

RISOLUZIONE OIV-OENO 728-2025

DETERMINAZIONE DEI RAPPORTI ISOTOPICI $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ E $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ DEL CHITOSANO MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA ISOTOPICA

L'ASSEMBLEA GENERALE,

VISTO l'articolo 2, paragrafo 2 iv dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

CONSIDERATI i lavori del Gruppo di esperti "Specificazione dei prodotti enologici",

DECIDE su proposta della Commissione II "Enologia", di modificare la monografia COEI-1-CHITOS del capitolo I del *Codex enologico internazionale* mediante l'aggiunta della seguente frase in corsivo al punto 5.1.2 "Determinazione dell'origine": *Il metodo descritto nell'allegato VIII e i limiti riportati per i diversi rapporti isotopici possono essere utilizzati per determinare l'origine del chitosano (se da crostaceo o da fungo),*

DECIDE, su proposta della Commissione II "Enologia", di aggiungere il seguente metodo come allegato VIII alla monografia COEI-1-CHITOS del capitolo I del *Codex enologico internazionale*:

ALLEGATO VIII

DETERMINAZIONE DEI RAPPORTI ISOTOPICI $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ E $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ DEL CHITOSANO MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA ISOTOPICA

INTRODUZIONE

Il chitosano è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami $\alpha(1-4)$ con un gran numero di applicazioni commerciali. In enologia è utilizzato come antiossidante, chiarificante, chelante dei metalli e per il controllo microbiologico riducendo il ricorso ai solfiti.

La produzione di chitosano avviene per deacetilazione della chitina. Essa può derivare dall'esoscheletro dei crostacei o dal micelio fungino. In campo enologico è consentito esclusivamente l'utilizzo del chitosano ottenuto dalla chitina da fungo.

I dati presenti in letteratura dimostrano che i rapporti isotopici $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ del chitosano sono in grado di differenziare il prodotto proveniente dall'esoscheletro dei

crostacei da quello da micelio fungino.

Il metodo qui descritto e i limiti riportati per i diversi rapporti isotopici possono essere utilizzati per determinare l'origine del chitosano (se da crostaceo o da fungo).

AVVISO: Alcuni reagenti utilizzati in questo procedimento sono pericolosi: prestare particolare attenzione durante il loro utilizzo. Si raccomanda all'analista di laboratorio di seguire le istruzioni indicate sull'etichetta posta sul contenitore del prodotto e di consultare le schede di dati di sicurezza per informazioni specifiche sui pericoli dei reagenti utilizzati e sul loro smaltimento.

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

L'obiettivo del metodo è di analizzare i rapporti isotopici $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ del chitosano mediante tecniche di spettrometria di massa isotopica (IRMS).

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Ai fini del presente documento, si applicano le definizioni seguenti:

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: rapporto tra gli isotopi carbonio-13 e carbonio-12 per un dato campione.

$\delta^{13}\text{C}$: rapporto tra gli isotopi carbonio-13 (^{13}C) e carbonio-12 (^{12}C) espresso in delta per mille (‰).

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$: rapporto tra gli isotopi azoto-15 e azoto-14 per un dato campione.

$\delta^{15}\text{N}$: rapporto tra gli isotopi azoto-15 e azoto-14 espresso in delta per mille (‰).

V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite): standard internazionale di riferimento per il calcolo del $\delta^{13}\text{C}$.

V-AIR (Air): standard internazionale di riferimento per il calcolo del $\delta^{15}\text{N}$.

3. PRINCIPIO

Si analizza il chitosano. I rapporti tra gli isotopi stabili di C e N vengono analizzati mediante uno spettrometro di massa isotopica (IRMS) interfacciato con un analizzatore elementare (EA) a partire dalle correnti ioniche:

- $m/z = 44$ ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) e $m/z = 45$ ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) prodotte dal biossido di carbonio ottenuto dalla combustione del campione nell'analizzatore elementare,

- $m/z = 28$ ($^{14}\text{N}^2$) e $m/z = 29$ ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) prodotte dall'azoto ottenuto dalla combustione del campione nell'analizzatore elementare.

