione del valore isotopico $\delta^{18}O$ dei campioni di latte. Oltre ad avere diverse rette fra sessioni diverse, si è ritenuto opportuno costruire più rette di taratura anche all'interno della stessa sessione per compensare i drift strumentali che si possono verificare durante una sessione di misura.

Tabella 7.5: parametri delle regressioni effettuate con standard primari e secondari relativi alle diverse rette di taratura suddivisi per sessione di misura.

Sessione di misura	Numero retta nella sessione	Pendenza	Intercetta	R^2
19/03/2026	C1	0,954526	-10,6571	0,999
	C2	0,97507	-10,4628	0,9995
04/05/2026	C1	0,964711	-10,368	0,9995
27/05/2026	C1	0,979115	-10,1021	0,9999
	C2	0,983284	-10,1531	0,9999
08/07/2026	C1	1,005632	-10,2825	0,9999
	C2	0,9997	-10,4703	0,9999
	C3	1,007557	-10,4837	0,9999
13/07/2026	C1	0,998602	-10,3331	0,9999
	C2	0,9997	-10,369	0,9999
	C3	1,0004	-10,4483	0,9999

Sulla base delle indicazioni ricevute dal costruttore, le calibrazioni, per poter essere considerate affidabili, devono avere una pendenza pari a 1 ± 5%. Confrontando i parametri di regressione delle diverse rette, riportati in **Tabella 7.5**, si nota che le pendenze rientrano all'interno dell'intervallo e ciò va ad indicare la buona accuratezza della risposta strumentale.

7.3 Caratterizzazione qualitativa del profilo volatile mediante HS-SPME-GC/MS

La caratterizzazione qualitativa del profilo volatile viene effettuata su tutta la filiera, e su tutti i campioni a disposizione: campioni di latte, formaggio fresco e gorgonzola, tal quali. Nel caso specifico del latte non è stata effettuata una determinazione sui campioni liofilizzati in quanto i livelli di composti volatili sono molto bassi [42].

Sulla base degli elevati valori del potenziale aromatico, il 2-nonanone, l'1-octen-3-olo, il 2-eptanolo, l'esanoato di etile, il metilanisolo e il 2-eptanone sono risultati essere i composti odorosi più importanti nell'aroma del Gorgonzola naturale e cremoso [43].

La **Figura 7.9** riporta i cromatogrammi ottenuti con la tecnica HS-SPME-GC/MSq rispettivamente di un campione di latte, un campione di formaggio fresco e un campione di gorgonzola idoneo e non idoneo.

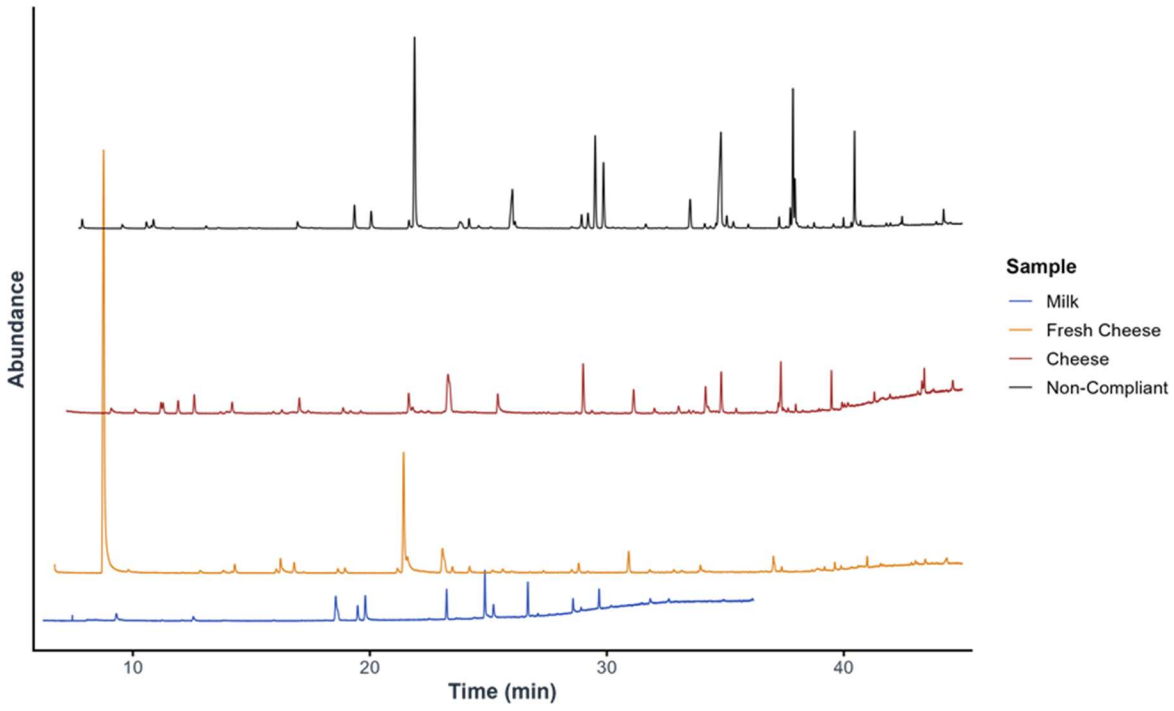


Figura 7.9: cromatogrammi ottenuti su campioni di latte, formaggio fresco, gorgonzola e un campione di gorgonzola non idoneo. In blu è riportato un cromatogramma di un campione di latte, in giallo il cromatogramma di un campione di formaggio fresco, in rosso il cromatogramma di un campione di gorgonzola e in nero il cromatogramma di un campione di gorgonzola "non idoneo".

Per poter comprendere il profilo di un campione di latte e/o formaggio bisogna fare considerazioni su come i composti che osserviamo sono stati prodotti e da dove provengono. La serie di eventi che si può verificare prima e durante la produzione del latte influenza il profilo aromatico di un prodotto lattiero-caseario, la loro natura può essere chimica, fisica, fisiologica o psicologica, e si vanno a manifestare attraverso composti chimici. I fattori principali da prendere in considerazione sono gli effetti dell'alimentazione, degli inquinanti e degli agenti tossici sul latte. Un fattore rilevante è la fisiologia della specie animale, che si riflette sulla composizione del relativo latte e diventa ancor più rilevante in prodotti lattiero-caseari derivanti come il formaggio.

I composti volatili responsabili dell'aroma e del gusto nei prodotti lattiero-caseari derivano dalla degradazione delle componenti principali del latte: lattosio, citrato, lipidi e proteine, in particolare le caseine. I parametri fisico-chimici prescritti durante la fase di produzione, quali il trattamento termico, il pH, la concentrazione salina e la temperatura di maturazione, determinano il corretto bilanciamento delle trasformazioni biochimiche. Qualsiasi deviazione da tali parametri ottimali può compromettere la qualità del prodotto finale, conducendo all'insorgenza di difetti reologici, strutturali o aromatici. La degradazione delle matrici del latte durante il processo produttivo avviene attraverso una sequenza coordinata di reazioni chimiche ed enzimatiche. Nello specifico, i processi e le vie metaboliche responsabili del profilo organolettico del latte e dei suoi derivati possono essere schematizzati in tre macro-categorie principali [44]:

1. Ossidazione degli acidi grassi;
2. Trasformazioni indotte da processi tecnologici;
3. Processi fermentativi ad opera dei batteri lattici.

7.3.1. Acidi grassi

Gli acidi grassi contribuiscono in modo determinante al profilo aromatico caratteristico di numerose tipologie di formaggio europei. Nei formaggi erborinati il corredo enzimatico espresso da *Penicillium roqueforti* è il principale responsabile dell'elevato rilascio di acidi grassi. Questa imponente attività lipolitica maschera completamente l'eventuale azione selettiva di altre lipasi, sia per quanto riguarda la liberazione dell'acido butirrico, sia nella fornitura dei precursori destinati alla successiva conversione in metilchetoni [45].

L'auto-ossidazione dei grassi nel latte e nei prodotti lattiero-caseari si verifica inizialmente nella frazione dei fosfolipidi polinsaturi della membrana dei globuli di grasso del latte, seguita dalla frazione principale dei trigliceridi. È stato riportato che diversi tipi di latte variano ampiamente nella loro suscettibilità all'ossidazione. A differenza del latte, nei prodotti a base di latte in polvere è la frazione dei trigliceridi ad essere più suscettibile all'ossidazione, mentre i fosfolipidi agiscono come antiossidanti [46]. Da ciò si deduce che la suscettibilità dei fosfolipidi del latte all'ossidazione dipende dal fatto che essi siano sospesi in acqua o in una fase grassa continua. Questa differenza nella stabilità ossidativa influenza lo sviluppo di diversi composti aromatici o di difetti di sapore nei vari prodotti lattiero-caseari. Alcuni di questi prodotti di ossidazione possono essere percepiti a concentrazioni eccezionalmente basse, causando così anomalie del sapore descritte come grasso, fritto, plastica, pesce, metallico o cartone. Lo sviluppo di questi difetti aromatici può causare problemi nel latte, nel latticello da panna acida, nella panna, nel burro, nell'olio di burro, in un'ampia varietà di latti in polvere, nei formaggi e nei prodotti a base di caseina e proteine del siero. Di seguito sono elencati alcuni composti volatili prodotti dall'auto-ossidazione di specifici acidi grassi insaturi:

- Acido oleico: Ottanale, nonanale, decanale, 2-decenale, 2-undecenale.
- Acido linoleico: Esanale, 2-ottenale, 3-nonenale, 2,4-decadienale.
- Acido linolenico: Propanale, 3-esenale, 2,4-eptadienale, 3,6-nonadienale, 2,4,7-decatrienale.

Analogamente a quanto si osserva nelle matrici alimentari ad elevato tenore lipidico, la frazione grassa dei prodotti lattiero-caseari è soggetta a processi di degradazione sia di natura enzimatica, tramite idrolisi catalizzata da lipasi ed esterasi, sia di natura chimica attraverso l'ossidazione La trasformazione biochimica primaria riguarda l'idrolisi dei trigliceridi, molecole che costituiscono oltre il 98% del grasso totale nel latte; questo catabolismo porta alla progressiva liberazione di acidi grassi liberi (FFA), digliceridi, monogliceridi e, in fase terminale, glicerolo. La frazione di acidi grassi liberi riveste un ruolo di primaria importanza nella caratterizzazione dell'aroma del formaggio. In particolare, i composti a catena corta e media, compresi tra C4:0 e C12:0, forniscono un apporto sensoriale diretto esprimendo note organolettiche peculiari che spaziano dal pungente al caprino, fino a sentori di sapone, noce di cocco o sfumature di irrancidito.

