

# E TU CHE ANANAS SEI?

A cura di Emma Ida Bardelli, Alessandra Benedetti, Martina Gheller, Olimpia Lamboglia e Giorgia Lauretta

## INTRODUZIONE

Il percorso di PCTO della 4 B LSO dell'anno 2024/2025, intitolato "E tu che Ananas sei?" Si è svolto presso l'Università degli Studi di Milano e, nello specifico, nel dipartimento di Chimica di via Golgi ed ha avuto una durata totale di 15 ore, divise in due giorni (19 e 20 febbraio 2025). Si tratta di un progetto scientifico, che consente agli studenti di esplorare direttamente i diversi aspetti della ricerca e della sperimentazione nell'ambito della chimica.

Il progetto si divide in tre ambiti di indagine: vi è il laboratorio di Organica, in cui ci siamo occupati dell'estrazione di carotenoidi a partire da un Ananas, il laboratorio di Analitica, in cui ci siamo recati per determinare la quantità precisa di carotenoidi estratti, e il laboratorio di Chemiometria, in cui abbiamo identificato le diverse varietà di Ananas, a partire dai dati ricavati precedentemente.

### **Primo giorno: 19/02/2025**

Il primo giorno, ci siamo ritrovati nell'atrio centrale del Dipartimento di Chimica e, subito dopo, abbiamo assistito alle 9:30 ad una breve presentazione dell'esperienza a cura del professor Sergio Rossi, che ci ha fornito importanti informazioni in merito al frutto dell'Ananas e alla sua composizione.

Successivamente, intorno alle 10:30, ci siamo recati al Laboratorio di Chimica Organica, dove abbiamo condotto la parte più pratica e manuale del progetto e siamo rimasti fino alle 17:15, orario di termine dell'esperienza.

## PARTE PRIMA: PREMESSA TEORICA

### Introduzione sull'Ananas

L'ananas è un frutto tropicale, particolarmente apprezzato per il suo sapore dolce e il suo aroma, che contiene una serie di composti volatili dal profumo caratteristico; è una fonte di composti bioattivi, fibre alimentari, minerali e vitamine, molto benefiche per la salute.

Si pensa che l'Ananas sia originario del Brasile, in Sud America e il suo nome "anana" deriva dal termine "nana" (che significa profumo) con cui la chiamavano gli Indios, che per primi hanno iniziato a coltivarlo.

Gli spagnoli, successivamente, la hanno chiamata “pigna delle Indie” per la somiglianza con i frutti del pino e gli europei “pigna reale” perché, a causa del suo costo, era accessibile solo ai re. Il termine oggi usato “ananas” è composta da *ain* e *anas*, parole che in arabo significano “occhio umano” e questo deriva dal fatto che le scaglie che ricoprono la sua scorza ricordano propriamente la forma di un occhio.

L’Ananas è, al giorno d’oggi, il terzo frutto più coltivato al mondo, successivo solo alle banane e agli agrumi.

Esistono più di cento varietà di Ananas e la predominante è la “Smooth Cayenne”, che recentemente è stata sostituita dall’ibrido “MD-2”, sviluppato alle Hawaii e poi introdotto in Costa Rica.

Si riportano di seguito le principali varietà di Ananas con le loro principali caratteristiche.

Gruppo	Varietà	Peso (Kg)	Colore polpa
Cayenne	<b>Smooth Cayenne</b> , Sarawak, Hilo, Champaka, Kew, N36, St. Michel	2-3	Giallo chiaro
Cayenne hybrids (extra sweet)	Gold, <b>MD2</b> , <b>Del Monte Gold</b>	3	Giallo scuro
Queen	<b>Queen Victoria</b> , Moris, Ripley, Mauritius, Alexandra, Yankee, Comte de Paris, MacGregor, Jaldhup, Lakhat	0,8-1,5	Giallo oro
Spanish	Josapine, Mas Merah, Red Spanish, Singapore, Red Ruby, Mamerah	1-2	Giallo oro
Pernambuco	Perola, Pernambuco, <b>Sugar Loaf</b> , Abacaxi	1-5	Bianca
Modilonus e Perolera	Perolera, Manzana, Monte Liro	3-4	Bianca