4. REAGENTI E MATERIALI

I reagenti e materiali di consumo dipendono dall'apparecchiatura utilizzata dal laboratorio. Per la combustione del campione sono in genere utilizzati analizzatori elementari. Tali sistemi possono essere equipaggiati con sistemi automatici per l'introduzione di campioni posti in capsule metalliche sigillate.

Il laboratorio può utilizzare qualunque materiale di riferimento internazionale certificato oltre a quelli indicati in Tabella al punto 4.3.

4.1. Materiali di consumo

4.1.1. Alcool etilico assoluto [CAS 64-17-5].

4.1.2. Elio per analisi [CAS 07440-59-7].

4.1.3. Ossigeno per analisi [CAS 07782-44-7].

4.1.4. Reagenti di ossidazione e riduzione per il forno e il sistema di combustione, come ossido di rame (II) per analisi elementare [N. CAS 1317-38-0].

4.1.5. Essiccante per eliminare l'acqua prodotta dalla combustione. Ad esempio: anidrone per analisi elementare (perclorato di magnesio) [N. CAS 10034-81-8]. Non necessario nel caso di apparecchiature dotate di sistema di eliminazione dell'acqua tramite trappola criogenica o capillare che sia selettivamente permeabile.

4.1.6. Capsule in stagno monouso.

4.2. Standard di lavoro

4.2.1. Biossido di carbonio (CO_2) [CAS 00124-38-9] con purezza non inferiore a 99,998 % e azoto (N_2) con purezza non inferiore a 99,999 % come gas di riferimento per la misurazione.

4.2.2. Standard di controllo e di lavoro con valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ calibrati rispetto a materiali di riferimento internazionali.

4.3. Materiali di riferimento più comunemente utilizzati con valori certificati di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$

Nome	Materiale	$\delta^{13}\text{C}$ rispetto a V-PDB ‰	$\delta^{15}\text{N}$ rispetto a AIR ‰
USGS40	Acido glutammico	$-26,39 \pm 0,04$	$-4,52 \pm 0,06$
USGS42	Polvere di capelli umani (Tibet)	$-21,09 \pm 0,10$	$+8,05 \pm 0,10$
USGS43	Polvere di capelli umani (India)	$-21,28 \pm 0,10$	$+8,44 \pm 0,10$
USGS54	Polvere di legno di <i>Pinus contorta</i> canadese	$-24,43 \pm 0,02$	$-2,42 \pm 0,32$
USGS55	Polvere di legno di ziricote messicano	$-27,13 \pm 0,02$	$-0,3 \pm 0,4$
USGS56	Polvere di legno <i>Berchemia zeyheri</i> sudafricano	$-24,34 \pm 0,01$	$+1,8 \pm 0,4$
USGS90	Farina di miglio da Toscana, Italia	$-13,75 \pm 0,06$	$+8,84 \pm 0,17$
IAEA-600	Caffeina	$-27,771 \pm 0,043$	$+1,0 \pm 0,2$

5. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura da laboratorio e in particolare:

5.1. Spettrometro di massa isotopica (IRMS)

Lo spettrometro di massa isotopica consente la determinazione del contenuto relativo dell'isotopo pesante rispetto a quello leggero del biossido di carbonio e azoto ottenuti dalla combustione, con una precisione interna dello 0,1‰ per C e dello 0,2‰ per N. La precisione interna è qui definita come la differenza tra due misurazioni dello stesso campione di gas.

Lo spettrometro di massa è generalmente dotato di una serie di collettori per

misurare contemporaneamente le correnti ioniche $m/z = 44, 45, 46$ o $m/z = 28, 29, 30$.

Misurando le intensità corrispondenti, il rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, ad esempio, è determinato dal rapporto delle intensità di $m/z = 45$ e $m/z = 44$ dopo le correzioni per la specie isobarica $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, il cui contributo può essere calcolato in funzione dell'intensità della corrente misurata per $m/z = 46$ e dell'abbondanza relativa di ^{18}O e ^{17}O (correzione di Craig).