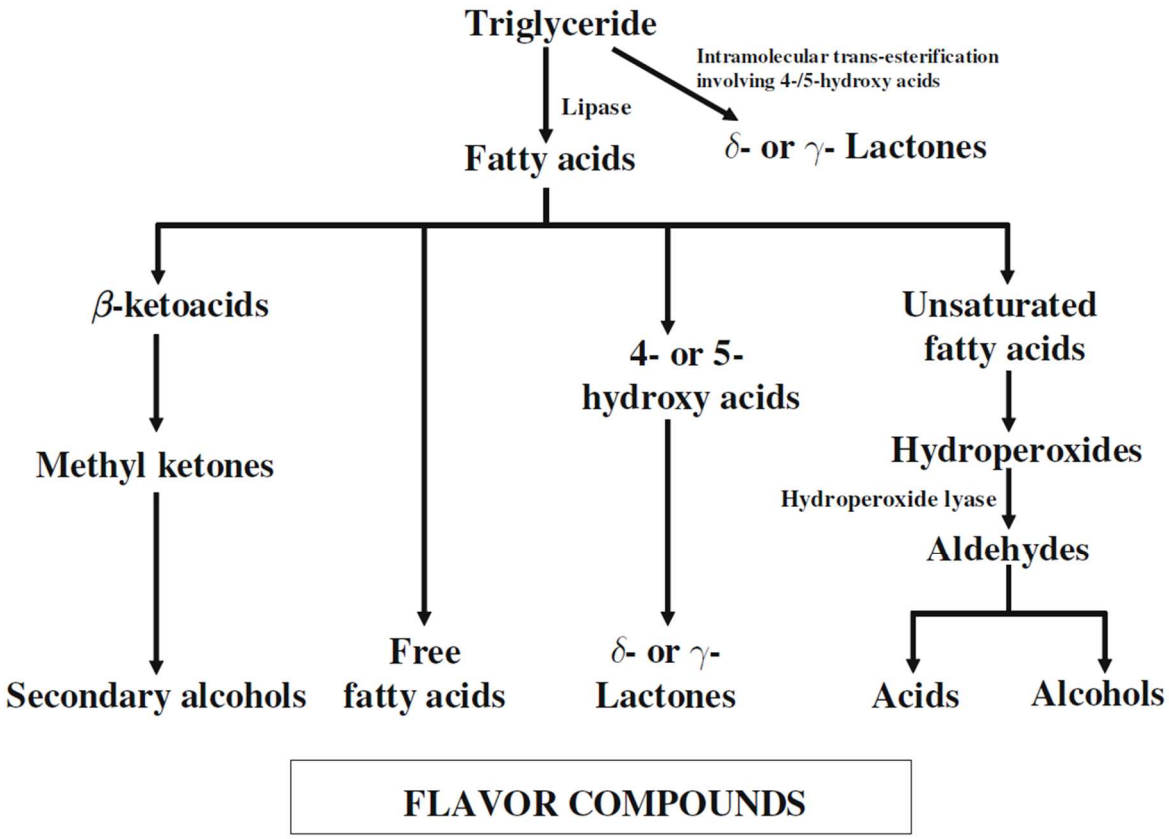


Figura 7.10: Vie generali per il metabolismo dei trigliceridi e degli acidi grassi del latte (riprodotto con il permesso di Singh et al., 2003; © Blackwell Publishing, Inc.).

• **Acido butanoico**: anche noto come acido butirrico, è un acido grasso a catena corta C4, si forma durante la maturazione in seguito all'idrolisi dei trigliceridi a opera dell'enzima lipasi. È una molecola a basso peso molecolare. Allo stato puro o in alte concentrazioni ha un odore tipicamente acre, penetrante e associato al burro rancido. Subisce ulteriori trasformazioni enzimatiche, beta-ossidazione, che portano alla formazione di metilchetoni.

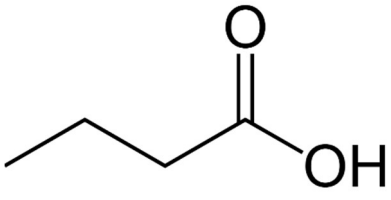


Figura 7.11: Struttura molecolare dell'acido butanoico.

• **Acido isovalerico**: **è** acido grasso a catena corta, viene prodotto in seguito a processi di proteolisi, dove le proteine del latte sono demolite liberando aminoacidi liberi, in seguito l'acido

isovalerico si origina dal catabolismo della leucina attraverso reazioni di transaminazione e decarbossilazione.

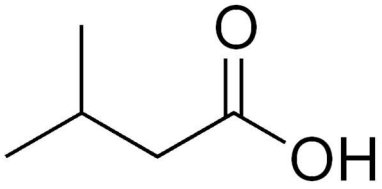


Figura 7.12: Struttura molecolare dell'acido isovalerico.

- **Acido esanoico**: è acido grasso C6, ha un odore penetrante, rancido e "caprino", all'interno del bouquet del Gorgonzola l'acido esanoico contribuisce in modo fondamentale alla tipica nota piccante e sapida. Subisce ulteriori trasformazioni chimiche ed enzimatiche che portano alla formazione di esteri.

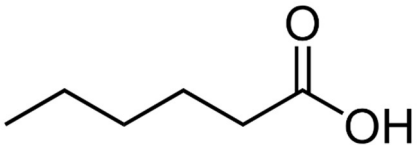


Figura 7.13: Struttura molecolare dell'acido esanoico.

Altri acidi grassi presenti: Acido ottanoico, acido decanoico.

7.3.2. Chetoni

È ampiamente riconosciuto che metil chetoni sono composti fondamentali nell'aroma dei formaggi erborinati [42]. Sono il risultato dell'attività di diversi enzimi contenuti nella muffa (*Penicillium roqueforti*). I metil chetoni sono formati dall'azione di questi tramite β-ossidazione (degradazione ossidativa) e decarbossilazione degli acidi grassi rilasciati dalla lipasi, la velocità con cui vengono rilasciati può incidere sulla produzione dei metil chetoni, uno schema che riporta il meccanismo della loro produzione è riportato in **Figura 7.14**.

I metil chetoni più abbondanti che si formano durante la maturazione sono: 2-eptanone, 2-nonanone, 2-pentanone, 2-undecanone.

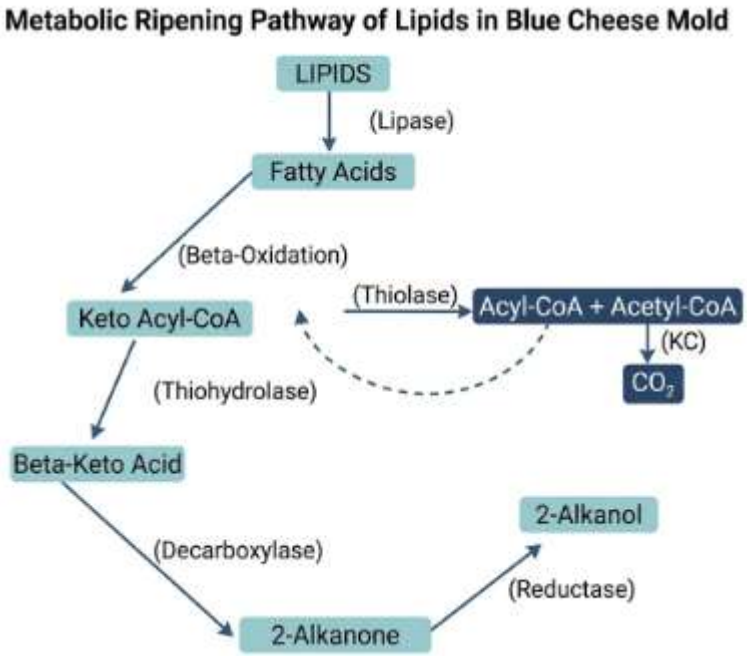


Figura 7.14: Schema generale che illustra il metabolismo degli acidi grassi da parte di *Penicillium roqueforti* durante la maturazione del formaggio erborinato. Il gruppo acilico può contenere da 4 a 16 atomi di carbonio. KC indica il ciclo di Krebs (o ciclo dell'acido citrico).

Come ultimo step si può osservare dalla **Figura 7.14** che i metil chetoni vengono ridotti ad alcol secondari, la maggior parte di loro non contribuisce significativamente agli aromi classici di un formaggio.

- **Acetone**: L'acetone è il chetone più semplice. Nei formaggi erborinati viene prodotto in piccole quantità come sottoprodotto metabolico secondario della degradazione degli acidi grassi o degli aminoacidi.
- **2-butanone, 2-pentanone**: sono dei composti aromatici naturalmente presenti nel gorgonzola, sono i metilchetoni che si sviluppano naturalmente durante la maturazione del formaggio dalla conversione dei rispettivi acidi grassi. Sono alcuni dei composti che contribuiscono al tipico odore pungente dei formaggi erborinati, all'interno del gorgonzola sono presenti in quantità inferiori rispetto ad altri chetoni più abbondanti, (es. 2-eptanone, 2-nonanone) ma contribuiscono comunque alla complessità del suo sapore [47].

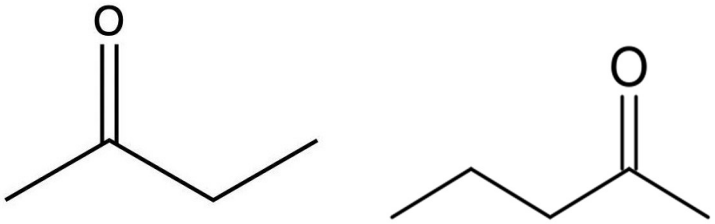


Figura 7.15: Struttura molecolare del 2-butanone, 2-pentanone.

- **2,3-pentanedione**: si forma durante i processi di fermentazione del latte ad opera dei batteri lattici e delle muffe (come il *Penicillium*) coinvolti nella maturazione del formaggio. Il 2,3-pentanedione è anche un componente comune degli aromi sintetici e viene utilizzato per conferire un aroma di burro, fragola, caramello, frutta, rum o formaggio a bevande, gelati, caramelle, prodotti da forno, gelatine e budini. È presente anche in natura come prodotto di fermentazione nella birra, nel vino e nello yogurt e viene rilasciato durante la tostatura dei chicchi di caffè.

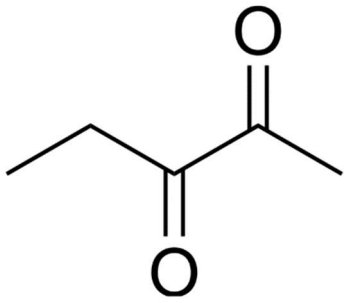


Figura 7.16: Struttura molecolare del 2,3-pentandione.

- **3-idrossi-2-butanone**: Il 3-idrossi-2-butanone è un composto organico volatile che nel gorgonzola e in altri formaggi contribuisce a definire il caratteristico aroma di burro e crema. Si forma grazie all'attività dei batteri lattici (come i lattococchi) presenti nei fermenti o nel latte, attraverso il metabolismo del lattosio e dei citrati, oppure tramite la riduzione del diacetile [48].

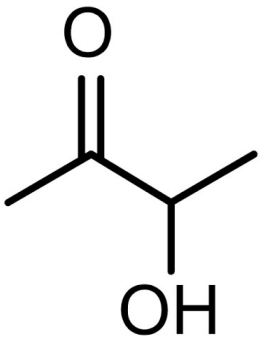


Figura 7.17: Struttura molecolare del 3-idrossi-2-butanone.

- **2-eptanone, 2-nonanone**: loro sono i due chetoni maggiormente responsabili del tipico aroma pungente, piccante e "fiorito" del gorgonzola. Presenti nel gorgonzola in seguito ai processi di maturazione dati dalle muffe precedentemente descritti.

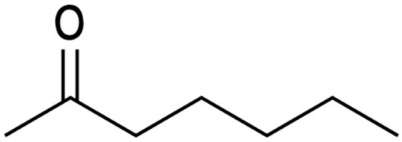


Figura 7.18: Struttura molecolare del 2-eptanone**.**

- **Altri chetoni presenti:** ulteriori metil chetoni che contribuiscono al profilo aromatico sono: 8-nonen-2-one, 2-ottanone, 3-ottanone, 2-undecanone.

7.3.3. Composti solforati

I composti solforati contribuiscono anch'essi all'aroma di un formaggio. I composti volatili contenenti zolfo svolgono un ruolo primario nella definizione del profilo sensoriale di numerose tipologie di formaggio, fornendo note aromatiche caratteristiche e complesse. La loro formazione deriva principalmente dal catabolismo degli amminoacidi solforati, in particolare la metionina e la cisteina. Una delle vie metaboliche principali coinvolge la conversione della metionina in 3-(metiltio)propanale (metionale) attraverso meccanismi di deaminazione e decarbossilazione. La successiva degradazione del metionale porta alla liberazione di molecole a basso peso molecolare estremamente impattanti, quali il metantiolo (CH_3SH), il dimetil solfuro $(CH_3)_2S$ e il dimetil disolfuro (CH_3SSCH_3). Tra questi, il metantiolo è ampiamente riconosciuto come un componente chiave dell'aroma. Nei formaggi a pasta dura, la sua formazione avviene prevalentemente per via

non enzimatica, favorita dall'azione di agenti riducenti endogeni (quali cisteina e glutatione) e dal basso potenziale di ossidoriduzione instaurato dall'attività dei batteri lattici. Diversamente, nei formaggi a crosta fiorita o lavata (es. *Camembert, Stilton, Roquefort*), microrganismi della microflora superficiale quali *Brevibacterium linens* sono in grado di produrre elevati livelli di metantiolo mediante specifiche vie enzimatiche. Inoltre, la reattività del metantiolo e della formaldeide nel terreno caseario può condurre alla sintesi del 2,4-tiapentano (dimetil tioacetale), isolato in matrici quali Gouda e Camembert. Dal punto di vista della chimica delle reazioni secondarie, i composti solforati interagiscono attivamente con le molecole carboniliche derivanti dalla perossidazione lipidica. L'addizione nucleofila del metantiolo ad aldeidi α,β-insature (es. but-2-enale) porta alla formazione di tioeteri volatili capaci di modulare e attenuare i difetti di ossidazione, contribuendo contemporaneamente allo sviluppo del profilo aromatico caratteristico del formaggio. Va tuttavia evidenziato che processi degradativi incontrollati, indotti da fenomeni di foto-ossidazione o radiazioni UV, possono condurre a un'eccessiva accumulazione di tali molecole solforate, traducendosi in difetti organolettici descritti come note di "cavolo" o "strinato".