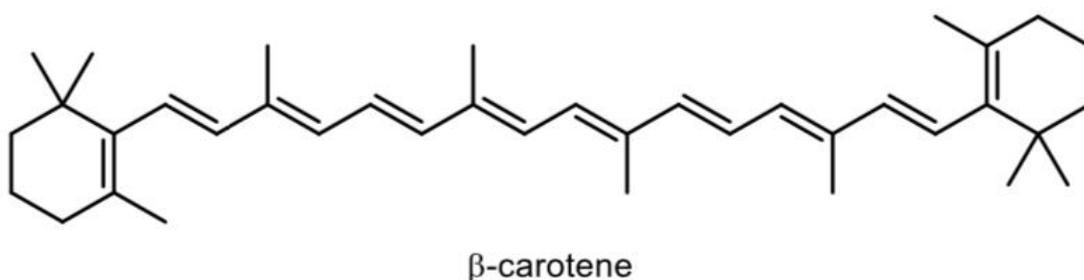
L’Ananas non è un frutto unico, ma un “frutto multiplo”, in cui più fiori producono una bacca, che si fonde con quelle vicine, per formare propriamente un Ananas. Ecco di seguito “l’immagine esplicativa.



### Composizione chimica dell'Ananas

L'Ananas è composto da Vitamina A, Vitamina C e Vitamina E e contiene un enzima proteolitico, la cosiddetta "bromelina", che aiuta il processo di digestione, attraverso la scomposizione delle proteine.

L'Ananas, inoltre, presenta un colore tendente al giallo, per la presenza dei "Carotenoidi". Nel 1831, Wackenroder isola una miscela di  $\beta$ -carotene e acidi grassi, a partire dalle carote e, da questo momento, si effettuano grandi scoperte in merito alla struttura chimica del  $\beta$ -carotene.



Il  $\beta$ -carotene, quando entra nell'organismo, viene convertito in vitamina A; in ogni caso, un eccesso di  $\beta$ -carotene nel sangue può alterare temporaneamente il colore della pelle, rendendola di colore giallo-arancione. Questa condizione è comunque reversibile ed innocua.

La concentrazione totale dei carotenoidi in un Ananas della stessa varietà è costante, seppur compresa in un certo intervallo di variabilità. È possibile, di conseguenza, identificare la varietà di un Ananas, in funzione del contenuto di carotenoidi: è proprio questo l'obiettivo di questa esperienza di PCTO.

Ogni gruppo, infatti, disporrà di due Ananas, di due varietà diverse e, a partire dalla concentrazione dei carotenoidi e del  $\beta$ -carotene, potrà identificare se si tratta di una o dell'altra. Si riportano le principali varietà di Ananas e il range di valori di riferimento.

Varietà	Smooth cayenne	Queen Victoria	MD-2	Sugar Loaf
Carotenoidi totali	180 – 220 $\mu\text{g}$	372 – 758 $\mu\text{g}$	302 – 432 $\mu\text{g}$	~ 29 $\mu\text{g}$
$\beta$ -carotene	17 $\pm$ 1 $\mu\text{g}$	87 $\pm$ 32 $\mu\text{g}$	22 $\pm$ 4 $\mu\text{g}$	none

## PARTE PRIMA: ESTRAZIONE DEL $\beta$ -CAROTENE

Il primo giorno ci siamo recati all'Università degli Studi di Milano, al dipartimento di Chimica Organica, per occuparci dell'estrazione del  $\beta$ -carotene e della sua analisi qualitativa.

Abbiamo iniziato con una breve lezione teorica della durata di circa un'ora, nella quale ci hanno esposto i vari tipi di ananas, la loro diffusione, le loro caratteristiche e come classificarli in base alla quantità di  $\beta$ -carotene presente. Inoltre, ci hanno anche esposto la sua struttura chimica e le malattie ad esso correlate.

Successivamente, ci siamo recati al laboratorio di Chimica Organica, situato nel settore Golgi, dove abbiamo iniziato il procedimento di estrazione. La prima parte dell'esperienza è, a sua volta, stata suddivisa in tre fasi.

