



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI  
DIPARTIMENTO DI CHIMICA**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE  
Indirizzo Scienze Chimiche**

**SVILUPPO E APPLICAZIONE  
DI METODI CROMATOGRAFICI PER  
LA DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DI  
COSTITUENTI MINORITARI DI PRODOTTI D'ALVEARE**

**Tesi di Dottorato del  
Dott. Marco Ciulu**

**Il Tutore  
Prof. Gavino Sanna**

**Il Direttore  
Prof. Giuseppe Suffritti**

**XXIII ciclo  
2007-2010**

## INTRODUZIONE

Il ruolo primario della dieta consiste nel fornire all'organismo le sostanze necessarie per soddisfare le richieste nutrizionali di un individuo. Esistono prove scientifiche che supportano l'ipotesi secondo cui alcuni alimenti o i componenti di alcuni alimenti, producano benefici fisiologici e psicologici sulla salute dell'uomo. Negli ultimi anni la ricerca nel campo delle scienze nutrizionali ha focalizzato la propria attenzione verso l'identificazione negli alimenti di sostanze biologicamente attive, in grado quindi di migliorare il benessere fisico e mentale dell'uomo e ridurre il rischio di malattie. Molti cibi tradizionali (frutta, verdura, soia, cereali, latte etc.) contengono sostanze potenzialmente capaci di avere un effetto positivo sulla salute; essi sono noti con il nome di alimenti funzionali, nutraceutici, terapeutici o superfoods.

Il concetto di alimenti funzionali nacque in Giappone negli anni '80 quando le autorità in campo medico, a fronte all'aumento dell'età media della popolazione e nel tentativo di migliorarne la qualità e le aspettative di vita, pensarono allo sviluppo mirato di alimenti capaci di prevenire l'insorgenza di patologie. Nonostante al momento non esistano in Europa disposizioni comunitarie che forniscano una definizione precisa di alimento funzionale, in base alle informazioni sino ad ora disponibili in letteratura possiamo indicare come tale un alimento quando esso dimostra in maniera oggettiva di avere effetti positivi su una o più funzioni dell'organismo, tali da andare oltre gli effetti nutrizionali normali e di rilievo per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la

riduzione del rischio di malattia. Tutti quegli alimenti che contengono determinati minerali, vitamine, acidi grassi o fibre alimentari, o quelli addizionati con sostanze biologicamente attive, come i principi di origine vegetale o gli antiossidanti, sono quindi alimenti funzionali.

Un alimento funzionale può essere naturale oppure ottenuto mediante eliminazione (o modifica) dei suoi costituenti. Talvolta è inoltre possibile rendere funzionale un prodotto alimentare attraverso l'aggiunta di sostanze specifiche quali vitamine, acidi grassi, fibre, peptidi bioattivi etc.

I prodotti dell'alveare (miele, gelatina reale e propoli) costituiscono un perfetto esempio di alimenti funzionali naturali, che non hanno subito processi di modifica della loro composizione chimica. Fra le loro proprietà funzionali, ricordiamo la loro capacità antiossidante e anti-infiammatoria, le proprietà antivirali, anti-ulcera e antibatteriche<sup>1</sup>.

Il miele, prodotto dalle api a partire dal nettare delle piante, è largamente utilizzato dalla medicina tradizionale in diverse culture, sebbene il suo impiego prevalente sia connesso con il suo ruolo di dolcificante. Nella sua composizione chimica troviamo più di 300 costituenti identificati, dei quali i più importanti sono acqua, fruttosio e glucosio. Tale composizione varia notevolmente in base a diversi fattori quali origine botanica, origine geografica, stagionalità, metodi di lavorazione etc. Il suo effetto benefico sull'apparato digerente e su quello respiratorio, la sua attività antibiotica unita a numerosi altri peculiari benefici sulla salute<sup>2</sup>, permettono di classificare il miele come alimento nutraceutico. La propoli, sostanza resinosa che le api utilizzano come difesa delle celle dell'alveare, fa anch'essa parte della medicina tradizionale. Come nel caso del miele, la sua composizione

---

<sup>1</sup> Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.A., Journal of food science, 73 (9), 117-124, (2008)

<sup>2</sup> <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e04.htm#2.4>

chimica varia in base a numerosi fattori quali le condizioni climatiche e ambientali. Molte delle proprietà biologiche della propoli sono ascrivibili alla presenza nella sua composizione chimica del feniletile estere dell'acido caffeico<sup>3,4,5</sup>. Infine, nella gelatina reale che rappresenta l'alimento esclusivo dell'ape regina, è stato rintracciato un elevato numero di sostanze biologicamente attive quali l'acido 10-idrossi-2-decenoico, proteine con proprietà antibatteriche e peptidi.

Il ruolo della chimica analitica è quello di fornire strumenti precisi e accurati che permettano di indagare sulla composizione chimica di tali alimenti. I fini sono molteplici: si va da quello di stabilire con assoluta certezza il legame esistente fra i costituenti chimici e gli effetti biologici, a quello di tutelare il consumatore da frodi e false affermazioni. Inoltre, è necessario individuare parametri di qualità laddove l'azione benefica possa essere correlata allo stato di freschezza e alle condizioni di conservazione, e riuscire a determinare l'origine di questi prodotti alimentari per consentire interventi di valorizzazione dei prodotti stessi anche a livello locale.