Molti composti dello zolfo, come H_2S, il 3-mercaptopropanolo e il 2-metiltiofene, possono derivare dalla degradazione della vitamina B1 (tiamina) [49].

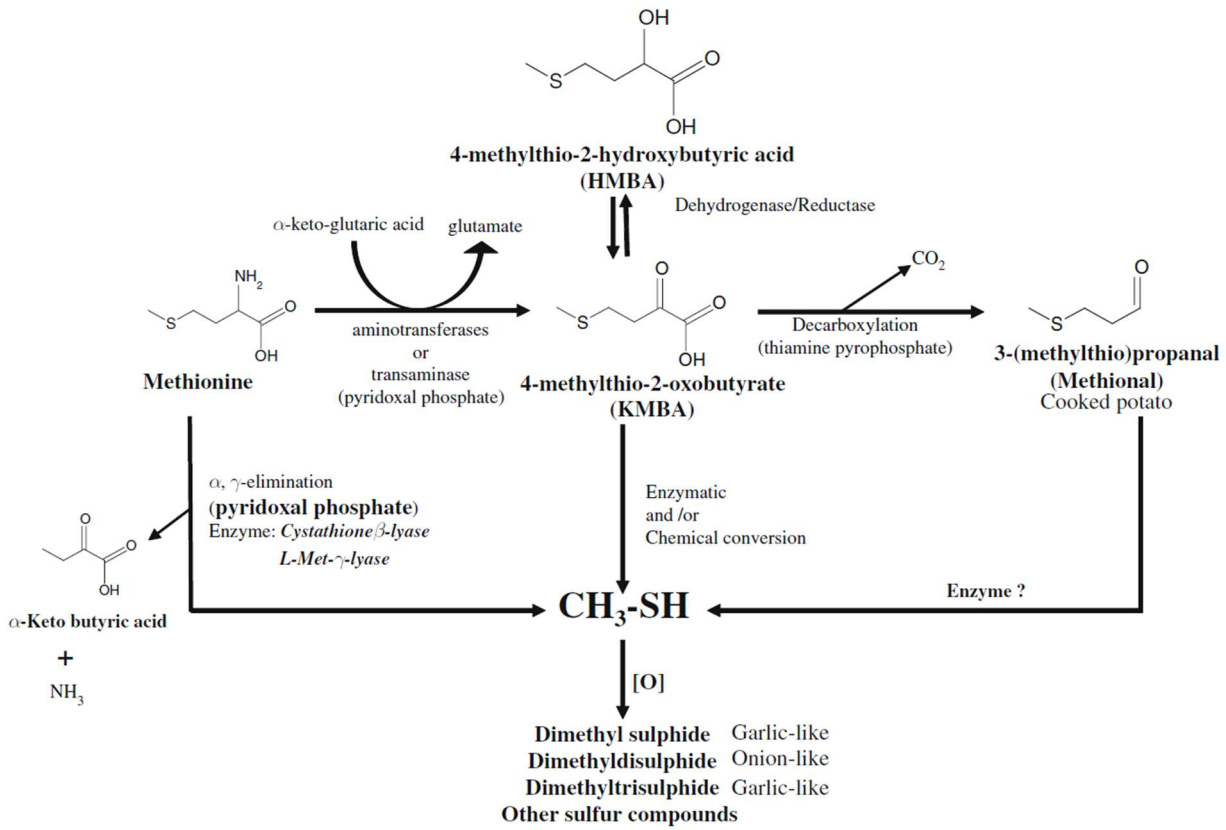


Figura 7.19: Degradazione della metionina in potenti sostanze odorose contenenti zolfo (riprodotto con il permesso di Singh et al., 2003; © Blackwell Publishing, Inc.).

Composti presenti:

- **Metantiolo**: Il metantiolo (o metilmercaptano) è uno dei principali composti aromatici volatili responsabili del tipico odore pungente del formaggio Gorgonzola. Si tratta di un composto organosolforato con formula chimica CH_3SH. È stato rilevato in un campione di gorgonzola "non idoneo". In campioni idonei non è presente in quantità identificabili. Si forma come descritto precedentemente dalla degradazione della metionina. La sua eccessiva concentrazione nel caso del campione non idoneo porta a note sgradevoli ed eccessivamente pungenti [50]. Il metantiolo viene facilmente ossidato a dimetil solfuro e dimetil trisolfuro [51].

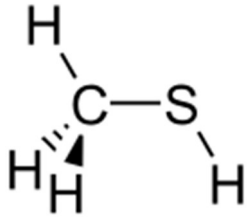


Figura 7.20: Struttura molecolare del metantiolo.

- **Dimetil solfuro**: anche lui come gli altri composti volatili dello zolfo si formano durante la maturazione del formaggio, non rilevato in campioni idonei, è unicamente presente nel campione non idoneo. Deriva dalla degradazione della metionina ad opera dei ceppi di muffa impiegati nella produzione. In concentrazioni minime può contribuire a definire una nota aromatica complessa nel formaggio, ma un'eccessiva concentrazione porta a odori sgradevoli.

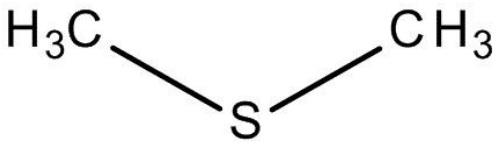


Figura 7.21: Struttura molecolare del dimetilsolfuro.

- **Dimetil trisolfuro**: spesso derivato del metantiolo, ha un odore sulfureo molto forte, comparabile a quello di aglio, cavolo e cipolla. Anche in tracce è facilmente avvertibile dall'olfatto umano. In presenza ridotta, unito ai composti che contribuiscono all'aroma del gorgonzola, porta insieme a loro alle tipiche note di formaggio maturo che si ricercano, ma in quantità superiori porta a odori sgraditi. Rilevato unicamente nel campione non idoneo.



Figura 7.22: Struttura molecolare del dimetil trisolfuro.

- **Dimetil sulfone**: rilevato in campioni di latte, formaggio fresco e gorgonzola. La sua presenza nel latte è riconducibile al fatto che viene naturalmente secreto da parte delle mucche, di conseguenza risulta essere presente nei campioni di formaggio fresco e gorgonzola. Contribuisce al caratteristico profilo olfattivo e al sapore pungente di formaggi maturi ed erborinati.

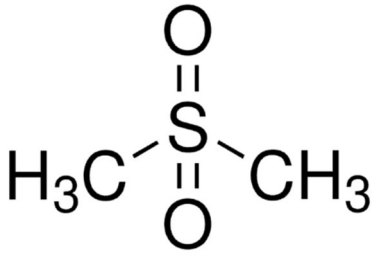


Figura 7.23: Struttura molecolare del dimetil sulfone.

- **Disolfuro di carbonio**: è un composto appartenente ai composti solforati volatili (VSC), una sottocategoria dei VOC (composti organici volatili), ed è naturalmente presente in tracce come componente dell'aroma del formaggio Gorgonzola. Si sviluppa principalmente durante la maturazione e la lipolisi/proteolisi del formaggio, influenzata dal metabolismo del *Penicillium roqueforti* e dai batteri lattici. Spesso deriva dalla degradazione degli amminoacidi solforati, come la metionina, o direttamente dall'alimentazione delle vacche (foraggio) [42]. Presente nei campioni di gorgonzola idonei e non.



Figura 7.24: Struttura molecolare del disolfuro di carbonio.

7.3.4. Alcoli

- **Etanolo:** presente nei campioni di formaggio fresco e gorgonzola, si forma principalmente tramite processi metabolici e fermentativi svolti da microrganismi a partire dai carboidrati. Le vie principali sono la fermentazione del lattosio via eterofermentativa, durante la lavorazione del latte e la maturazione dei formaggi, alcuni batteri acido lattici (eterofermentativi) o lieviti metabolizzano il lattosio. Nella via dei fosfochetolasi, il piruvato o l'acetil-CoA derivati dal lattosio/glucosio vengono convertiti in acetaldeide e, successivamente, ridotti ad etanolo tramite l'azione dell'enzima alcol deidrogenasi per rigenerare il NAD^+. L'etanolo è un fattore limitante fondamentale per la sintesi degli esteri etilici (come l'etil butanato o l'etil esanato). Reagendo con gli acidi grassi liberi (tramite esterificazione o alcolisi catalizzata da esterasi), l'etanolo contribuisce alla formazione delle note aromatiche fruttate tipiche di molti formaggi.

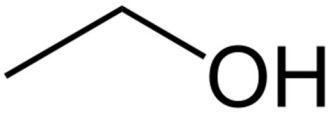


Figura 7.25: Struttura molecolare dell'etanolo.

- **Alcol Isopropilico:** nel gorgonzola è uno dei costituenti naturali del gorgonzola e del suo profilo aromatico, è un sottoprodotto naturale della proteolisi degli amminoacidi a catena ramificata (come valina, leucina e isoleucina) indotta da ceppi specifici della muffa *Penicillium roqueforti*. Presente unicamente nei campioni di gorgonzola.

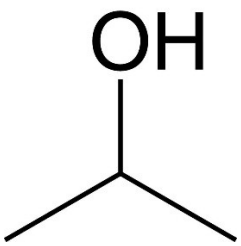


Figura 7.26: Struttura molecolare dell'alcol isopropilico.

- **1-propanolo**: isomero dell'alcol isopropilico, è anch'esso un componente naturale del gorgonzola generato durante la maturazione. Mentre l'alcol isopropilico deriva principalmente dal catabolismo degli amminoacidi ramificati, l'1-propanolo si forma solitamente nei formaggi erborinati attraverso metabolismi secondari legati alla fermentazione degli zuccheri residui (lattosio/galattosio) o da specifiche reazioni di riduzione delle aldeidi da parte della microflora batterica e fungina.

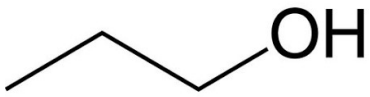


Figura 7.27: Struttura molecolare dell'1-propanolo.

- **2-eptanolo e 2-nonanolo**: Questi due alcoli derivano direttamente dal metabolismo lipidico operato dal fungo *Penicillium roqueforti* durante la stagionatura del formaggio. In condizioni di parziale anaerobiosi, all'interno delle venature blu del formaggio, i chetoni vengono ridotti enzimaticamente nei corrispondenti alcoli secondari: il 2-eptanolo e il 2-nonanolo.

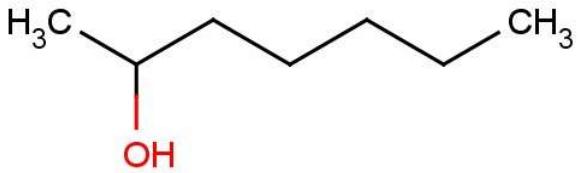


Figura 7.28: Struttura molecolare del 2-eptanolo.

- **Altri alcoli presenti:** 2-butanolo, 2-metil-1-propanolo, 1-butanolo, 2-pentanolo, 2-esanolo.

7.3.5 Esteri

- **Etilacetato**: estere, composto organico volatile presente nel profilo aromatico del gorgonzola e nei campioni di formaggio fresco, non presente nel latte, si forma durante la maturazione del formaggio attraverso la reazione di esterificazione tra l'etanolo, derivato dal metabolismo del lattosio o degli amminoacidi, e l'acido acetico, prodotto da batteri

lattici o da ceppi secondari. A basse concentrazioni, l'etilacetato apporta una nota dolce e fruttata che mitiga l'estrema pungenza dei metilchetoni.