### Prima fase: estrazione delle componenti organiche

Prima del nostro arrivo, i tecnici avevano già portato a termine il primo passaggio, ovvero rimuovere con un coltello la corona di foglie, tagliando a circa 1 cm dalla polpa. E poi, usando uno sbuccia ananas, rimuovere il succo e la polpa, e trasferirli all'interno del cristallizzatore; a seconda della dimensione dell'ananas, potrebbe rimanere della polpa attaccata alla scorza, da recuperare utilizzando un coltello.

Dunque, al nostro arrivo, siamo partiti dal secondo passaggio, che richiede di sminuzzare la polpa e il torsolo centrale in piccoli pezzi, utilizzando delle forbici. Poi, con l'aiuto di una rete a maglie fini, spremere manualmente circa 300 g di ananas, recuperando il succo di ananas all'interno di un becher da 500 mL, per poi pesare ciò che abbiamo ottenuto. Per il primo ananas, da noi denominato Gipsy, abbiamo pesato 313,30 g, mentre, per il secondo, ovvero Jimmy, 302,35 g.

Successivamente, trasferire il residuo solido, ovvero gli avanzi della polpa precedentemente filtrata, in una beuta da 500 mL e aggiungere 75 mL di Esano. Posizionare il composto su un agitatore magnetico, e inserire al suo interno la barra magnetica, che, mediante la sua rotazione, mescola il contenuto del becher. Lasciare agire il macchinario per 10 minuti. Poi, travasare il tutto nel cristallizzatore e comprimere la polpa con un tappo di vetro e recuperare l'estratto, con la rete a maglie fini, unendolo con il succo d'ananas precedentemente filtrato.

Dopo, trasferire il liquido all'interno di un imbuto separatore e aggiungere 300 mL di Esano. Agitare con molta energia, in modo da far separare le fasi e ripetere questo procedimento 3 volte. Se si osserva la formazione di emulsione, rimuovere quanta più fase acquosa possibile e successivamente aggiungere 20 mL di una soluzione satura di NaCl.

Proseguiamo separando le fasi e recuperando quella organica in una beuta da 1 L. Se è presente una forte emulsione, aggiungere altri 300 mL di Esano.

### Seconda fase: estrazione e saponificazione

Come prima cosa, in una beuta da 1 L, preparare 250 mL di una miscela al 10% di KOH in metanolo, ovvero una soluzione in cui il 10% del peso è costituito da idrossido di potassio, mentre il restante da metanolo. Riposizionare la miscela sull'agitatore magnetico e lasciare agitare, fino a quando tutto il solido non si sarà sciolto. Poi aggiungere delicatamente tutto l'estratto di ananas.

In seguito, oscurare la beuta con l'utilizzo di un pezzo di carta d'alluminio, e lasciare agitare per circa 2 ore.

Poi, trasferire la miscela in un imbuto separatore da 1 L, separare le fasi e lavare la fase organica a più riprese, con 150 mL di acqua, fino a raggiungere il pH neutro. Realizzare, con l'utilizzo di carta filtrante, un filtro sul quale distillare la miscela bifasica.

Dopo, recuperare la fase organica all'interno di una beuta da 500 mL e anidrificare con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ovvero rimuovere l'acqua con l'uso di solfato di sodio. Successivamente, trasferirla in un pallone da 500 mL, per poi rimuovere il solvente al rotavapor (che serve per rimuovere in modo efficiente i solventi dai campioni applicando calore e vuoto), prestando attenzione a non riscaldare la miscela.

Infine, riprendere il tutto con 5 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (diclorometano) e trasferire in una provetta etichettata, con il nome da noi dato al composto, e tarata da 50 mL.