Da diversi anni il gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta questa Tesi di dottorato si occupa di sviluppare e validare nuove metodiche analitiche volte sia alla caratterizzazione del miele e di altri prodotti d'alveare che alla determinazione dei loro costituenti

---

<sup>3</sup> Draganova-Filipova M.N., Georgieva M.G., Peycheva E.N., Miloshev G.A., Sarafian V.S., Peychev L.P., *Folia medica* 50 (1), 53-59 (2008)

<sup>4</sup> Liao H.F., Chen Y.Y., Liu J.J., Hsu M.L., Shieh H.J., Liao H.J., Shien C.J., Shiao M.S., Chen Y.J., *J Agric Food Chem* 51, 7907-7912 (2003)

<sup>5</sup> Chen Y.J., Liao H.F., Tsai H.F., Wang S.Y., Ming-Shi Shiao M.S., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63(4), 1252-1261 (2005)

minoritari<sup>6,7,8,9,10</sup>.

Nello specifico, il lavoro sperimentale svolto per questa Tesi si articola in tre fasi. Nella prima fase si è focalizzata l'attenzione su uno dei mieli più pregiati dell'apicoltura della Sardegna, il miele di corbezzolo (*Arbutus Unedo*). In particolare è stato sviluppato un metodo atto alla definizione quali-quantitativa del profilo degli amminoacidi liberi presenti in questo tipo di miele, che è stato poi applicato a campioni provenienti da origini geografiche differenti al fine di valutare l'eventuale specificità di tale profilo in relazione all'origine botanica e la possibile variabilità in funzione dell'origine geografica. Nella seconda fase sono stati invece presi in considerazione le aldeidi e gli acidi furanici presenti nel miele, al fine di verificare in che modo questi potessero essere sfruttati come indici di freschezza per questo alimento. A tal proposito è stata messa a punto una metodica che consente la rapida determinazione simultanea di cinque diversi analiti senza alcun pretrattamento del campione. Infine, nella terza e ultima fase si è scelto di approfondire l'aspetto relativo alle vitamine idrosolubili. Sono stati quindi sviluppati due diversi metodi RP-HPLC per la loro determinazione sia nel miele che nella gelatina reale. Tutti i metodi analitici proposti sono stati sottoposti ad un protocollo completo di validazione attraverso la determinazione della precisione, dell'esattezza e dei limiti di rivelabilità e di quantificazione. E' stata inoltre valutata l'accettabilità dei risultati della validazione ottenuti in funzione degli scopi analitici prefigurati. Nei primi capitoli verranno delineate

---

<sup>6</sup> Scanu R., Spano N., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Sanna G., Tapparo A., J Chromatogr A 1090, 76-80 (2005)

<sup>7</sup> Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Tapparo A., Sanna G., Talanta 68, 1390-1395 (2006)

<sup>8</sup> Doro R., Tesi di laurea in Chimica, Dipartimento di Chimica, Università degli studi di Sassari (A.A. 2006-2007)

<sup>9</sup> Salis S., Tesi di laurea in Chimica, Dipartimento di Chimica, Università degli studi di Sassari (A.A. 2003-2004)

<sup>10</sup> Spano N., Ciulu M., Floris I., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Sanna G., Food Chem 108, 81-85, (2008)

le caratteristiche principali del miele e della gelatina reale e verranno approfonditi gli aspetti riguardanti la composizione chimica, le proprietà fisiche, le proprietà funzionali, la qualità e le tecniche di lavorazione. Nella seconda parte invece, verranno descritte le caratteristiche dei metodi sviluppati e sarà dato ampio spazio all'applicazione di suddetti metodi alle matrici prese in esame nonché alla discussione dei risultati ottenuti.

# CAPITOLO 1

## IL MIELE

### 1.1 ORIGINE

“Per miele si intende la sostanza dolce naturale che le api (*Apis Mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano, combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare.” Questa definizione, che compare nel Decreto Legislativo del 21 Maggio 2004 n. 179, attuazione della direttiva 2001/110/CE, spiega con esattezza cosa è il miele.

Esso consiste principalmente in una soluzione sovrasatura di zuccheri, principalmente fruttosio e glucosio, con piccole quantità di zuccheri superiori, enzimi, acidi, sali, sostanze aromatiche etc. E' prodotto dalle api a partire dal nettare dei fiori o dalla melata situata su alcune piante. Le differenze fra un miele ed un altro sono rilevabili non solo dall'analisi di laboratorio ma anche dalle sue caratteristiche organolettiche (aspetto, colore, aroma etc.).

Sulla base dell'origine botanica è possibile differenziare i *miei uniflorali*, quando essi derivano principalmente da una sola specie vegetale e presentano definite caratteristiche, i *miei multiflorali*, per i quali non è possibile definire un'origine prevalente e che possiedono caratteristiche diverse a seconda dell'insieme di specie nettariifere visitate dalle api, e infine i *miei di melata* che derivano essenzialmente dalla raccolta della melata (secrezione zuccherina emessa da alcuni insetti) da parte delle api.