Lo spettrometro di massa per la determinazione dei rapporti isotopici deve essere dotato di:

- Un doppio sistema di introduzione (sistema a doppio ingresso) per misurare in modo alternato il campione e uno standard di riferimento,
- Oppure di un sistema a flusso continuo che trasferisca quantitativamente nello spettrometro di massa i gas derivanti dalla combustione dei campioni e degli standard di lavoro.

5.2. Analizzatore elementare (EA)

Apparecchiatura per combustione in grado di convertire quantitativamente il campione in biossido di carbonio (in caso di combustione) e in grado di separare i gas ed eliminare l'acqua senza alcun frazionamento isotopico. L'apparecchiatura può essere un sistema a flusso continuo integrato nello spettrometro di massa o un sistema di combustione autonomo. Nell'ultimo caso, i gas vengono raccolti in contenitori speciali che sono poi interfacciati con l'IRMS.

5.3. Microbilancia analitica (min range 0-100 mg e precisione min 0,01 mg).

5.4. Centrifuga

5.5. Liofilizzatore o sistema di essiccazione

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione del campione per l'analisi

10 gr di chitosano vengono lavati per tre volte con una soluzione acquosa al 10% v/v di etanolo puriss. Il campione viene quindi centrifugato e liofilizzato.

6.2. Analisi dei rapporti isotopici

Per la misurazione strumentale, seguire la procedura raccomandata dai tecnici del fabbricante indicata nel manuale dello strumento.

La descrizione che segue si riferisce al procedimento utilizzato generalmente per la combustione o la pirolisi dei campioni mediante sistemi di combustione commerciali automatizzati. È possibile utilizzare altri metodi che assicurino la conversione quantitativa dei campioni in biossido di carbonio e azoto senza che vi sia perdita per evaporazione.

6.2.1. Inserimento dei campioni nelle capsule e analisi

- Utilizzare capsule, pinzette e un ripiano di preparazione puliti.
- Utilizzare capsule di stagno per la combustione.
- Prendere una capsula di dimensioni adatte con le pinzette.
- Introdurre nella capsula la quantità richiesta di campione utilizzando la spatola apposita.

Nota:

È necessario stabilire la corretta quantità di campione da pesare, tale per cui la quantità di CO₂ prodotta dal campione e quella dello standard di lavoro (o del materiale di riferimento) non differiscano di oltre il 50%. Per rientrare in questo range di accettabilità è necessario effettuare una misurazione preliminare che dia indicazioni sulla quantità di campione da pesare (se sconosciuta).

- Pesare con microbilancia analitica.
- Richiudere la capsula servendosi delle pinzette.
- Preparare almeno due capsule per ogni campione.
- Disporre adeguatamente le capsule nel tamburo per campioni dell'analizzatore elementare (se disponibile). Ogni capsula deve essere accuratamente identificata in ordine numerico.
- Disporre sistematicamente le capsule contenenti lo standard di lavoro all'inizio e alla fine della serie di campioni.
- Inserire regolarmente i campioni di controllo nella serie di campioni (ad es.

chitosano commerciale precedentemente calibrato, v. punto 4.2) per creare una carta di controllo.

6.2.2. Controllo e regolazione della strumentazione per l'analisi isotopica

- Per una combustione ottimale del campione regolare la temperatura dei forni dell'analizzatore elementare e i flussi di anidride carbonica, elio e ossigeno gassosi seguendo le istruzioni del fabbricante,
- Verificare l'assenza di perdite nel sistema per l'analisi elementare/pirolisi e la spettrometria di massa (ad es. controllando la corrente ionica per il rapporto $m/z = 40$, che corrisponde all'argon),
- Regolare lo spettrometro di massa seguendo le istruzioni del fabbricante,
- Prima di iniziare le misurazioni sui campioni verificare il sistema servendosi di campioni standard di lavoro.

6.2.3. Esecuzione delle misure

- Introdurre i campioni in successione nell'autocampionatore dell'analizzatore elementare. I gas prodotti dalla combustione di ogni campione vengono trasportati in successione verso lo spettrometro di massa, che misura le correnti ioniche. Il computer, interfacciato con la strumentazione, registra l'intensità delle correnti ioniche e calcola i valori δ per ciascun campione.