### Terza fase: TLC e analisi qualitativa della miscela estratta

Innanzitutto, eseguire una TLC (ovvero una cromatografia su strato sottile, una tecnica di separazione dei componenti di una miscela, basata sulla distribuzione dei suoi componenti tra due fasi, una stazionaria e una mobile, che si muove lungo una direzione definita) del grezzo di reazione, depositando un riferimento di  $\beta$ -carotene [con eluente esano: AcOEt 1:1 (la lastra viene immersa in una camera di sviluppo contenente l'eluente, ovvero la fase mobile, in questo caso una miscela esano:acetato di etile in rapporto uno a uno; l'eluente risale per capillarità, trascinando i componenti della miscela a velocità diverse in base alla loro affinità con la fase mobile e quella stazionaria) e  $R_f=0,93$  (ovvero il fattore di ritenzione, il rapporto tra la distanza percorsa dal composto e quella dal fronte del solvente; se lo spot del grezzo contiene una macchia alla stessa altezza del  $\beta$ -carotene, il cui fattore di ritenzione  $R_f$  è 0,93, significa che nel campione è presente solo del  $\beta$ -carotene; se, invece, ci sono più spot, il grezzo contiene anche altri composti, che sarebbero delle impurità)].

Poi, rimuovere tutto il solvente mediante rotavapor.

In seguito, pesare il grezzo ottenuto. Per calcolarlo, bisogna considerare la differenza tra il peso della provetta piena e quella vuota. Per quanto riguarda Gipsy, la provetta piena pesava 14,9188 g e quella vuota 14,8100 g. Dunque, il peso dell'estratto ottenuto era di 0,1088 g. Mentre, per Jimmy, il peso della provetta piena era di 14,8889 g e quella vuota di 14,7834 g. Quindi, il peso dell'estratto ottenuto era di 0,1055 g.

Infine, conservare l'estratto in frigorifero, da utilizzare per le successive analisi.



### **Secondo giorno: 20/02/2025**

Il secondo giorno ci siamo ritrovato presso il settore didattico e, alle 9:30, la professoressa Monica Civera ci ha presentato le tecniche analitiche, che, successivamente, abbiamo messo in atto nel Laboratorio di Chimica Analitica, dove ci siamo recati intorno alle 10:30.

Dopo la pausa pranzo, alle ore 14:00, abbiamo assistito ad una presentazione, che ci ha fornito indicazioni orientanti, nell'ambito della Chimica e il suo corso di Laurea. Alle 14:30, infine, ci siamo diretti verso il Laboratorio di Informatica per svolgere le attività connesse alla Chemiometria e per le ultime analisi e abbiamo scoperto le due diverse varietà di Ananas di cui ciascun gruppo disponeva. Alle 16:30 abbiamo, quindi, tratto le conclusioni dell'esperienza e alle 17:15 ci siamo incamminati sulla via del ritorno.

## PARTE SECONDA: PREMESSA TEORICA

Il secondo giorno siamo andati in un laboratorio di chimica analitica, presso il dipartimento di chimica dell'università statale di Milano, per svolgere l'analisi quantitativa del  $\beta$ -carotene estratto.

La tecnica utilizzata per la quantizzazione si chiama Elettroanalisi, ovvero, un metodo quantitativo per determinare la concentrazione di una specie in soluzione con la variazione di una grandezza elettrochimica, come il potenziale elettrico o l'intensità di corrente.

Per svolgere la misura si applica un potenziale variabile all'analita, ovvero, la soluzione che stiamo analizzando, in modo che si verifica una reazione di ossido-riduzione, che permetta di misurare una corrente.

Per fare ciò, si utilizzano tre elettrodi:

- Un elettrodo di lavoro, calomelano saturo, dove si verifica la reazione redox dell'analita.
- Un controelettrodo, platino, dove passano le correnti misurate.
- Un elettrodo di riferimento, glassy carbon, utilizzato per variare il potenziale dell'elettrodo di lavoro.

Quindi, ci sono tre elettrodi, invece che due, in modo da permettere una misura più precisa. Gli elettrodi sono collegati a un potenziostato controllato da un software

SI sfrutta la legge  $i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi T}}$  dove la corrente( $i$ ) è direttamente proporzionale all'assorbanza( $A$ ), per ottenere una retta di taratura, ovvero, un'analisi di tipo quantitativo, che permette di tracciare una retta in base alla concentrazione di un determinato composto in più soluzioni. Gli altri valori sono il numero di elettroni( $n$ ), la costante di Faraday( $F=9,6485 \cdot 10^4 \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), l'area dell'elettrodo( $A$ ), il coefficiente di diffusione( $D$ ) e il tempo( $T$ ).