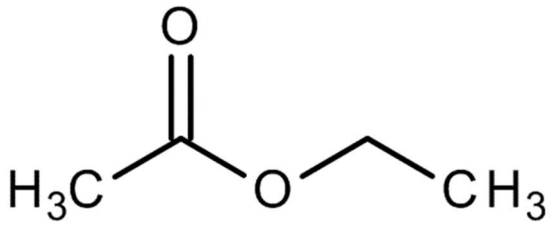


Figura 7.29: Struttura molecolare dell'etilacetato.

- **Butanoato di etile**: è un composto organico liquido e incolore con la formula chimica $C_6H_{12}O_2$ e un caratteristico odore fruttato che ricorda l'ananas. Si forma naturalmente durante il processo di stagionatura ed è il risultato dell'esterificazione, la reazione tra alcol etilico e acido butirrico, mediata dall'attività metabolica dei fermenti lattici e dello sviluppo delle muffe caratteristiche del genere *Penicillium roqueforti*.

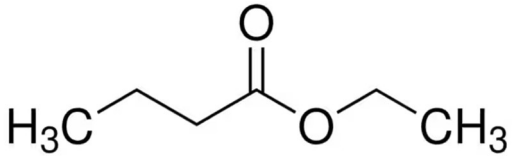


Figura 7.30: Struttura molecolare del butanoato di etile.

- **3-metil-1-butanolo acetato:** Il composto si forma principalmente durante il processo di maturazione del Gorgonzola attraverso due passaggi biochimici guidati dai microrganismi responsabili della fermentazione:
    1. Catabolismo della leucina;
    2. Esterificazione.

  L'acetato di isoamile ha un dolce odore di banana o pera matura, all'interno della complessa matrice del Gorgonzola non si percepisce singolarmente. Si unisce e bilancia le note forti, pungenti ed erbacee tipiche dei chetoni, come il 2-eptanone, il 2-nonanone e degli acidi grassi liberi, conferendo una sfumatura fruttata, dolce e rinfrescante.

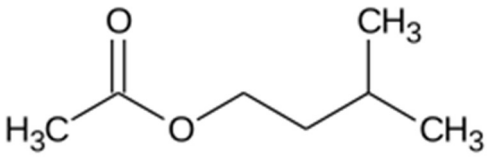


Figura 7.31: Struttura molecolare del 3-metil-1-butanolo acetato.

- **Esanoato di etile**: Si forma durante la maturazione del formaggio attraverso l'esterificazione dell'etanolo con l'acido esanoico, il processo è fortemente influenzato dall'attività metabolica delle muffe e dei batteri lattici. È tipicamente associato a note dolci e fruttate, che ricordano la mela verde o l'ananas, nel Gorgonzola contribuisce a bilanciare la forte pungenza tipica dei chetoni e degli acidi grassi liberi.

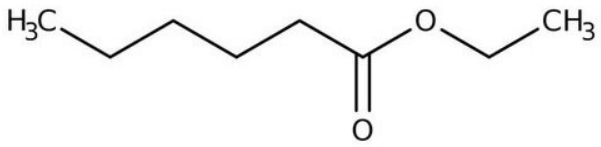


Figura 7.32: Struttura molecolare dell'esanoato di etile.

- **γ-caprolattone**: è un composto organico volatile (VOC) appartenente alla famiglia dei lattoni, presente nel profilo aromatico del formaggio Gorgonzola. Si forma durante il processo di lipolisi e successiva ossidazione degli acidi grassi liberi a catena corta e media presenti nel grasso del latte. Contribuisce a dare note di sottofondo tipicamente dolci, fruttate e cremose, bilanciando la pungenza marcata data dai chetoni.

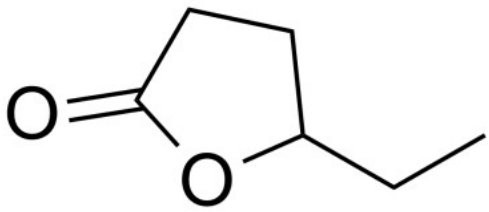


Figura 7.33: Struttura molecolare del γ-caprolattone.

- **Altri esteri presenti**: butanoato di 3-metilbutile, octanoato di etile, 3-metilbutilesanoato, etildecanoato.

7.3.6 Aldeidi

- **2-metilpropanale**: è un importante composto volatile organico e fa parte del profilo aromatico del gorgonzola, si forma principalmente durante la maturazione del formaggio attraverso la degradazione degli amminoacidi, via catabolismo della valina o degradazione di Strecker, un processo biochimico mediato dal microbiota del fitto ecosistema di batteri lattici e muffe, *Penicillium roqueforti* [42]. Apporta una nota aromatica tipicamente maltata, fruttata e pungente, descritta anche come aroma di nocciola o di cereali a basse concentrazioni.

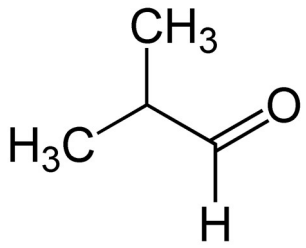


Figura 7.34: Struttura molecolare del 2-metilpropanale.

- **3-metilbutanale**: A basse concentrazioni apporta note tipiche di malto, formaggio stagionato e frutta, con sfumature che richiamano il cacao e la frutta secca, es. nocciola [52]. Contribuisce all'intensità dell'aroma pungente complessivo, interagendo con i chetoni prodotti dalle muffe. Si forma principalmente durante la maturazione del formaggio attraverso la degradazione degli amminoacidi, proteolisi e successivo catabolismo della leucina, un processo mediato sia dagli enzimi dei batteri lattici sia dall'azione delle muffe tipiche dell'erborinatura.

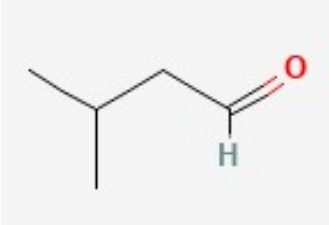


Figura 7.35: Struttura molecolare del 3-metilbutanale.

- **2-metilbutanale**: Il composto si genera durante la maturazione del formaggio principalmente attraverso il catabolismo degli amminoacidi. Nello specifico, il 2-metilbutanale deriva dalla degradazione e transaminazione dell'isoleucina, mentre dal suo isomero, la leucina, si origina il 3-metilbutanale. Questo processo è guidato dall'azione

enzimatica della microflora del formaggio, incluse le muffe caratteristiche come il *Penicillium roqueforti*. Conferisce tipicamente note descritte come di malto, tostate, fruttate o di cacao.

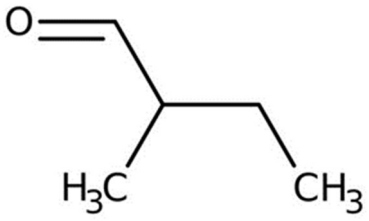


Figura 7.36: Struttura molecolare del 2-metilbutanale.

- **Esanale**: è un composto organico volatile (VOC) appartenente alla classe delle aldeidi lineari a catena corta, presente nel profilo aromatico di numerosi formaggi. Deriva principalmente dall'ossidazione lipidica, lipolisi e successiva degradazione degli acidi grassi insaturi come l'acido linoleico, durante i processi di maturazione e stagionatura del formaggio. A basse concentrazioni, l'esanale conferisce una nota tipicamente definita come "verde" o di "erba appena tagliata".

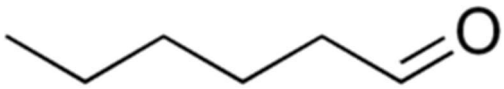


Figura 7.37: Struttura molecolare dell'esanale.

- **Altre aldeidi presenti**: fenilacetaldeide, nonanale, decanale.

7.3.7 Composti aromatici

- **4-metilanisolo**: È un etere aromatico, un anello benzenico con un gruppo metile e un gruppo metossile in posizione para. Ha un odore intenso e persistente, descritto come erbaceo, dolce, simile all'anice o con sfumature canforate/legnose. Nei formaggi contribuisce a rifinire le sfumature dolci o pungenti tipiche della pasta erborinata. La sua sintesi è dovuta a:
    1. Attività di *Penicillium roqueforti*;
    2. Alimentazione dei ruminanti: Alcuni composti fenolici e anisoli possono derivare direttamente dall'erba o dal fieno consumati dalle vacche, trasferendosi dal latte al formaggio [53].

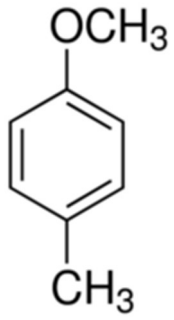


Figura 7.38: Struttura molecolare del 4-metilanisolo.

- **p-cresolo**: Si sviluppa principalmente durante la maturazione del formaggio attraverso il catabolismo dell'aminoacido tirosina. Questo processo viene attivato dall'azione combinata di batteri lattici, lieviti e dal metabolismo secondario delle muffe caratteristiche come il *Penicillium roqueforti*. Composti fenolici come il p-cresolo contribuiscono alla complessità dell'aroma del formaggio. A concentrazioni minime o di soglia apporta note aromatiche definite come pungenti e affumicate.

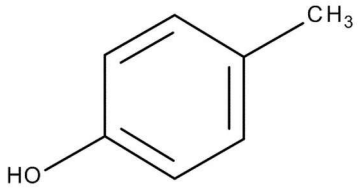


Figura 7.39: Struttura molecolare del p-cresolo.

- **Benzonitrile**: Nei formaggi a crosta fiorita o erborinati, la formazione di nitrili e composti aromatici benzenici è legata principalmente al catabolismo degli amminoacidi aromatici, come la fenilalanina. Questo processo è fortemente stimolato dall'attività metabolica ed enzimatica delle muffe caratteristiche. Ha un caratteristico odore di mandorla amara. Nei formaggi stagionati ed erborinati, pur essendo spesso presente in tracce, contribuisce insieme ad altre molecole a definire le sfumature aromatiche "dolci-amare" e la complessità del bouquet tipico.

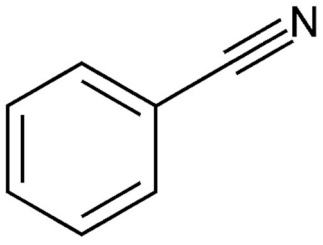


Figura 7.40: Struttura molecolare del benzonitrile.

- **Benzaldeide**: Si forma principalmente durante il processo di maturazione e stagionatura del formaggio. Deriva dalla parziale scomposizione, deaminazione e metabolismo degli amminoacidi liberi stimolati dall'azione enzimatica delle muffe tipiche del Gorgonzola, come il *Penicillium roqueforti*. È la molecola chimica responsabile del caratteristico odore di mandorle amare, all'interno del complesso bouquet del Gorgonzola non agisce da sola. Si unisce e interagisce con altre classi dominanti di VOC, come i chetoni, gli esteri e gli alcoli [50].

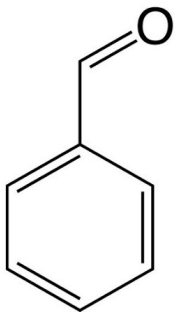


Figura 7.41: Struttura molecolare della benzaldeide.

7.4. Profilo dei composti organici volatili (VOC) trattato mediante analisi delle componenti principali (PCA).

Il profilo dei composti organici volatili dei campioni di latte, formaggio fresco e gorgonzola ottenuto tramite HS-SPME-GC/MS è stato sottoposto ad analisi delle componenti principali. Come mostrato in **Figura 7.42**, le prime due componenti principali, PC1 e PC2, spiegano rispettivamente il 53.4% e il 13.9% della varianza totale, corrispondenti complessivamente al 67.3% della variabilità dei dati. L'analisi è stata condotta senza autoscaling delle variabili, in modo da preservare il contributo relativo dei composti maggiormente rappresentativi del profilo volatile ed evitare di attribuire un peso eccessivo a composti presenti a livelli molto bassi. Di conseguenza, la disposizione dei campioni nello spazio delle componenti principali è influenzata prevalentemente dai VOC caratterizzati dalla maggiore variabilità assoluta tra i campioni. In **Figura 7.43** sono inoltre riportati i loading plot relativi ai composti organici volatili considerati nell'analisi, rappresentati in funzione della rispettiva classe chimica. La posizione delle variabili nel loading plot permette di individuare i composti maggiormente associati ai diversi gruppi di campioni e quindi maggiormente responsabili della separazione osservata nello score plot.