### **1.1.1 Nettare**

Il nettare è un liquido zuccherino derivato dalla linfa dei vegetali superiori e secreto da particolari organi ghiandolari chiamati comunemente nettari. Questi sono in genere situati alla base dei petali, tuttavia la loro posizione sulla pianta può essere molto varia e vengono distinti nettari florali ed extraflorali a seconda che siano situati sul fiore o che si trovino su altre parti della pianta. L'origine e la secrezione del nettare sono influenzate da diversi fattori: alcuni interni e legati alla pianta (anatomia, fisiologia, caratteri genetici), altri esterni quali temperatura, luce, umidità, vento, latitudine, altitudine e natura del suolo. La stessa pianta, in condizioni diverse di altitudine o latitudine, o su terreni di diversa natura può, a parità di fattori climatici, dar luogo a produzioni nettariifere quantitativamente e qualitativamente molto variabili. Ad esempio, la produzione di nettare è più elevata nelle piante coltivate in alta montagna rispetto a quelle che crescono in pianura.

### **1.1.2 Melata**

Analogamente al nettare, anche la melata deriva dalla linfa delle piante ma mentre il nettare viene secreto attraverso un processo attivo, la melata è prodotta attraverso l'intervento di insetti parassiti che succhiano la linfa delle piante. Tali insetti, definiti semplicemente "produttori di melata", perforano il tessuto della pianta ospite assorbendo la linfa che scorre all'interno dei tubi cribrosi. La linfa è costituita principalmente da zuccheri mentre le sostanze azotate si trovano in quantità piuttosto esigue. Per procurarsi l'azoto necessario ai propri processi metabolici, gli insetti devono assorbire ed elaborare grandi quantità di linfa, espellendo il liquido zuccherino residuo come melata. Nelle nostre aree geografiche le piante interessate alla produzione di melata sono principalmente conifere, ma anche decidue non nettariifere (quercia, faggio, pioppo) e nettariifere (tiglio,

salice, acero). La produzione di melata è suscettibile di variazioni ancora superiori a quelle del nettare. Essa è infatti influenzata, oltre che dai fattori già enunciati per il nettare, anche dalle possibilità di sviluppo della popolazione dell'insetto produttore sulla pianta ospite.

La melata è composta principalmente da zuccheri, ma si discosta notevolmente dalla composizione del nettare, in quanto contiene enzimi secreti dalle ghiandole salivari e dall'intestino degli insetti che determinano, ad esempio, la sintesi di zuccheri non presenti nella linfa. Nelle melate è ad esempio presente una maggiore concentrazione di oligosaccaridi.

## **1.2 FORMAZIONE DEL MIELE**

L'ape bottinatrice preleva le soluzioni zuccherine (nettare e melata) tramite la porzione succhiante dell'apparato boccale. La soluzione assorbita viene raccolta nella borsa melaria.

Il processo di formazione del miele ha inizio già da quando la bottinatrice, rientrando all'alveare, passa ad un'ape di casa la goccia di materia prima raccolta. La stessa goccia viene trasferita da un'ape all'altra e questo processo, che si svolge per circa 15-20 minuti, determina l'evaporazione di notevoli quantità di acqua, grazie all'ambiente caldo e secco all'interno dell'alveare. Quando la goccia viene depositata nelle celle, avviene una ulteriore fase di evaporazione, che non prevede l'intervento diretto delle api e che porta alla formazione del miele maturo. Esso ha un contenuto di acqua che si attesta attorno al 18%, idoneo a garantirne la stabilità. A questo punto la cella viene sigillata dalle api mediante un opercolo di cera.



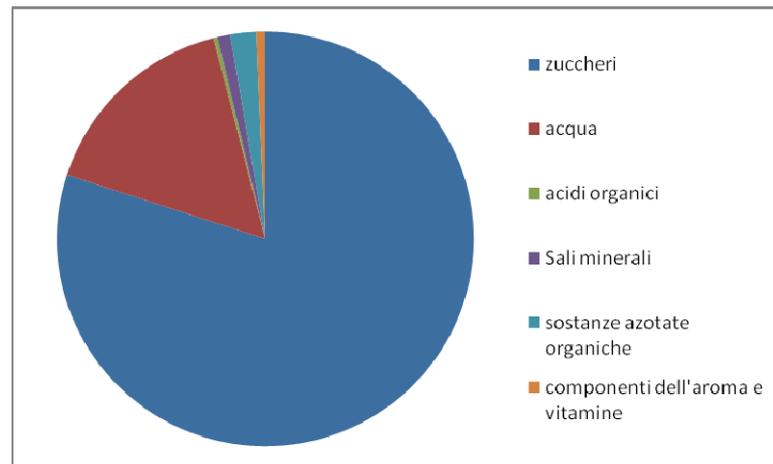
**Figura 1.1** – Ape nell'atto di raccogliere nettare da un fiore

I numerosi passaggi da un'ape all'altra fanno sì che alle soluzioni di nettare (o di melata) vengano aggiunti specifici enzimi provenienti da secrezioni ghiandolari dell'insetto; essi determinano importanti trasformazioni chimiche a carico soprattutto degli zuccheri. Ad esempio, grazie all'azione dell'enzima invertasi le molecole di saccarosio vengono idrolizzate a glucosio e fruttosio.