7. CALCOLI

7.1. Correzione ed espressione del dato isotopico

Secondo il protocollo IUPAC, i valori $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ sono espressi nella scala delta (‰) rispetto allo standard internazionale V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite) e AIR (aria), secondo l'equazione 1:

$$(1)\delta_{ref}(^iE/^jE, sample) = \left[\frac{R(^iE/^jE, sample)}{R(^iE/^jE, ref)} \right] - 1$$

dove *ref* è lo standard di misurazione internazionale; *campione* è il campione analizzato; $^1E/E$ è il rapporto isotopico tra isotopi più pesanti e più leggeri. I valori delta vengono moltiplicati per 1000 ed espressi in unità “per mil” (‰).

I dati sono solitamente forniti dallo strumento e si riferiscono ai gas standard utilizzati per l'analisi (CO_2 e N_2). Occorre procedere con la correzione e la normalizzazione dei dati ottenuti. Almeno due materiali di riferimento internazionali (v. tabella 4.3.) o standard di lavoro (precedentemente calibrati) devono essere posti all'inizio e alla fine della sequenza analitica e avere valori certificati agli estremi dell'intervallo di misura, sia per l'analisi del carbonio, sia per l'analisi dell'azoto. I due punti forniti dai materiali di riferimento (o standard di lavoro) vengono utilizzati per costruire una retta di interpolazione e calcolare la relativa equazione usata poi per correggere tutti i dati ottenuti.

7.2. Controllo di qualità delle analisi

- Il valore medio ottenuto per gli standard di lavoro o gli standard internazionali utilizzati dal laboratorio deve rientrare nell'intervallo di validità stabilito dallo stesso in fase di calibrazione o come indicato sul certificato.
- La differenza tra le due misurazioni ripetute dello stesso campione deve essere inferiore allo 0,3‰ per l'analisi del carbonio e dell'azoto.

7.3. Stima della ripetibilità e riproducibilità del metodo

Lo studio interlaboratorio organizzato nel 2024 (da giugno a settembre), con la partecipazione di nove diversi laboratori internazionali, ha permesso di stimare la ripetibilità e la riproducibilità del metodo. Gli studi di ripetibilità e riproducibilità sono stati condotti su sei campioni di chitosano in doppio cieco (per un totale di 12 campioni), di cui 4 provenienti da funghi e 2 da esoscheletri di crostacei, con differenti valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$. A ciascun laboratorio sono stati inoltre forniti due standard internazionali con valori certificati, l'acido L-glutammico USGS40 con valori certificati di $\delta^{13}\text{C} = -26,39\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N} = -4,52\text{‰}$ e il collagene di suino USGS89 con valori certificati di $\delta^{13}\text{C} = -18,13\text{‰}$ e $\delta^{15}\text{N} = +6,25\text{‰}$, al fine di correggere i dati con una retta a due punti. Sulla base dei risultati ottenuti, (riportati in tabella 1 e in tabella 2 dell'allegato 1) è possibile stimare i seguenti parametri di validazione:

$d^{13}C$ / ‰ vs V-PDB

Descrizione del campione	chitosano 1	chitosano 2	chitosano 3	chitosano 4	chitosano 5	chitosano 6
Numero di risultati validi	9	9	9	9	9	9
Numero di repliche	2	2	2	2	2	2
Media	-20,81	-25,36	-13,03	-25,73	-21,32	-14,04
S_r	0,04	0,07	0,09	0,07	0,07	0,08
S_R	0,14	0,09	0,23	0,10	0,16	0,21

$d^{15}N$ ‰ vs AIR

Descrizione del campione	chitosano 1	chitosano 2	chitosano 3	chitosano 4	chitosano 5	chitosano 6
Numero di risultati validi	9	9	9	9	9	9
Numero di repliche	2	2	2	2	2	2
Media	-5,39	5,05	-5,41	2,92	-4,55	-7,15
S_r	0,08	0,12	0,09	0,08	0,13	0,15
S_R	0,11	0,19	0,11	0,14	0,23	0,15

7.4. Ripetibilità e riproducibilità

Ripetibilità

La differenza assoluta tra due risultati individuali ottenuti su un campione identico da un operatore che utilizza lo stesso apparecchio, nell'intervallo di tempo più breve

possibile, supererà il limite di ripetibilità r in non più del 5% dei casi.