Lo score plot evidenzia una chiara differenziazione dei tre stadi del processo produttivo. La PC1 separa principalmente i campioni di latte, localizzati a valori negativi, dai campioni di formaggio fresco e Gorgonzola, caratterizzati prevalentemente da score positivi. Tale separazione riflette la marcata modificazione del profilo volatile conseguente alla trasformazione del latte e alle prime fasi del processo di caseificazione. In particolare, tra i composti maggiormente associati ai valori positivi di PC1 risultano etanolo e 3-metil-1-butanolo, insieme ad altri prodotti del metabolismo microbico e delle trasformazioni che avvengono durante la produzione del formaggio.

La PC2 consente invece di distinguere principalmente i campioni di formaggio fresco, caratterizzati da valori negativi, dai campioni di Gorgonzola, distribuiti prevalentemente a valori positivi. I campioni di formaggio fresco risultano associati a composti quali 2,3-pentandione, 3-idrossi-2-butanone, acetato di etile e 1-propanolo, che contribuiscono alla loro collocazione nella regione a PC2 negativa. Al contrario, i campioni di Gorgonzola sono maggiormente associati ai valori positivi di PC2. Tra le variabili che contribuiscono maggiormente a questa separazione si osservano in particolare i metilchetoni 2-eptanone e 2-nonanone, composti tipicamente correlati al metabolismo degli acidi grassi da parte di *Penicillium roqueforti* e caratteristici dello sviluppo aromatico dei formaggi erborinati. Alla stessa regione dello spazio multivariato risultano associati

anche alcuni esteri etilici e altri composti che si sviluppano durante la maturazione. I campioni di Gorgonzola mostrano inoltre una maggiore dispersione rispetto agli altri gruppi. Tale comportamento può essere ricondotto, almeno in parte, al diverso grado di maturazione dei campioni analizzati, compreso tra 24 e 87 giorni. Nello score plot è infatti osservabile una tendenza dei campioni a spostarsi verso valori maggiormente positivi di PC2 con l'aumentare del tempo di maturazione, coerentemente con la progressiva evoluzione del profilo volatile durante il processo.

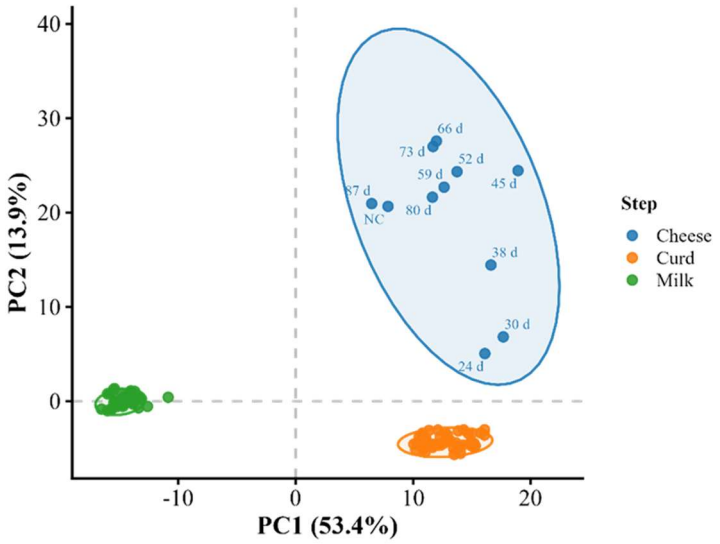


Figura 7.42: grafico degli score plot PC1 vs PC2, gli score sono evidenziati con colori differenti in base allo step del processo produttivo, le ellissi racchiudono un livello di confidenza del 95%.

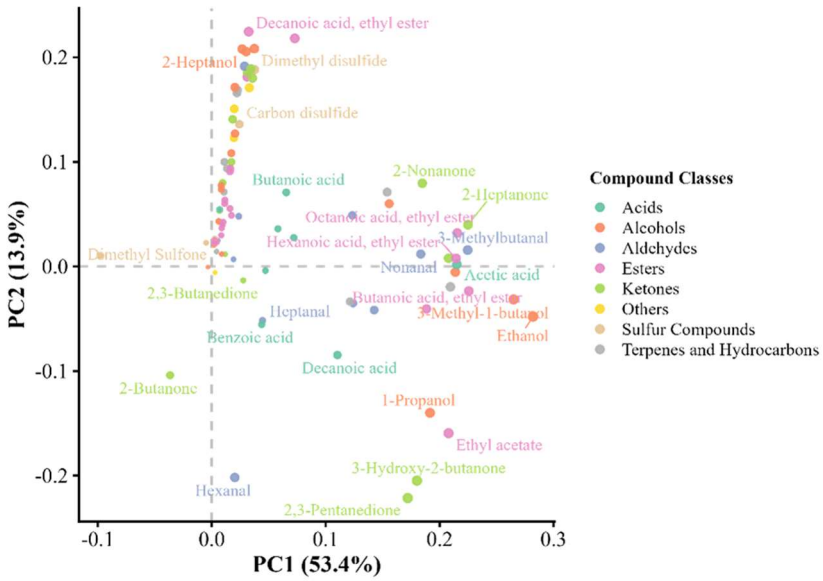


Figura 7.43: grafico dei loadings plot PC1 vs PC2, i composti sono colorati in base all'appartenenza alla rispettiva classe chimica.

7.5 Rapporto isotopico del carbonio

7.5.1 Sviluppo ed ottimizzazione del metodo

L'interfaccia Liquiface è adibita alla conversione di tutto il carbonio presente all'interno dell'effluente in uscita dalla colonna LC in CO_2 attraverso la reazione di ossidazione descritta nel Capitolo 5. Durante il lavoro di tesi si è operato con un'interfaccia il cui reattore viene mantenuto ad una temperatura di 99°C, indicata dal costruttore, in cui convergono tre flussi indipendenti: 1) campione, 2) acqua, 3) perossosolfato di sodio (ossidante). Considerando il flusso e la concentrazione dell'ossidante costanti, si è operato all'ottimizzazione della concentrazione di analita che:

- Restituisse un segnale sufficientemente riproducibile di $\delta^{13}C$;
- Rispettasse la "legge di linearità" per la quale all'aumentare della concentrazione del carbonio si avesse un aumento dell'intensità e dell'area del segnale;
- Non comportasse condizioni di lavoro troppo drastiche per non ledere a una delle componenti della strumentazione utilizzata.

7.5.2 Ottimizzazione della separazione degli analiti tramite cromatografia

L'ottenimento di separazioni cromatografiche caratterizzate da una elevata risoluzione dei picchi è un requisito fondamentale al fine di poter condurre una corretta integrazione dei segnali transienti, per determinarne la concentrazione delle singole specie rilevate, oltre al calcolo del $\delta^{13}C$. Oltre alla concentrazione e alle condizioni all'interfaccia, discusse nel Paragrafo 7.5.1, è essenziale lavorare sul sistema separativo andando a selezionare il tipo di colonna cromatografica e le condizioni cromatografiche più idonee.

La scelta di quest'ultime variabili è strettamente correlata in quanto la fase mobile non deve interferire con la determinazione del rapporto isotopico del carbonio, quindi, non deve apportare ulteriore carbonio "esogeno" al sistema IRMS. Infatti, sebbene per la separazione degli aminoacidi, siano disponibili diverse tipologie di colonne/fasi stazionarie, alcune di esse lavorano con fasi organiche che però non sono compatibili con il tipo di determinazione analitica utilizzata durante il lavoro di tesi. Fortunatamente una tipologia di colonne si è rivelata particolarmente efficiente per la separazione degli aminoacidi, ovvero le colonne a modalità mista o mixed-mode

(vedi Capitolo 5). Queste colonne prevedono l'utilizzo di acqua come fase mobile e pertanto risultano ideali.

Durante il lavoro di tesi è stata usata la colonna Primesep 100A.

Nella **Figura 7.44** è possibile visualizzare il profilo cromatografico per un mix di standard di aminoacidi, processato con la colonna in questione.

Figura 7.44:

8. CONCLUSIONI

9. PROCEDURE, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

9.1 PROCEDURE

9.1.1. Procedura per la determinazione dell'indice di rifrazione

Le misure dell'indice di rifrazione sono fortemente influenzate dalla temperatura, pertanto, il rifrattometro è termostatato in modo da mantenere la temperatura stabile a 20.00 ± 0.05 °C; il tempo richiesto per la stabilizzazione della temperatura è di circa 20-30 minuti. Lo strumento è stato tarato con acqua bidistillata andando a misurare il valore di indice di rifrazione fino ad ottenere un valore pari a 1.33298 ± 0.0005.

Dopo la taratura i valori di indice di rifrazione sono stati misurati sui campioni tal quali depositando qualche goccia di campione sulla cella di misura in modo che quest'ultima fosse completamente coperta.

9.1.2. Procedura per la determinazione della densità

La densità è stata determinata per via diretta, mediante pesata. Tale approccio definisce, il valore di "densità misurata". Nello specifico, la "densità misurata" è stata ottenuta calcolando il rapporto tra la massa di un determinato volume di campione (1 mL) e la massa del medesimo volume d'acqua, come riportato nell'**Equazione 9.1:**

$$\text{d misurata} = \frac{massa\ campione}{massa\ acqua} \qquad \textbf{(Eq.9.1)}$$

9.1.3. Procedura per la determinazione del pH

Il pH dei campioni di latte è misurato via pHmetro dopo l'opportuna calibrazione tramite 2 soluzioni tampone a pH = 4.00 e pH = 10.00.

Il pHmetro viene attentamente pulito dopo la misura di ciascun campione con acqua distillata.

9.1.4. Procedura per la determinazione del contenuto di lattosio

La determinazione del lattosio in un campione di latte consiste in una prima operazione di rimozione della frazione proteica dal campione di latte tramite precipitazione.

Operativamente, in un matraccio da 100 mL vengono posti circa 2 grammi di latte, a cui sono aggiunti 60 mL di acqua bidistillata. Si aggiungono successivamente i reattivi di Carrez, rispettivamente 5 mL di Carrez I e 5 mL di Carrez II, l'ultima aggiunta consiste in 10 mL di soluzione idrossido di sodio 0.10 M. La soluzione risultante viene in seguito agitata e lasciata raffreddare a temperatura ambiente, portata a volume con acqua e mescolata.

La soluzione finale viene filtrata, il filtrato viene destinato alle successive analisi.

Reattivo Carrez I: Ferrocianuro di potassio triidrato al 15% (15 g/100 ml).

Reattivo Carrez II: soluzione acquosa di acetato di zinco eptaidrato al 30 % (30 g/100 ml).

9.1.5 Procedura per la determinazione del contenuto elementare

I campioni sono stati precedentemente preparati per la misura analitica:

1. Pesatura: Una volta essiccati, i campioni vengono pesati con microbilancia, per garantire la massima precisione nella misura;
2. Inserimento nello strumento: i campioni vengono successivamente inseriti nello strumento, pronti per la misurazione finale.

9.1.6 Procedura per la determinazione del rapporto isotopico del carbonio

9.1.7 Procedura per la determinazione del rapporto isotopico dell'ossigeno dell'acqua

Per la determinazione del rapporto isotopico dell'ossigeno vengono utilizzati appositi vial da 3.7 mL, chiusi con tappi provvisti di setto a tenuta, dentro i quali sono depositati 200 µL di campione tal quale e standard. Per ogni standard e campione vengono effettuate 3 repliche. Una corretta determinazione richiede anche un ordine preciso dei campioni all'interno della griglia dell'autocampionatore.