### **1.3 COMPOSIZIONE**

Sebbene siano stati identificati oltre 300 composti, la composizione chimica di questo alimento è piuttosto complessa e probabilmente, così come per altri prodotti d'alveare, vi sono numerose sostanze minoritarie ancora da identificare.

Alcuni gruppi di componenti sono sempre presenti (zuccheri, acqua, sali minerali, acidi organici, enzimi etc.) ma le loro proporzioni possono variare notevolmente a seconda dell'origine botanica e/o geografica. Con una buona approssimazione possiamo affermare che i carboidrati costituiscono circa il 75-80% del miele, l'acqua è compresa tra il 16.6 ed il 18.5%, gli acidi organici variano dallo 0.1 allo 0.5%, i sali minerali dallo 0.1 all'1.5%, le sostanze azotate organiche dallo 0.2 al 2% e infine i componenti dell'aroma e le vitamine sono presenti in concentrazioni ancora più basse.



**Figura 1.2** – Principali componenti del miele

### 1.3.1 Acqua

Il contenuto di acqua rappresenta un importantissimo aspetto della composizione chimica del miele in quanto direttamente interconnesso alla sua conservabilità. Esso è legato a numerosi fattori quali l'origine botanica, condizioni atmosferiche e ambientali precedenti e successive all'estrazione, intensità del flusso nettario, stagione di produzione, modalità di intervento dell'apicoltore e condizioni di conservazione. Le api stesse non sono in grado di ridurre il tenore di umidità del miele a valori idonei alla sua conservabilità in prodotti derivanti da particolari origini floreali o ottenuti in zone particolarmente umide. Il valore ottimale del contenuto d'acqua è fissato intorno al 17%, ma in commercio è possibile reperire campioni con contenuto di acqua compresi tra il 14% a più del 21%. Valori molto bassi del tenore di umidità possono rendere difficoltosi i processi di lavorazione per via di una minore solubilità degli zuccheri, mentre valori elevati determinano un serio rischio di incorrere in fenomeni di natura fermentativa.

### 1.3.2 Zuccheri

Gli zuccheri rappresentano i principali componenti del miele, e costituiscono più del 95% della sostanza secca. Il loro elevato contenuto è determinante per la definizione di numerose proprietà fisiche di questo alimento: igroscopicità, stato fisico, valore energetico, potere dolcificante.

I due zuccheri presenti in maggiore concentrazione sono fruttosio e glucosio. In parte essi derivano direttamente dal nettare, in parte si formano in seguito all'azione dell'invertasi, enzima secreto dalle ghiandole ipofaringee dell'ape. Generalmente, il contenuto di fruttosio è superiore a quello di glucosio. Solo in alcuni tipi di miele (ad es. il miele di tarassaco) avviene il contrario. Un contenuto elevato di glucosio determina solitamente una tendenza alla cristallizzazione per via della sua relativamente bassa solubilità in acqua, mentre un'alta concentrazione di fruttosio conserva il miele allo stato liquido.

Oltre ai due citati monosaccaridi il miele contiene anche piccole quantità di zuccheri superiori (di-, tri- e polisaccaridi). Ad oggi ne sono stati identificati 20, anche se in genere non sono presenti contemporaneamente nello stesso miele. La loro identificazione può essere rilevante per conoscere l'origine del miele e risalire ai processi che hanno portato alla sua formazione. La presenza del saccarosio è da attribuirsi ad una non completa idrolisi del disaccaride presente inizialmente nel nettare o nella melata. Il suo contenuto è compreso tra l'1 e il 3%. Altri disaccaridi che possono essere rinvenuti comunemente nel miele sono il maltosio e l'isomaltosio. Altri zuccheri, quali ad esempio l'erlosio, sono assenti nella materia prima ma derivano da trasformazioni enzimatiche operate dalle secrezioni ghiandolari dell'ape. Il melezitosio, caratteristico dei mieli di melata, viene sintetizzato durante il passaggio della linfa nel corpo dell'insetto produttore di melata.

### 1.3.3 Acidi organici

Il miele è un alimento acido. I mieli di nettare hanno un pH compreso fra 3.5 e 4.5 mentre quelli di melata evidenziano valori fra 4.5 e 5.5. L'acidità di suddetto alimento è dovuta alla presenza di acidi organici che possono trovarsi sia in forma libera che legata. E' stata evidenziata la presenza degli acidi acetico, butirrico, citrico, formico, fumarico, gluconico,  $\alpha$ -chetoglutarico, lattico, maleico, malico, ossalico, piroglutammico, succinico e tartarico. Da un punto di vista quantitativo il più importante è l'acido gluconico, che si forma dal glucosio ad opera dell'enzima glucosio ossidasi. Per ciò che concerne l'origine degli altri acidi organici possiamo affermare che alcuni sono presenti nel nettare o nella melata, altri si formano durante la formazione del miele per intervento dell'ape. L'acidità totale del miele è espressa in milliequivalenti per Kg e varia da campione a campione in una scala compresa fra 10 e 60. L'acidità del miele contribuisce, insieme all'elevata pressione osmotica dovuta all'alta concentrazione di zuccheri, alla stabilità dell'alimento rispetto alla degradazione microbica.