I valori accettati della deviazione standard relativa di ripetibilità (RSDr) sono pari allo 0,09‰ per il parametro $\delta^{13}\text{C}$ e allo 0,15‰ per il parametro $\delta^{15}\text{N}$.

Riproducibilità

La differenza assoluta tra due risultati individuali ottenuti su un campione identico e riportati da due laboratori diversi supererà la riproducibilità R in non più del 5% dei casi.

I valori accettati della deviazione standard relativa di riproducibilità (RSDR) sono pari allo 0,23‰ per il parametro $\delta^{13}\text{C}$ e allo 0,23‰ per il parametro $\delta^{15}\text{N}$.

8. DISCRIMINAZIONE TRA CHITOSANO DI ORIGINE FUNGINA E DA ESOSCHELETRO DI CROSTACEO

8.1. Valori limite al 95% del $\delta^{13}\text{C}$ e del $\delta^{15}\text{N}$ per un autentico chitosano di origine fungina

Sulla base della letteratura (Perini *et al.* 2020 e Claverie *et al.* 2023), il chitosano autentico di origine fungina presenta valori di $\delta^{13}\text{C}$ superiori a -14,2‰ o inferiori a -24,9‰ (dati disponibili nella citata rivista open access). In caso di chitosano con un valore di $\delta^{13}\text{C}$ compreso tra -24,9‰ e -25,1‰, questo dovrebbe essere analizzato per il rapporto $\delta^{15}\text{N}$ per confermarne l'origine fungina. In questo caso specifico, il valore di $\delta^{15}\text{N}$ deve essere superiore a +2,7‰.

8.2. Guida all'interpretazione dei dati isotopici

I campioni di chitosano saranno considerati di origine non fungina se i loro valori isotopici di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sono superiori o inferiori al limite stabilito al 95% per il chitosano di origine fungina, come definito al punto 8.1, più (per il limite superiore) o meno (per il limite inferiore) l'incertezza calcolata come $2 \times S_R$ (v. punto 7.4).

9. BIBLIOGRAFIA

1. Codex enologico internazionale e Codice internazionale delle pratiche enologiche. Disponibile all'indirizzo: <http://www.oiv.int/>. Monografia per il chitosano (OIV COEI-1-CHITOS), 2009.

2. Perini, M., Nardin, T., Venturelli, M., Pianezze, S., & Larcher, R. (2020). Stable isotope ratio analysis as a fast and simple method for identifying the origin of chitosan. *Food Hydrocolloids*, 101(105516), 105516.
3. Claverie, E., Perini, M., Onderwater, R. C. A., Pianezze, S., Larcher, R., Roosa, S., Yada, B., & Wattiez, R. (2023). Multiple Technology Approach Based on Stable Isotope Ratio Analysis, Fourier Transform Infrared Spectrometry and Thermogravimetric Analysis to Ensure the Fungal Origin of the Chitosan. *Molecules*, 28(11). <https://doi.org/10.3390/molecules28114324>

ALLEGATO VIII.1

In tabella 1 sono riportati i risultati di $\delta^{13}\text{C}$ forniti dai vari laboratori con l'indicazione dello Z-score.

Lab	Campione 7	Campione 12	Z-score	Campione 6	Campione 11	Z-score	Campione 1	Campione 9	Z-score
1	-20,75	-20,69	0,63	-25,38	-25,43	-0,54	-13,04	-13,10	-0,19
2	-20,74	-20,74	0,48	-25,26	-25,30	0,86	-12,77	-12,87	0,92
3	-20,65	-20,76	0,73	-25,30	-25,32	0,52	-13,30	-13,21	-1,01
4	-20,84	-20,78	-0,02	-25,30	-25,28	0,75	-12,79	-12,92	0,76
5	-21,16	-21,05	-2,12	-25,14	-25,40	0,97	-13,12	-13,26	-0,72
6	-20,71	-20,68	0,81	-25,37	-25,50	-0,88	-13,34	-13,29	-1,27
7	-20,80	-20,82	-0,02	-25,37	-25,37	-0,15	-12,60	-12,72	1,62
8	-20,72	-20,75	0,52	-25,38	-25,40	-0,37	-13,08	-13,12	-0,32
9	-20,95	-20,95	-1,02	-25,52	-25,40	-1,16	-13,11	-12,85	0,21
Media		-20,81			-25,36			-13,03	