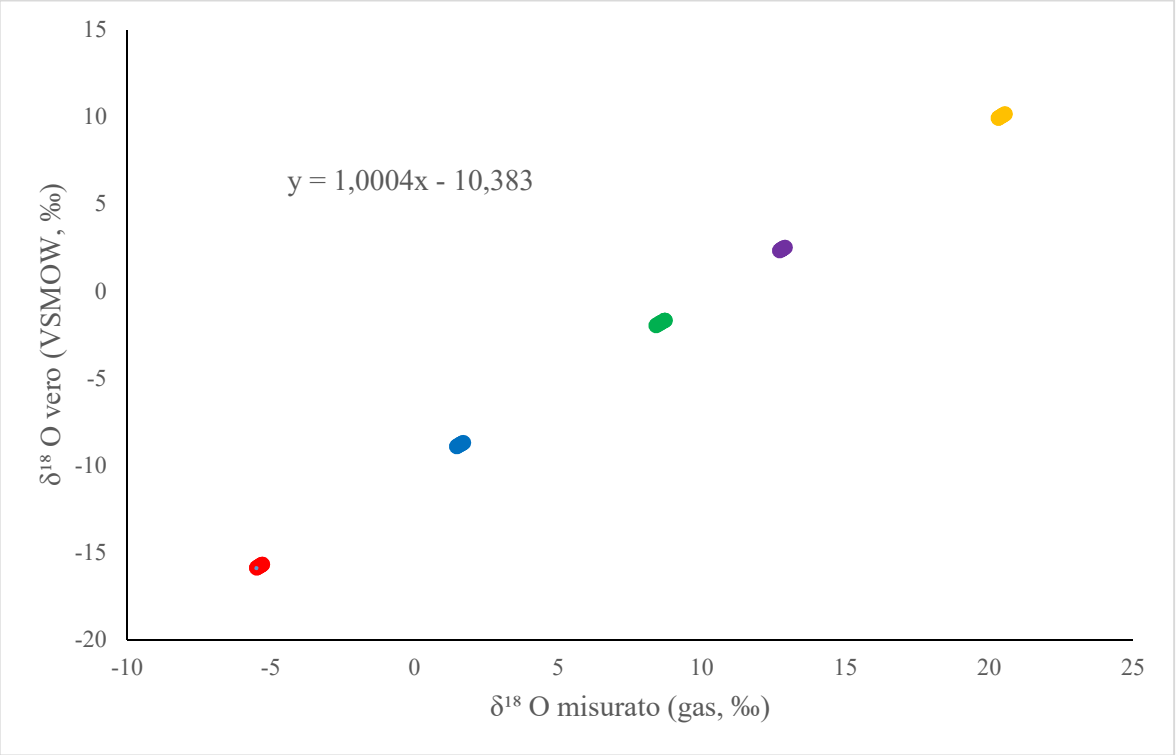


Figura 9.1: retta di calibrazione per la determinazione del $\delta^{18}O$ dell'acqua dei campioni di latte realizzata utilizzando una serie di 5 standard ed eseguendo più repliche di essi: • standard neve; • standard 1; • standard 2; • standard 3; • standard 4.

I valori sono stati ottenuti tramite una calibrazione condotta con standard primari IAEA 606, WSMOV 2 e GRESP aventi valori di $\delta^{18}O$ dell'acqua certificati rispettivamente pari a: (2.43 ± 0.04) ‰, (0.00 ± 0.02) ‰ e (-33.39 ± 0.04) ‰. Tutti i valori sono riportati come media ± sd nella scala internazionale V-SMOW.

9.1.8 Procedura di campionamento della frazione volatile di campioni di latte, formaggio fresco e gorgonzola.

La procedura operativa prevede il posizionamento di 5 mL di campione in una vial da 20 mL. Il campione così preparato è stato termostatato a 50.00 ± 0.05°C in forno, esponendo la fibra per 15 min allo spazio di testa. Terminato il campionamento, ritratta la fibra, è stato possibile esporla nel liner del sistema cromatografico utilizzato (GC/MSq).

9.1.9 Procedura di analisi qualitativa della frazione volatile di campioni di latte, formaggio fresco e gorgonzola.

Utilizzando la procedura di campionamento descritta nel paragrafo 9.1.8, sono state condotte le analisi tramite uno strumento GC-qMS. Lo strumento monta un apposito liner per campioni SPME, anche in questo caso si è proceduto lavorando in modalità splitless.

La programmata di temperatura utilizzata è riportata in **Tabella 9.1**, in **Tabella 9.2** sono invece riportate le specifiche relative al sistema gas cromatografico e alla relativa determinazione in massa.

Tabella 9.1: programmata di temperatura GC-qMS.

Rampa di temperatura (°C/min)	Temperatura (°C)	Hold (min)
	40°C	2.00
6°C/min	140°C	7.33
10°C/min	250°C	0.00
	260°C	

Tabella 9.2: specifiche corsa cromatografica GC-qMS.

Colonna	DB-624 UI
Fase stazionaria	6% cianopropile/fenile e 94% polidimetilsilossano
Lunghezza	60 m
Diametro interno	250.00 μm
Spessore del film	1.4 μm
Temperatura iniettore	250°C
Gas carrier	He
Modalità di iniezione	Spliteless
Rapporto di splittaggio	1 : 20

Durata totale corsa	60 min
Modalità di acquisizione	Scan
Potenziale di ionizzazione	70 eV
Solvent delay	3 min
Scan group 1:	
start time	3 min
low mass	15 m/z
high mass	300 m/z
threshold	150
Scan group 2:	
start time	40 min
low mass	35 m/z
high mass	450 m/z
threshold	150

9.2 Materiali

- Tutte le soluzioni sono state preparate con l'uso di acqua deionizzata di elevata purezza TYPE1 ottenuta da un sistema MilliQ modello Element (Millipore) e con una resistività pari a 18.2 MΩ/cm (parametri fisici e chimici dell'acqua per TIPO1 conformi alle norme ASTM tipo I e ISO3696 grado);
- Standard primari per la determinazione del $\delta^{18}O$ dell'acqua dei campioni: VSMOW2 ($\delta^{18}O$ = 0 ‰ ± 0.02 ‰), GRESP ($\delta^{18}O$ = -33.39‰ ± 0.04 ‰), and IAEA-606 ($\delta^{18}O$ = 2.43 ‰ ± 0.04 ‰);
- Standard secondari per la determinazione del $\delta^{18}O$: standard neve (-15.83‰ ± 0.2 ‰). standard 1 ($\delta^{18}O$ = 10.04 ‰ ± 0.04 ‰), standard 2 ($\delta^{18}O$ = 2.39‰ ± 0.03 ‰), standard 3 ($\delta^{18}O$ = -1.79‰ ± 0.02 ‰), standard 4 ($\delta^{18}O$ = -8.73‰ ± 0.04 ‰);
- Persolfato di sodio, EMSURE Supelco, Sigma-Aldrich;
- Vials di vetro di vari volumi (da 40 mL a 1.5 mL);
- Pipette utilizzate: Gilson Positive displacement pipette M1000 e M100; Pipetman P1000 e P500 e relativi puntali;
- Tritipur Reag. Ph Eur Sodium hydroxide solution 0.1 N Supelco SigmaAldrich;

- Ferrocianuro di potassio triidrato 0.25 M, Carrez I, VWR chemicals, AVS TITRINORM.
- Soluzione acquosa di acetato di zinco 1.0 M in acido acetico 0.5 M, Carrez II, VWR chemicals.

9.3 Strumentazione

- Bilance analitiche utilizzate: Mettler AE2000 con una sensibilità di ± 0.1 mg e Gibertini E42S con sensibilità di 0.1 mg;
- Indice di rifrazione Index Instruments Automatic Refractomer GPR 11-37 con termostato HAAKE F3 Fisons;
- pHmetro ORION model 420A;
- AP-300 Automatic Polarimeter. ATAGO.
- Flash 2000 Organic Elemental Analyzer, THERMO Scientific;
- HS-SPME: un supporto per Micro-Estrazione in Fase Solida (SPME) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051 United States) è stato utilizzato per condurre manualmente l'analisi dello spazio di testa (HS) tramite SPME. La fibra scelta è lunga 1 cm e composta da Carbon Wide Range/Polidimetilsilossano (Carbon-WR/PDMS Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051 United States), coating di 95 μm;
- GC-qMS: l'analisi GC/MSq dei composti volatili estratti è stata condotta utilizzando un sistema gascromatografico Agilent 6890N Network accoppiato a uno spettrometro di massa 5973N (Agilent Technologies, CA 95051 United States). È stata utilizzata una colonna DB-624 UI ed He come carrier gas;
- I cromatogrammi e gli spettri di massa sono stati analizzati con il software Enhanced ChemStation (Agilent Technologies, CA 95051 United States). L'identificazione dei composti volatili è stata ottenuta confrontando gli spettri di massa con la libreria del sistema di dati NIST2008;
- Spettrometro IRMS Isoprime precisION, Elementar con interfaccia ISOflow, Elementar per la determinazione del $\delta^{18}O$ dell'acqua; i parametri strumentali sono riportati in **Tabella 9.3:**

Tabella 9.3: condizioni operative per la determinazione del $\delta^{18}O$ dell'acqua.

Interfaccia Isoflow

Composizione del flusso di gas flussato all'interno dei vials	90 (elio) : 10 (CO_2)
Flush duration (tempo di flussaggio dei vials)	45 secondi
Pressurization duration	15 secondi
Loop fill duration	18 secondi
Loop stabilisation duration	8 secondi
Number of injection	2
Tray temperature	40°C
Ultitrap temperature	130°C
Isoprime precisION (IRMS)	
Acceleration Voltage (AV)	4188.990 V
Extraction Voltage (EX)	76.125 %
Half Plate Voltage	153.110 V
Z-Plate Voltage	-26.940 V
Trap Current	200.000 μA
Electron Energy	98.100 eV
Ion Repeller Voltage	-7.990 V
Magnent Current	4000.000 mA
Trap Voltage	20.000 V
ESA Voltage	34.300 %
Low Vacum	2.1*10-2 mBar
Hight Vacum	2.4*10-6 mBar
Intensità relativa Monitoring gas	9 nA

- LC Agilent Technologies 1260 Infinity II avente loop da 100 μL, con rivelatore RID ifentato con il sistema IRMS Isoprime precisION, Elementar attraverso un'interfaccia LiquiFace, Elementar. I parametri strumentali per la quantificazione degli aminoacidi e i relativi $\delta^{13}C$ sono riportati in **Tabella 9.4**:

Tabella 9.4: condizioni operative per la determinazione del $\delta^{13}C$ degli aminoacidi.

LC Agilent 1260 Infinity II	
Pompa	1260 Isopump G7110B
RID	1260 RID G7162A
Temperatura RID	35°C
Colonna	Primesep 100A
Temperatura colonna	35°C
Fase mobile A	Acqua Milli-Q
Fase mobile B	Acqua Milli-Q + 0.2% H_2SO_4
Flow fase mobile	0.8 mL/min
Tempo della corsa cromatografica	100 minuti
Flow al T-piece verso LiquiFace	0.25 ÷ 0.3 mL/min
Interfaccia LiquiFace	
Valvola di iniezione	Rheodyne 7752 con loop 20 μL
Separator Flow	4 ÷ 5 mL/min
Nafion Flow	50 mL/min
Flow di H_2O	0.15 mL/min
Isoprime precisION (IRMS)	
Acceleration Voltage (AV)	4286.820 V
Extraction Voltage (EX)	68.567 %
Half Plate Voltage	62.470 V
Z-Plate Voltage	46.420 V
Trap Current	400.000 μA
Electron Energy	90.000 eV
Ion Repeller Voltage	-6.000 V
Magnent Current	4000.000 mA
Trap Voltage	20.000 V
ESA Voltage	34.300 %

Low Vacum	2.1*10-2 mBar
Hight Vacum	2.8*10-6 mBar
Intensità relativa Monitoring gas	5 nA
Acceleration Voltage (AV)	4286.820 V

10. BIBLIOGRAFIA

1. Kelly, S.; Heaton, K.; Hoogewerff, J. Tracing the Geographical Origin of Food: The Application of Multi-Element and Multi-Isotope Analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 555–567, doi:10.1016/j.tifs.2005.08.008.
2. Georgiou, C.A.; Danezis, G.P. *Food Authentication: Management, Analysis and Regulation*; Wiley Blackwell: Chichester, 2017; ISBN 978-1-118-81024-8.
3. European Communities *From Farm to Fork: Safe Food for Europe's Consumers*; Publications Office: Luxembourg, 2004; ISBN 978-92-894-7772-7.
4. Kim, S.-H.; Huang, R. Understanding Local Food Consumption from an Ideological Perspective: Locavorism, Authenticity, Pride, and Willingness to Visit. *J. Retail. Consum. Serv.* **2021**, *58*, 102330, doi:10.1016/j.jretconser.2020.102330.
5. Sighinolfi, S.; Baneschi, I.; Manzini, S.; Tassi, L.; Dallai, L.; Marchetti, A. Determination of Glycerol Carbon Stable Isotope Ratio for the Characterization of Italian Balsamic Vinegars. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *69*, 33–38, doi:10.1016/j.jfca.2018.02.002.
6. Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana Regolamento CE n. 208192 del Consiglio del 14 luglio 1992, Protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli ed al.
7. Regolamento (UE) n. 1151/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 novembre 2012, sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari.
8. Kamiloglu, S. Authenticity and Traceability in Beverages. *Food Chem.* **2019**, *277*, 12–24, doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.091.
9. Wadood, S.A.; Boli, G.; Xiaowen, Z.; Hussain, I.; Yimin, W. Recent Development in the Application of Analytical Techniques for the Traceability and Authenticity of Food of Plant Origin. *Microchem. J.* **2020**, *152*, 104295, doi:10.1016/j.microc.2019.10429
10. F. Camin, L. Bontempo, K. Heinrich, K. Horacek, S.D. Kelly, C. Schlicht, F. Thomas, F. Monahan, J. Hoogewerff, A. Rossmann, *Multi-element (H,C,N,S) stable isotope characteristics of lamb meat from different European regions*, Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2007, **389(1)**, 309-320
11. Liu, H.; Zeng, Y.; Yan, J.; Huang, R.; Zhao, X.; Zheng, X.; Mo, M.; Tan, S.; Tong, H. C N H O and Mineral Element Stable Isotope Ratio Analysis for Authentication in Tea. *J. Food Compos. Anal.* **2020**, *91*, 103513, doi:10.1016/j.jfca.2020.103513.