## PARTE SECONDA: QUANTIZZAZIONE DEL $\beta$ -CAROTENE

In primo luogo, per poter effettuare la misura, è necessario preparare una soluzione madre di  $\beta$ -carotene a concentrazione  $10^{-3}\text{M}$ , disciogliendo 6mg della medesima sostanza in  $10\text{cm}^3$  di diclorometano. La massa di  $\beta$ -carotene è misurata su una bilancia molto sensibile, in modo da ottenere la quantità corretta. Questa soluzione viene messa in un matraccio di volume  $10\text{cm}^3$  verrà utilizzata come riferimento per l'analisi del campione a concentrazione incognita estratto in laboratorio.



In secondo luogo, si prepara a parte in un becher una soluzione di circa  $25\text{cm}^3$  di diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e vi si aggiunge circa 0.855 g di tetrabuttilammonio perclorato ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{N}(\text{ClO}_4)$ ), ottenendo così una soluzione di concentrazione uguale a 0.1 M. Questa soluzione la si versa in un matraccio con capacità di  $25\text{cm}^3$ .

Successivamente, si inseriscono  $10\text{cm}^3$  di quest'ultima soluzione in un altro becher, poi si immergono i tre elettrodi e si registra la misura del bianco, ovvero, una miscela in tutto e per tutto uguale al campione da analizzare ma priva degli analiti di interesse, in voltammetria ciclica. La voltammetria ciclica è una metodica elettrochimica potenziodinamica basata sull'applicazione di un potenziale a forma di onda triangolare a un elettrodo stazionario immerso in una soluzione non agitata.

si deve, poi, registrare la misura del bianco in voltammetria differenziale ad impulsi, ripetendo la misura 2 o 3 volte, verificando di ottenere un segnale stabile.

La voltammetria differenziale a impulsi è una tecnica elettrochimica che applica impulsi di potenziale incrementali, misurando la differenza di corrente alla fine di ogni impulso. Questo aumenta la sensibilità e riduce il rumore di fondo, permettendo di analizzare piccole quantità di analiti.

Dopodiché, si aggiungono al becher i volumi di soluzione madre riportati in tabella (senza svuotare il contenuto del becher), per ottenere una retta di taratura. Tra una misura e l'altra, è necessario agitare per qualche secondo

$c$ ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	Volume di soluzione madre ( $\text{cm}^3$ )
13.4	+ 0.5
26.8	+ 0.5 (totale aggiunto 1)
40.3	+ 0.5 (totale aggiunto 1.5)
53.7	+ 0.5 (totale aggiunto 2)

per garantire che la soluzione sia bene disciolta. Non si deve agitare durante le letture.

Per ogni voltammeteria ottenuta la seguente tabella, prendendo le altezze massime, che rappresentano la corrente, dei picchi con il programma del potenziostato raffigurato sul computer utilizzato per analizzare l'analita.

c(mg dm <sup>-3</sup> )	I picco (E-0.51V)	II picco (E-0.57V)	III picco (E-0.63V)	IV picco (E-0,72V)	V picco (E-0.82V)
26.8	5,68E-7	5,23E-7	5,00E-7	5,07E-7	6,19E-7
40.3	1,11E-6	8,00E-7	5,95E-7	6,48E-7	9,96E-7
53.7	1,26E-6	1,18E-6	6,93E-7	7,46E-7	1,21E-6
64,1	1,44E-6	1,50E-6	7,13E-7	7,46E-7	1,19E-6

Successivamente, si lavora sull'estratto di  $\beta$ -carotene ottenuto sperimentalmente dall'ananas.

In primo luogo si scioglie l'estratto in una soluzione di 2cm<sup>3</sup> di diclorometano. Poi si prelevano 0.5cm<sup>3</sup> da diluire ulteriormente in 10cm<sup>3</sup> di diclorometano, cui si aggiungono 0,342g di tetrabuttilammonio perclorato.

Quindi, si ripete il procedimento d'analisi con il software e il potenziostato, registrando la voltammeteria differenziale ad impulsi.

Infine, si compila la seguente tabella con le altezze dei picchi, che rappresentano la corrente, registrate con il programma del potenziostato.