### 1.3.4 Sostanze minerali

Il contenuto di sali minerali, definito anche come ceneri, è in genere basso e può variare in un ampio range (tipicamente dallo 0.02 all'1%). Le sostanze minerali sono costituite soprattutto da metalli. Il potassio è quello presente in maggiore concentrazione: da solo esso costituisce almeno la metà del contenuto totale di questa frazione. Sono inoltre presenti, in quantità minore, altri elementi quali cloro, zolfo, sodio, calcio, fosforo, magnesio, silicio, ferro, manganese e rame.

I minerali presenti nel miele sono principalmente espressione del suolo nel quale è cresciuta la pianta. E' stata evidenziata una correlazione esistente fra la presenza di

elementi rari e l'origine geografica dei mieli. In particolare, mieli di uguale origine botanica provenienti da territori diversi possono avere un diverso contenuto di oligoelementi. La quantità di sali minerali è anche uno dei fattori che influenzano maggiormente il colore dei mieli. Infatti, i mieli chiari (acacia, rosmarino, agrumi) sono tendenzialmente poveri in sostanze minerali, mentre quelli più scuri, in particolare il miele di castagno e quello di melata, ne sono più ricchi.

### 1.3.5 Proteine

A differenza di altri prodotti d'alveare come il polline o la gelatina reale, il miele è particolarmente povero in sostanze azotate. Ne contiene mediamente lo 0.2-0.3%. Esse sono rappresentate da amminoacidi liberi e da proteine di diversa origine, in parte già presenti nel nettare e nella melata, in parte presenti nei granuli pollinici che si trovano nel miele. L'amminoacido più abbondante è la prolina. Si ritiene che la sua origine sia ascrivibile alle secrezioni delle ghiandole ipofaringee dell'ape e che abbia la funzione di regolare la produzione di invertasi durante la trasformazione del nettare in miele. Una particolare classe di sostanze proteiche che riveste una grande importanza è costituita dagli enzimi.

Il miele contiene diversi enzimi che derivano dalle secrezioni ghiandolari delle api ma - in parte - anche dal nettare e dalla melata. La loro quantificazione può essere utilizzata come indice di freschezza, in quanto la loro attività tende a diminuire con il tempo. Tra i principali enzimi del miele ne troviamo alcuni di esclusiva origine animale (invertasi e glucosio ossidasi) e alcuni di origine sia animale che vegetale (diastasi). Infine ricordiamo la catalasi e la fosfatasi, che derivano esclusivamente dal nettare e della melata. L'invertasi catalizza l'idrolisi del saccarosio a glucosio e fruttosio mentre la glucosio ossidasi svolge

un'azione che porta alla formazione di acido gluconico e perossido di idrogeno, dotato di potere batteriostatico. La diastasi idrolizza invece l'amido a glucosio. La determinazione di questo enzima termosensibile viene comunemente utilizzata per valutare lo stato di freschezza del prodotto. Va però ricordato che il contenuto di questo enzima è molto variabile e strettamente legato all'origine botanica. Alcuni mieli uniflorali (acacia, agrumi e corbezzolo) presentano un basso contenuto diastatico anche se freschi.

### **1.3.6 Vitamine**

Il miele ha un contenuto di vitamine abbastanza basso ove lo si relazioni al fabbisogno nutrizionale. Ad oggi sono state rinvenute solo vitamine idrosolubili (vitamina C e vitamine del gruppo B), in concentrazioni mai superiori a qualche decina di mg/Kg. La loro origine è principalmente ascrivibile ai granuli di polline riscontrabili nel miele.

### **1.3.7 Costituenti minori**

Alcuni costituenti della composizione chimica del miele sono presenti solamente in tracce ma non per questo sono meno importanti.

Per quanto riguarda i lipidi, possiamo affermare che la loro presenza è principalmente dovuta alle tracce di cera che è possibile rinvenire accidentalmente nei campioni di miele, in seguito alle tecniche di estrazione adottate.

Una classe molto importante di composti è costituita dalle sostanze fenoliche. Esse contribuiscono in maniera significativa alla definizione dell'aroma e - in generale - delle caratteristiche organolettiche del miele. Parimenti ad esse viene attribuita una presunta azione benefica sulla salute. Tra le sostanze fenoliche è possibile individuare centinaia di composti diversi fra cui flavoni, flavanoni, flavonoidi, fenoli, esteri e acidi fenolici. Da

queste molecole dipende l'attività antiossidante del miele. Alcuni di questi composti sono stati identificati come marker di origini botaniche specifiche. Questo è ad esempio il caso dell'acido omogentisico per il miele di corbezzolo, del metilantranilato per il miele di agrumi e del kaempferolo per il miele di rosmarino. Fra le sostanze che contribuiscono all'aroma di questo alimento troviamo inoltre acidi, alcoli, chetoni, aldeidi, eteri ed esteri di varia natura.

La 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF) è un composto generalmente assente nel miele appena estratto, ma si forma in esso per degradazione degli zuccheri in ambiente acido o attraverso la reazione di Maillard. Durante la conservazione la sua concentrazione aumenta, e il suo tenore diventa via via più elevato quando il miele è sottoposto a trattamenti termici.