12. Chartrand, M.M.G.; Mester, Z. Carbon Isotope Measurements of Foods Containing Sugar: A Survey. *Food Chem.* **2019**, *300*, 125106, doi:10.1016/j.foodchem.2019.125106.
13. Calderone, G.; Guillou, C. Analysis of Isotopic Ratios for the Detection of Illegal Watering of Beverages. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1399–1405, doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.080.
14. «Agroalimentare: export a 72,5 miliardi, spinta dai mercati esteri». Consultato: 4 luglio 2026. [Online]. Disponibile su: https://euroborsa.it/agroalimentare-italia-export-mercati-esteri.aspx
15. https://www.qualivita.it/news/dop-economy-i-dati-2026-su-produzione-ed-export-di-gorgonzola-dop/.
16. https://www.gorgonzola.com/.
17. Disciplinare_Gorgonzola_22.9.2017.
18. https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/162400.
19. Produzione di metaboliti secondari da penicillium roqueforti, starter nella produzione di formaggio gorgonzola / L. Vallone. ((Intervento presentato al 11. convegno Convegno nazionale Federazione italiana micopatologia umana e animale tenutosi a Aci Castello (CT) nel 2012.
20. Indice di rifrazione: tutto ciò che occorre sapere – METTLER TOLEDO (http://www.mt.com).
21. https://uwaterloo.ca/pawliszyn-group/research/spme.
22. J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction, John Wiley & Sons, Inc., New York/Chichester/Brisbane/Toronto/Singapore, 1997, ch. 3, p. 43.
23. T. Górecki, X. Yu and J. Pawliszyn. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME Fibres. Analyst, 1999, 124, 643–649. doi.org/10.1039/A808487D.
24. Jean-Philippe Godin, Laurent-Bernard Fay, and Gerard Hopfgartner, Liquid chromatography combined with mass spectrometry for 13C isotopic analysis in life science research, Mass Spectrometry Reviews, 2007, **26**, 751-774.
25. OIV Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts **OIV-OENO 511-2013**, Metodo per la determinazione del rapporto isotopico $^{18}O/^{16}O$ dell'acqua nell'aceto di vino mediante spettrometria di massa isotopica.
26. Michael Krummen, Andreas W. Hilkert, Dieter Juchelka, Alexander Duhr, Hans-Jürgen Schlüter and Reinhold Pesch, A new concept for isotope ratio monitoring liquid

chromatography/mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004, **18**, 2260-2266.

27. A. M. C. Davies e T. Fearn, «Back to basics: the principles of principal component analysis».

28. https://milkotester.com/blogs/composition-of-milk/chemical-composition-of-milk?srsltid=AU7gw4VRJB519pic70gqjawwyJdb_BS74rswF_byghzB-RaFcDiEKFOJ

29. Acquavia MA, Villone A, Rubino R, Bianco G. A Comprehensive Review of Milk Components: Recent Developments on Extraction and Analysis Methods. Molecules. 2025 Apr 30;30(9):1994. doi: 10.3390/molecules30091994. PMID: 40363801; PMCID: PMC12073687.

30. Regolamento CE 853/2004, Pacchetto igiene.

31. Rangappa, KS Studi sull'indice di rifrazione del latte. Proc. Indian Acad. Sci. 25, 86–94 (1947). https://doi.org/10.1007/BF03049680.

32. https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/protocol/analytical chemistry/photometry-and-reflectometry/ph-of-milk-and-milk-products?srsltid=AU7gw4UYearFpH6a6ZOcGCBHmiQFDhsFJCgOCHCCJ-GF6Ej3gVJaKIlj.

33. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23 - Settembre 2010

34. Bowen GJ, Ehleringer JR, Chesson LA, Stange E, Cerling TE. 2007. Stable isotope ratios of tap water in the contiguous United States. Water Resour Res 43. doi:10.1029/2006WR005186.

35. Krivachy (Tanz) N, Rossmann A, Schmidt HL. 2015. Potentials and caveats with oxygen and sulfur stable isotope analyses in authenticity and origin checks of food and food commodities. Food Contl 48:143–50.

36. Abeni F, Petrera F, Capelletti M, Dal Pr`a A, Bontempo L, Tonon A, Camin F. 2015. Hydrogen and oxygen stable isotope fractionation in body fluid compartments of dairy cattle according to season, farm, breed, and physiological stage. Plos One 10:e0127391.

37. Chesson LA, Valenzuela LO, O'Grady SP, Cerling TE, Ehleringer J. 2010. Hydrogen and oxygen stable isotope ratios of milk in the United States. J Agric Food Chem 58:2358–63.

38. Bontempo L, Lombardi G, Paoletti R, Ziller L, Camin F. 2012. H, C, N and O stable isotope characteristics of alpine forage, milk and cheese. Intl Dairy J 23(2):99–104.

39. Paola Iacumin, Antonietta Di Matteo, Enricomaria Selmo, Giampiero Venturelli, Stable oxygen isotopes in water of concentrated liquid foodstuffs: Are the commonly determined values accurate?, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2018, 32, 1751-1754.

40. «WaterIsotopes.org». Consultato: 3 agosto 2026. [Online]. Disponibile su: https://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data_access/figures.html.

41. A. Garbaras, R. Skipitytė, J. Šapolaitė, Ž. Ežerinskis, e V. Remeikis, «Seasonal Variation in Stable Isotope Ratios of Cow Milk in Vilnius Region, Lithuania», Animals, vol. 9, fasc. 3, p. 69, feb. 2019, doi: 10.3390/ani9030069.

42. Cadwallader, K., Singh, T. (2009). Aromi e sapori sgradevoli nel latte e nei prodotti lattiero-caseari. In: McSweeney, P., Fox, P. (a cura di) Chimica lattiero-casearia avanzata. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_14.

43. Gripon, J.-C., Monnet, V., Lambert, G., Desmazeaud, M.J. 1991. Microbial enzymes in cheese ripening. In: Food Enzymology. Vol. 1 (P.F. Fox, ed.), pp. 131–168, Elsevier Applied Science Publishers, London

44. D. A. Forss, «Mechanisms of formation of aroma compounds in milk and milk products», Journal of Dairy Research, vol. 46, fasc. 4, pp. 691–706, nov. 1979, doi: 10.1017/S0022029900020768.

45. Frankel, E.N. 1980. Lipid oxidation. Prog. Lipid Res. 19, 1–22.

46. Moio, L., Etievant, P.X., Langlois, D., Dekimpe, J., Addeo, F. 1994. Detection of powerful odorants in heated milk by use of extract dilution sniffing analysis. J. Dairy Res. 61, 385–394.

47. Moio, Luigi, Paola Piombino, and Francesco Addeo. "Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese." Journal of Dairy Research 67.2 (2000): 273-285.

48. AKALIN, AS e KARAMAN, AD (2011), INFLUENZA DEI SISTEMI DI CONFEZIONAMENTO SULLE CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE E SUI COMPOSTI VOLATILI DEL FORMAGGIO BIANCO TURCO PRODOTTO INDUSTRIALMENTE. Journal of Food Biochemistry, 35: 663-680. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00409.x.

49. DWIVEDI, B. K. & ARNOLD, R. G. (1973). Journal of Agricultural and Food Chemistry 21, 54.

50. Torri, L.; Aprea, E.; Piochi, M.; Cabrino, G.; Endrizzi, I.; Colaianni, A.; Gasperi, F. Relationship between Sensory Attributes, (Dis) Liking and Volatile Organic Composition of Gorgonzola PDO Cheese. Foods 2021, 10, 2791. https://doi.org/10.3390/foods10112791.

51. Chin, H.W., Lindsay, R.C. 1994. Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulphide and dimethyl trisulphide. Food Chem. 49, 387–392.

52. Afzal MI, Ariceaga CC, Boulahya KA, Jacquot M, Delaunay S, Cailliez-Grimal C. Biosynthesis and role of 3-methylbutanal in cheese by lactic acid bacteria: Major metabolic pathways, enzymes involved, and strategies for control. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017 Jan 22;57(2):399-406. doi: 10.1080/10408398.2014.893502. PMID: 25849292.

53. Ianni, A.; Bennato, F.; Martino, C.; Grotta, L.; Martino, G. Volatile Flavor Compounds in Cheese as Affected by Ruminant Diet. Molecules 2020, 25, 461. https://doi.org/10.3390/molecules25030461.

Appendice 1

Tabella A1.1: Valori di indice di rifrazione, densità, pH, contenuto di lattosio (%) dei 51 campioni di latte intero, suddivisi nei mesi di campionamento.

Mese (Anno)	ID campione	Indice di rifrazione	Densità	pH	Contenuto di lattosio (%)
SET (2025)	L_S_1	1,344	1,0265	6,56	6,012383571
OTT (2025)	L_O_1	1,342	1,0432	6,76	5,690922978
	L_O_2	1,344	1,0400	6,71	6,48965887
	L_O_3	1,342	1,0319	6,67	6,466307642
	L_O_4	1,341	1,0438	6,67	4,169794012
	L_O_5	1,343	1,0350	6,7	5,114638448
	L_O_6	1,342	1,0367	6,73	5,064386772
	L_O_7	1,343	1,0381	6,56	6,092371097
	L_O_8	1,346	1,0366	6,46	5,182128253
	L_O_9	1,343	1,0321	6,72	4,643962848
	L_O_10	1,345	1,0338	6,67	4,590793373
NOV (2025)	L_N_1	1,341	1,0314	6,76	5,10530904
	L_N_2	1,342	1,0299	6,76	4,565842129
	L_N_3	1,342	1,0307	6,78	4,672657013
	L_N_4	1,343	1,0355	6,59	4,965388323
	L_N_5	1,341	1,0292	6,77	4,515437151
	L_N_6	1,341	1,0324	6,75	4,865857165
	L_N_7	1,342	1,0314	6,54	4,44602985
	L_N_8	1,344	1,0310	6,68	5,499989815
DIC (2025)	L_D_1	1,343	1,0246	6,64	4,646223284
	L_D_2	1,344	1,0291	6,72	5,444769618
	L_D_3	1,343	1,0214	6,68	5,118708881
	L_D_4	1,343	1,0302	6,74	5,194355467
	L_D_5	1,344	1,0327	6,62	5,013002475
	L_D_6	1,343	1,0335	6,67	4,967765973
MAR (2026)	L_MR_1	1,348	1,0386	6,64	4,745340836
APR (2026)	L_A_1	1,345	1,0332	6,73	4,669900747
	L_A_2	1,345	1,0382	6,59	4,747962333
	L_A_3	1,344	1,0358	6,59	4,865414061

	L_A_4	1,342	1,0418	6,69	3,528489962
	L_A_5	1,342	1,0356	6,64	3,7224192
	L_A_6	1,343	1,0397	6,49	4,533110954
	L_A_7	1,341	1,0369	6,74	4,721131355
	L_A_8	1,343	1,0424	6,63	4,386519887
	L_A_9	1,341	1,0364	6,51	4,3097582
MAG (2026)	L_M_1	1,348	1,0349	6,75	4,710176926
	L_M_2	1,345	1,0375	6,74	4,553289752
	L_M_3	1,348		6,52	5,160809993
	L_M_4	1,349		6,49	5,952380952
	L_M_5	1,349		6,56	6,37734168
	L_M_6	1,348		6,55	5,139208305
	L_M_7	1,348		6,57	5,742639999
	L_M_8	1,348		6,63	5,712155758
GIU (2026)	L_G_1	1,348		6,62	5,952380952
	L_G_2	1,348		6,55	5,865583259
	L_G_3	1,348		6,55	6,219083977
	L_G_4	1,347		6,61	5,74242359
	L_G_5	1,347		6,59	5,580714514
	L_G_6	1,348		6,58	6,250027509
	L_G_7	1,347		6,61	5,260820257
	L_G_8	1,348		6,5	5,281393559

Appendice 2

Tabella A2.1: Valori di contenuto elementare, N%, C%, H%, S% dei campioni di latte intero e latte scremato, suddivisi nei mesi di campionamento.