Diluizione	I picco (E-0.51V)	II picco (E-0.57V)	III picco (E-0.63V)	IV picco (E-0,72V)	V picco (E-0.82V)
/	3,97E-7	6,22E-7	4,70E-7	5,29E-7	6,16E-7

Questi dati serviranno per la parte successiva, ovvero, il laboratorio di chemiometria, dove verrà definitivamente quantizzato il  $\beta$ -carotene estratto.

## PARTE TERZA: CHEMIOMETRIA

La chemiometria, secondo la definizione dell'International Chemometrics Society (ICS) è "la scienza di relazionare le misure effettuate su un sistema o

su un processo chimici allo stato del sistema via applicazione di metodi matematici o statistici”.

La chemiometria quindi si applica a diverse discipline ed ha l'obiettivo di estrarre la massima informazione possibile sul sistema in esame attraverso l'analisi di dati e fornire in merito a ciò una rappresentazione grafica.

Grazie al sempre continuo sviluppo nell'ambito tecnologico, ci sono diversi modi con cui è possibile analizzare i dati sperimentali. Noi abbiamo utilizzato Excel. Per verificare il tipo di ananas su cui avevamo lavorato, abbiamo inserito i dati raccolti durante le esperienze laboratoriali nelle caselle di Excel, nelle quali erano stati già impostati i calcoli da svolgere.

Ecco i passaggi che abbiamo eseguito:

1. Utilizziamo Excel per determinare l'equazione della regressione lineare utilizzando i valori dell'altezza di un picco;
2. Costruiamo un grafico per visualizzarla;
3. Calcoliamo la concentrazione di carotenoidi nel campione incognito mediante l'equazione della retta;
4. Calcoliamo la quantità di carotenoidi per 100 g di ananas in polpa;
5. Lo confrontiamo con i dati noti per capire quale sia la tipologia di ananas di origine.

Calcolo la quantità di carotenoidi presenti in 100 g di ananas

- Dalla curva di calibrazione si ottiene la concentrazione mg/L di carotenoidi

$$\frac{y_{inc} - c}{m} = x_{inc} \text{ mg/L di carotenoidi}$$

1. Per 0,01 L (V = Volume matraccio) e P2 mg di estratto trasferito nel matraccio i mg di carotenoidi si calcolano così:

$$\left(\frac{x_{inc} \text{ mg di carotenoidi}}{L}\right)(0,01 \text{ L matraccio}) = x_1 \text{ mg di carotenoidi per P2 mg}$$

di estratto;

Calcolo la quantità di carotenoidi in 100g di ananas

1.  $\left(\frac{x_{inc} \text{ mg di carotenoidi}}{L}\right)(0,01 \text{ L matraccio}) = X_1 \text{ mg di carotenoidi per P2 di estratto}$

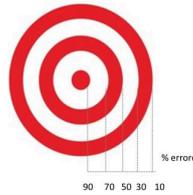
2.  $X_1 : P2 = X_2(\text{mg}) : A(\text{mg})$  di polpa pesata iniziale  $\rightarrow X_2(\text{mg})$  di carotenoidi

$$\text{totali} \rightarrow X_2(\text{mg}) = \frac{A(\text{mg}) * X_1(\text{mg})}{P2(\text{mg})}$$

3.  $\text{mg di carotenoidi in } 100\text{g} = \frac{X_2(\text{mg}) * 100\text{g}}{A \text{ iniziale in g}}$

$$\text{Errore} = \frac{(\text{mg di carotenoidi})_{\text{gruppoA}}}{\dots}$$

LABORATORIO DI CHEMIOMETRIA



$$\text{Errore} = \frac{(\text{mg di carotenoidi})_{\text{gruppoA}} - \text{Media mg di carotenoidi dei campioni della stessa tipologia di ananas}}{\text{Media mg di carotenoidi dei campioni della stessa tipologia di ananas}} * 100$$

Dopo questo lavoro abbiamo verificato che i nostri ananas fossero di tipo Gold del Monte (Gipsy) e Queen Victoria/baby (Jimmy).



*Grazie a tutti per la partecipazione!!! 🍌*