Possono essere considerati componenti del miele anche alcuni elementi figurati presenti in sospensione. Fra i più importanti troviamo i granuli pollinici che derivano dai fiori visitati dalle api. L'esame del contenuto pollinico di un campione di miele prende il nome di analisi melissopalinoologica, ed è stato per lungo tempo l'unico strumento per la definizione dell'origine botanica (e conseguentemente geografica) del miele.

Talvolta è possibile rinvenire nel miele anche sostanze tossiche e costituenti indesiderati derivanti dalla pianta di origine. Alcune piante sono infatti capaci di sintetizzare sostanze ad intensa attività farmacologica che dal nettare possono passare al miele. E' opportuno comunque ricordare che tali sostanze si trovano sempre in concentrazioni estremamente ridotte e tali da non poter causare un serio rischio per la salute.

## **1.4 PROPRIETA' FISICHE**

Le proprietà fisiche del miele sono strettamente legate alla sua composizione chimica. Ad esempio, gli zuccheri e l'acqua condizionano fortemente l'indice di rifrazione, la cristallizzazione, densità e igroscopicità mentre i sali minerali sono determinanti per la conducibilità elettrica.

La definizione di queste proprietà riveste un ruolo molto importante poiché ad esse sono collegati numerosi processi tecnologici applicati al miele.

### **1.4.1 Indice di rifrazione**

Nel miele liquido l'indice di rifrazione varia in maniera lineare con il grado di umidità. In particolare, alla diminuzione del tenore di umidità corrisponde un incremento del suddetto parametro. La sua determinazione viene infatti utilizzata per conoscere il contenuto di acqua di un miele.

### **1.4.2 Densità e peso specifico**

La densità rappresenta il rapporto fra la massa e il volume di una sostanza. Il rapporto fra la densità di una sostanza e quella dell'acqua (convenzionalmente uguale a 1) definisce il peso specifico. Il peso specifico del miele a 20°C, è mediamente pari a 1.422 g/cm<sup>3</sup>. Le variazioni di densità sono anch'esse legate al contenuto di acqua: più questo è elevato, minore è la densità.

### **1.4.3 Viscosità**

La viscosità è il parametro che dà conto dell'attrito interno dei fluidi. A causa dell'elevata concentrazione zuccherina, nel miele la viscosità è molto elevata. I fattori che

principalmente influenzano la viscosità sono la temperatura e il contenuto di acqua. La viscosità è elevata a basse temperature e diminuisce rapidamente con l'avvicinarsi a temperature fisiologiche. Per contro, a temperature elevate essa si mantiene pressoché costante. La pratica di riscaldare il miele ad alte temperature, lungi dall'aumentare in maniera significativa la fluidità, determina soprattutto danni connessi alla perdita di principi nobili ed all'incremento di concentrazione di sostanze da degradazione. Comunque la viscosità è una proprietà fisica a cui è necessario prestare particolare attenzione durante le varie fasi tecnologiche cui viene sottoposto il miele, sin dal momento dell'estrazione.

#### **1.4.4 Igroscopicità**

Grazie all'alto tenore in zuccheri il miele è un alimento fortemente igroscopico. Lo zucchero responsabile di tale proprietà è principalmente il fruttosio, la cui presenza fa in modo che il miele tenda a raggiungere uno stato di equilibrio igrometrico con l'ambiente: in ambiente umido esso assorbe acqua mentre in ambiente secco la cede, sino al raggiungimento dell'equilibrio. Il primo processo è più rapido del secondo. Per tale ragione, il miele deve essere conservato in luoghi con umidità relativamente bassa, non superiore al 60%. Al di sopra di questa soglia si verifica infatti un rapido assorbimento di acqua da parte del fruttosio.

#### **1.4.5 Calore specifico e conducibilità termica**

Per scaldare il miele è necessaria circa la metà dell'energia necessaria a riscaldare la stessa quantità di acqua. Un miele che contiene il 17.4% di acqua a 20°C ha un calore specifico di 0.54 J Kg<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

Il miele ha però una bassa conducibilità termica (è quindi un cattivo conduttore di calore). Occorre tener conto di ciò quando si riscalda un miele, perché si rischia di surriscaldare gli strati più esterni e più vicini alla fonte di calore, mentre la massa interna resta fredda.

#### **1.4.6 Conducibilità elettrica**

Come già accennato in precedenza, la conducibilità elettrica del miele è proporzionale al contenuto di sali minerali. Il valore di conducibilità elettrica varia notevolmente a seconda dell'origine botanica, approssimativamente fra 0.1 e 2 mS/cm. I mieli di melata, più scuri, presentano conducibilità più elevate.

#### **1.4.7 Potere rotatorio**

Il potere rotatorio del miele dipende da quello dei singoli zuccheri. La maggior parte dei mieli di nettare mostra attività destrógira, mentre i mieli di melata sono in genere levogiri.