Lab	Campione 5	Campione 8	Z-score	Campione 3	Campione 4	Z-score	Campione 2	Campione 10	Z-score
1	-25,77	-25,69	-0,02	-21,10	-21,19	1,07	-14,12	-14,13	-0,41
2	-25,61	-25,60	1,27	-21,49	-21,39	-0,72	-13,73	-13,86	1,17

3	-25,68	-25,68	0,49	-21,24	-21,30	0,31	-14,26	-14,30	-1,16
4	-25,65	-25,61	1,01	-21,33	-21,24	0,22	-13,89	-13,83	0,86
5	-25,81	-25,77	-0,64	-21,51	-21,72	-1,78	-14,19	-14,11	-0,53
6	-25,79	-25,88	-1,11	-21,17	-21,03	1,34	-14,20	-14,25	-0,89
7	-25,69	-25,67	0,49	-21,29	-21,25	0,31	-13,68	-13,75	1,55
8	-25,77	-25,81	-0,64	-21,39	-21,42	-0,51	-14,11	-14,19	-0,53
9	-25,68	-25,94	-0,85	-21,38	-21,35	-0,26	-13,91	-14,19	-0,05
Media		-25,73			-21,32			-14,04	

In tabella 2 sono riportati i risultati di $\delta^{15}\text{N}$ forniti dai vari laboratori con l'indicazione dello Z-score.

Lab	Campione 7	Campione 12	Z-score	Campione 6	Campione 11	Z-score	Campione 1	Campione 9	Z-score
1	-5,52	-5,49	-1,08	4,94	4,94	-0,59	-5,56	-5,50	-1,15
2	-5,30	-5,25	1,06	5,07	5,09	0,16	-5,36	-5,20	1,23
3	-5,40	-5,38	-0,01	5,01	5,01	-0,22	-5,41	-5,46	-0,24
4	-5,23	-5,41	0,64	5,11	4,79	-0,54	-5,29	-5,34	0,90
5	-5,43	-5,28	0,32	5,05	5,41	0,97	-5,33	-5,53	-0,20
6	-5,32	-5,19	1,24	4,73	4,79	-1,57	-5,39	-5,38	0,23
7	-5,55	-5,44	-0,99	5,12	5,01	0,08	-5,30	-5,57	-0,24
8	-5,50	-5,48	-0,94	5,08	5,10	0,22	-5,52	-5,50	-0,96
9	-5,39	-5,44	-0,24	5,30	5,35	1,49	-5,33	-5,40	0,42
Media		-5,39			5,05			-5,41	

Lab	Campione 5	Campione 8	Z-score	Campione 3	Campione 4	Z-score	Campione 2	Campione 10	Z-score
1	2,77	2,85	-0,73	-4,70	-4,49	-0,21	-7,23	-7,21	-0,47
2	3,02	2,92	0,37	-4,46	-4,63	0,01	-7,04	-6,87	1,25

3	2,95	2,93	0,17	-4,50	-4,46	0,29	-7,13	-7,11	0,18
4	2,76	2,64	-1,49	-5,07	-4,68	-1,41	-6,91	-7,39	-0,02
5	3,15	3,15	1,62	-4,46	-4,32	0,68	-7,19	-7,42	-1,03
6	2,73	2,92	-0,63	-4,85	-4,66	-0,90	-6,99	-6,98	1,06
7	2,85	2,88	-0,35	-4,65	-4,81	-0,79	-7,04	-7,28	-0,08
8	2,94	2,96	0,23	-4,31	-4,28	1,09	-7,22	-7,21	-0,44
9	3,14	2,93	0,82	-4,28	-4,24	1,24	-7,16	-7,27	-0,44
Media		2,92			-4,55			-7,15	