Mese (Anno)	ID campione	N%	C%	H%	S%
SET (2025)	L_S_1	4,09	48,28	7,43	tracce
OTT (2025)	L_O_1	3,67	50,15	8,03	tracce
	L_O_2	4,16	48,99	7,7	/
	L_O_3	3,49	52,85	8,31	tracce
	L_O_4	3,92	50,88	8,13	0,13
	L_O_5	3,38	54,76	8,89	0,11

	L_O_6	4,06	49,68	7,75	0,09
	L_O_7	3,69	51,52	8,09	0,08
	L_O_8	4,23	50,68	7,92	tracce
	L_O_9	3,4	54,85	8,65	0,06
	L_O_10	3,91	51,71	8,07	tracce
NOV (2025)	L_N_1	3,01	57,07	8,85	tracce
	L_N_2	4	50,1	7,94	0,09
	L_N_3	3,9	52,97	8,57	0,11
	L_N_4	4,24	51,19	8,16	0,12
	L_N_5	3,94	50,83	8,03	0,09
	L_N_6	4	50,59	8	/
	L_N_7	3,99	50,96	8,19	/
	L_N_8	3,82	48,03	7,88	0,15
DIC (2025)	L_D_1	4,43	52,4	8,36	0,16
	L_D_2	3,95	52,04	8,31	0,14
	L_D_3	3,93	49,46	8	0,09
	L_D_4	3,81	52,83	8,42	0,13
	L_D_5	4,13	50,39	8,09	0,12
	L_D_6	4	50,57	8,19	0,1
MAR (2026)	L_MR_1	4,09	52	8,32	0,11
APR (2026)	L_A_1	4,66	47,35	7,57	0,11
	L_A_2	4,04	50,75	8,06	0,09
	L_A_3	3,66	53,18	8,63	tracce
	L_A_4	4,4	46,72	7,47	0,09
	L_A_5	3,97	53,04	8,48	0,08
	L_A_6	4,52	48,87	7,82	0,12
	L_A_7	4,19	49,36	7,93	0,17
	L_A_8	4,39	49,19	7,85	0,15
	L_A_9	4,1	49,99	8,01	0,08
MAG (2026)	L_M_1	4,06	50,75	8,01	0,16
	L_M_2	4,32	50,88	7,95	0,11
	L_M_3	3,72	81,45	8,11	0,06
	L_M_4	3,74	50,75	8,02	0,06
	L_M_5	3,76	51,4	8,2	0,06

	L_M_6	3,09	56,33	9,08	0,04
	L_M_7	3,96	51,08	8,13	0,07
	L_M_8	3,8	50,95	8,12	0,1
GIU (2026)	L_G_1	3,73	51,8	8,19	0,12
	L_G_2	4,38	48,09	7,54	0,16
	L_G_3	3,82	49,95	7,88	0,13
	L_G_4	4,09	50,21	7,92	0,07
	L_G_5	3,86	49,91	7,99	0,05
	L_G_6	4,1	50,24	7,86	0,09
	L_G_7	3,58	51,95	8,26	0,13
	L_G_8	3,19	50,85	8,29	0,1
SET (2025)	LS_S_1	4,84	42,55	6,93	0,31
OTT (2025)	LS_O_1	5,04	41,65	6,78	0,18
	LS_O_2	4,78	45,53	6,91	0,19
	LS_O_3	5,09	45,44	7,06	0,2
	LS_O_4	5,32	42,31	6,66	0,24
	LS_O_5	5,3	42,68	6,62	0,21
	LS_O_6	4,76	42,95	6,77	0,14
	LS_O_7	4,91	42,78	6,6	0,14
	LS_O_8	5,13	43,37	6,16	0,11
	LS_O_9	5,4	42,37	6,37	0,15
	LS_O_10	5,08	43,57	6,61	0,12
NOV (2025)	LS_N_1	5,17	42,26	6,35	0,13
	LS_N_2	5,37	42,49	6,64	0,11
	LS_N_3	5,23	41,54	6,54	0,15
	LS_N_4	5,24	40,69	6,33	0,12
	LS_N_5	5,22	42,52	6,92	0,18
	LS_N_6	5,29	41,52	6,41	0,08
	LS_N_7	5,74	42,85	6,79	0,15
	LS_N_8	3,43	44,38	7,09	0,18
DIC (2025)	LS_D_1	3,2	43,12	6,97	0,13
	LS_D_2	3,97	44,96	7,19	0,13
	LS_D_3	3,69	42,64	6,89	0,09
	LS_D_4	3,29	42,29	6,87	0,12

	LS_D_5	4,19	42,32	6,76	0,12
	LS_D_6	5,09	42,53	6,79	0,13
MAR (2026)	LS_MR_1	5,61	42,54	6,68	0,15
APR (2026)	LS_A_1	5,59	40,53	6,59	0,16
	LS_A_2	5,11	41,84	6,66	0,17
	LS_A_3	5,37	42,22	6,74	0,11
	LS_A_4	5,33	42,61	6,82	0,19
	LS_A_5	5,38	41,94	6,49	0,19
	LS_A_6	5,55	42,09	6,51	0,17
	LS_A_7	5,43	40,75	6,56	0,22
	LS_A_8	5,08	40,76	7,06	0,1
	LS_A_9	5,41	40,48	6,53	0,21
MAG (2026)	LS_M_1	5,02	41,52	6,8	0,13
	LS_M_2	5,29	42,12	6,89	0,24
	LS_M_3	5,46	41,74	6,59	0,18
	LS_M_4	5,45	42,93	6,82	0,15
	LS_M_5	5,32	41,6	6,31	0,18
	LS_M_6	5,07	39,15	6,38	0,15
	LS_M_7	5,37	42,14	6,5	0,17
	LS_M_8	5,37	42,84	6,57	0,17
GIU (2026)	LS_G_1	5,02	43,73	6,83	0,17
	LS_G_2	5,31	42,41	6,55	0,18
	LS_G_3	5,72	42,28	6,6	0,1
	LS_G_4	5,15	41,79	6,64	0,2
	LS_G_5	5,36	42,85	6,67	0,11
	LS_G_6	5,67	41,98	6,68	0,1
	LS_G_7	5,51	43,4	6,86	0,11
	LS_G_8	5,48	44,25	7,04	0,14

Appendice 3

Tabella A3.1: Valori di $\delta^{18}O$ (VSMOW, ‰) calcolati sui campioni di latte intero e scremato tal quali con i relativi errori/sd associate, suddivisi nei mesi di campionamento, la determinazione sui campioni è stata effettuata dai campioni prelevati dal mese novembre 2025.

Mese	ID campione	$\delta^{18}O$ (VSMOW, ‰)	sd
NOV	L_N_1	-5,938128569	0,021206902
	L_N_2	-5,803735333	0,085251242
	L_N_3	-5,920030029	0,09342986
	L_N_4	-5,90503467	0,035353383
	L_N_5	-5,925538069	0,028891463
	L_N_6	-5,897612248	0,093655539
	L_N_7	-6,344843564	0,058172829
	L_N_8	-6,542600679	0,079026037
DIC	L_D_1	-6,32817487	0,036958966
	L_D_2	-6,742702783	0,077920856
	L_D_3	-6,537099491	0,337863162
	L_D_4	-6,568898563	0,027015556
	L_D_5	-6,466879581	0,094255199
	L_D_6	-6,315398717	0,063855918
MAR	L_MR_1	-6,19	0
APR	L_A_1	-6,013795667	0,185626218
	L_A_2	-4,27	0,113137085
	L_A_3	-5,531656333	0,061122183
	L_A_4	-5,7825985	0,077696186
	L_A_5	-5,952627333	0,06064791
	L_A_6	-6,031004667	0,053374142
	L_A_7	-6,114643667	0,085191066
	L_A_8	-6,294005333	0,047572907
	L_A_9	-5,729982333	0,073812778
MAG	L_M_1	-5,795030333	0,092387363
	L_M_2	-5,758633	0,084480876
	L_M_3	-5,5174515	0,053939165
	L_M_4	-5,649697844	0,154370359
	L_M_5	-5,96228	0,050255153

	L_M_6	-5,645093333	0,099230832
	L_M_7	-5,42926	0,01443912
	L_M_8	-5,309443333	0,041183279
GIU	L_G_1	-5,335003333	0,049662858
	L_G_2	-5,21002	0,052990725
	L_G_3	-5,295316667	0,082103439
	L_G_4	-5,128113333	0,082440284
	L_G_5	-5,322533333	0,063935089
	L_G_6	-5,164866667	0,063135288
	L_G_7	-4,896666667	0,061101009
	L_G_8	-5,04	0,052915026
NOV	LS_N_1	-5,817742732	0,010712823
	LS_N_2	-5,594522161	0,052629744
	LS_N_3	-5,553976939	0,058130013
	LS_N_4	-5,714959555	0,141140279
	LS_N_5	-6,342355023	0,21255668
	LS_N_6	-5,774287695	0,14427925
	LS_N_7	-6,342355023	0,21255668
	LS_N_8	-6,156666667	0,040414519
DIC	LS_D_1	-6,165066953	0,050387315
	LS_D_2	-6,376938769	0,014660298
	LS_D_3	-6,252765767	0,021672608
	LS_D_4	-5,937199107	0,060956839
	LS_D_5	-5,955823698	0,044108002
	LS_D_6	-6,188871554	0,041380091
MAR	LS_MR_1	-6,141095488	0,038727158
APR	LS_A_1	-6,149799643	0,091185694
	LS_A_2	-5,425	0,06363961
	LS_A_3	-5,5846667	0,058340795
	LS_A_4	-5,549720548	0,066677504
	LS_A_5	-6,072919624	0,086238976
	LS_A_6	-5,881938394	0,023812739
	LS_A_7	-5,737275796	0,118579259
	LS_A_8	-4,83013816	0,099477531

	LS_A_9	-5,088107892	0,054062903
MAG	LS_M_1	-5,377500902	0,053233182
	LS_M_2	-5,661475593	0,05211655
	LS_M_3	-5,304462072	0,047645291
	LS_M_4	-5,421533357	0,017123862
	LS_M_5	-5,647774192	0,010076806
	LS_M_6	-5,48547852	0,04136823
	LS_M_7	-5,238987613	0,026050014
	LS_M_8	-5,049628227	0,074662017
GIU	LS_G_1	-5,066994942	0,068120578
	LS_G_2	-4,937276468	0,080160848
	LS_G_3	-5,094055943	0,050361819
	LS_G_4	-4,860893467	0,083897952
	LS_G_5	-5,031257059	0,074617113
	LS_G_6	-4,928789267	0,028660706
	LS_G_7	-4,787707683	0,05308178
	LS_G_8	-4,723333333	0,056862407