#### **1.4.8 Colore**

Il colore varia naturalmente dalle tonalità più chiare alle più scure del giallo, dell'ambra, fino al nero. Esistono anche mieli con riflessi verdi o rossi. Le sostanze specifiche responsabili del colore del miele sono in parte sconosciute; ma è certo che vi contribuiscono prodotti derivati dagli zuccheri, alcuni pigmenti vegetali, fra cui carotene, xantofille, antociani, flavonoidi, nonché amminoacidi e sali minerali. Il colore del miele è legato alla loro origine botanica ed è per tale ragione un importante parametro per la caratterizzazione dei mieli uniflorali. Esso costituisce inoltre un fattore importante anche sul piano commerciale.

Con il passare del tempo, il miele tende a diventare più scuro; cambiamenti del colore possono anche derivare dagli interventi dell'apicoltore (uso di favi vecchi, contatto con i metalli, alte temperature di lavorazione) e dalle modalità di conservazione (esposizione alla luce, tempi di stoccaggio etc.).

#### **1.4.9 Cristallizzazione**

La cristallizzazione è, unitamente al colore, la caratteristica fisica di maggior importanza da un punto di vista della commercializzazione del miele. Moltissimi mieli tendono facilmente a cristallizzare a temperatura ambiente in quanto come già ricordato, essi non sono altro che soluzioni sovrasature di zuccheri. Il processo di cristallizzazione consiste fondamentalmente nella precipitazione di cristalli di glucosio monoidrato, che possono avere forma o disposizione diversa a seconda delle condizioni nelle quali la cristallizzazione ha avuto luogo. Generalmente, i cristalli hanno un volume maggiore quando la cristallizzazione avviene lentamente. A seconda della composizione chimica i mieli presentano una diversa tendenza a cristallizzare: minore è il contenuto di glucosio e soprattutto, minore è il rapporto glucosio/fruttosio minore è la tendenza a cristallizzare. In linea generale si può affermare che con un rapporto fruttosio/glucosio superiore a 1.3, i mieli sono naturalmente liquidi per lungo tempo; quelli con un rapporto compreso fra 1.1 e 1.3 cristallizzano facilmente a basse temperature mentre quelli con rapporto inferiore a 1.1 cristallizzano rapidamente in ogni condizione. Inoltre, un elevato contenuto d'acqua determina una minore tendenza alla cristallizzazione.

## 1.5 PROPRIETA' BIOLOGICHE

### 1.5.1 Proprietà terapeutiche

Molti usi del miele sono legati alle (vere o presunte...) proprietà terapeutiche. Molte virtù sono state, nel corso degli anni, attribuite al miele e tramandate dalla medicina popolare.

Il miele ha una presunta azione benefica sui disturbi dell'apparato respiratorio, circolatorio e digestivo, sul fegato, sulla dentizione dei bambini favorendo la fissazione del calcio.

Nonostante alcune di queste azioni siano state verificate, manca una completa sperimentazione clinica in grado di supportarle in maniera rigorosa. Inoltre, le sperimentazioni effettuate non sono accompagnate da una ricerca approfondita sulla composizione del miele candidato all'effetto terapeutico, e questo è tanto più importante in relazione al fatto che il miele presenta una elevata variabilità di caratteri determinata dalla sua origine botanica, geografica, stagionale e dalle metodologie di conservazione adottate.

E' stata comunque verificata un'azione antibatterica, sia nel miele tal quale che in soluzioni diluite. Tale azione può essere attribuita all'elevata concentrazione di zuccheri e al pH acido. Per lungo tempo è stata ritenuta responsabile dell'attività antibatterica una ipotetica sostanza, mai identificata ma battezzata con il nome generico di "inibina". In realtà, è l'accumulo di perossido di idrogeno derivante dall'azione dell'enzima glucosio ossidasi che conferisce al miele un'attività antibiotica. La produzione di acqua ossigenata sarebbe alla base di altre attività tradizionalmente attribuite al miele, come l'azione benefica sulle ferite. Anche altre sostanze presenti nel miele, come i polifenoli, sembrano avere un'azione di tipo antibiotico.

La maggior parte dei benefici riconosciuti dalla tradizione al miele possono essere ricondotti ad una generica azione trofica e all'effetto emolliente, blandamente lassativo, epato-protettore e detossificante del fruttosio.

### **1.5.2 Proprietà nutrizionali**

Il miele è un alimento glucidico a elevato potere energetico. Esso fornisce 320 calorie ogni 100 grammi contro le 400 dello zucchero da cucina.

Essendo composto prevalentemente da zuccheri semplici presenta una facile digeribilità. Il glucosio infatti entra direttamente in circolo e viene utilizzato immediatamente, mentre il fruttosio viene consumato più lentamente e funziona da riserva energetica in quanto, prima di essere utilizzato dall'organismo, deve essere trasformato in glucosio a livello epatico.

Il miele offre quindi un immediato apporto energetico. Tra gli alimenti energetici esso occupa il primo posto nell'alimentazione dello sportivo. E' indicato inoltre nell'alimentazione geriatrica e nella dieta dell'età scolare e, in generale, in tutti i momenti in cui il fabbisogno energetico è elevato.

La presenza di sali minerali, enzimi, sostanze aromatiche e oligoelementi contribuisce ad aumentare le potenzialità nutritive del miele. Da diversi anni esso viene addizionato agli alimenti destinati alla prima infanzia, in quanto migliorerebbe la tolleranza al latte vaccino.

Il potere dolcificante del miele è elevato, superiore a quello del normale zucchero da cucina.

## **1.6 TECNICHE DI PRODUZIONE E LAVORAZIONE**

Fra gli alimenti di origine naturale, il miele si colloca fra quelli che richiedono il minor numero di passaggi tecnologici prima di essere immesso nel mercato. Possiamo inoltre affermare che la qualità complessiva del prodotto è tanto più elevata quanto minori in numero ed in complessità sono gli step di lavorazione che si interpongono al suo confezionamento. Infatti, uno dei parametri che vengono più frequentemente invocati per definire la qualità del miele è la sua freschezza. Quest'ultima deve essere intesa come l'attitudine del miele a mantenere nel tempo le caratteristiche chimico-fisiche e organolettiche che gli sono proprie al momento del raccolto e che potrebbero venire a mancare in seguito a processi tecnologici di varia natura.

Tutte le operazioni di processo e le manipolazioni che il miele subisce sono in qualche misura causa di peggioramenti delle caratteristiche qualitative, ancorchè di entità modesta laddove essi vengano condotti in maniera corretta.

Nella scelta dei materiali e delle attrezzature da impiegare, non bisogna dimenticare che il miele è a tutti gli effetti un pregiato prodotto alimentare e come tale è sottoposto a tutte le discipline di carattere igienico-sanitario previste per questa categoria merceologica. La lavorazione di seguito descritta è quella utilizzata nell'apicoltura moderna razionale.

### **1.6.1 Rimozione dei melari**

Al momento opportuno l'apicoltore decide di rimuovere i melari dall'arnia per portarli in laboratorio e iniziare l'estrazione del miele. Questa fase comporta la necessità di allontanare le api dal melario. Per questa operazione possono essere utilizzati due diversi strumenti: il soffiatore e gli apiscampi. Il primo viene impiegato dagli apicoltori professionisti perché più rapido (le api vengono spazzate via in pochi secondi) e perché è

sufficiente una sola visita per completare l'estrazione. Al contrario, gli apiscampi devono essere posti fra il nido e i melari qualche giorno prima di portare via questi ultimi ed è quindi necessario eseguire due passaggi.



**Figura 1.3** – Rimozione dei melari

### 1.6.2 Stoccaggio dei melari

Una volta rimossi da sopra l'arnia, i melari vengono trasferiti in laboratorio ed accatastati. In questo momento è opportuno controllare il grado di umidità del miele con un rifrattometro. In caso di eccessiva umidità si rende necessaria la fase di deumidificazione, per prevenire eventuali rischi di fermentazione dell'alimento.

### 1.6.3 Deumidificazione

La fermentazione è l'unica alterazione microbiologica che il miele può subire ed è dovuta alla presenza di lieviti osmofili, che trovano il loro ambiente di sviluppo ideale nelle soluzioni zuccherine concentrate. Tali microrganismi sono sempre presenti nel miele, ma provocano danni evidenti nel prodotto quando possono moltiplicarsi a spese del glucosio che essi metabolizzano producendo alcol, acidi e anidride carbonica. Tra le condizioni che favoriscono la proliferazione microbica, il contenuto d'acqua riveste un ruolo

fondamentale. Pertanto è raccomandabile porre sul mercato un prodotto con un tenore di acqua non superiore al 18%, ben al di sotto del limite del 20% stabilito dalla legge, onde scongiurare rischi di fermentazione.

Come già spiegato, quando il miele estratto è troppo umido si rende necessario un intervento di deumidificazione, attraverso l'ausilio di opportune tecnologie. Quando la quantità di acqua da rimuovere è contenuta, è sufficiente collocare i melari contenenti i favi in un ambiente riscaldato ad una temperatura di circa 38°C, per un tempo pari a circa 24 ore. Se invece il tasso di umidità è particolarmente elevato, è necessario utilizzare un'apposita camera avente un pavimento costituito da una struttura metallica a maglie molto larghe, attraverso la quale viene convogliato direttamente sui melari impilati un flusso di aria calda.



**Figura 1.4** – Melari in locale per la deumidificazione

#### **1.6.4 Estrazione**

L'estrazione del prodotto deve essere per legge effettuata in laboratori opportunamente attrezzati, dotati di pavimento e pareti perfettamente lavabili.

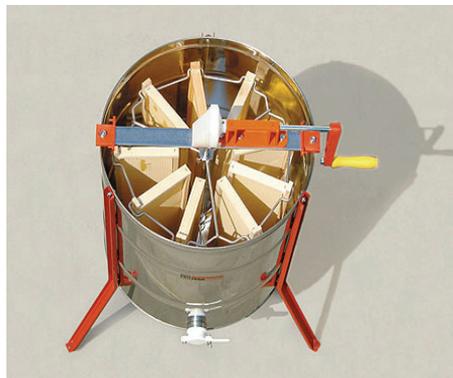
Il primo intervento che si effettua nella fase di estrazione è la disopercolatura, che consiste nella rimozione del sottile opercolo di cera posto dalle api a sigillo del miele

raccolto. Questa operazione può essere eseguita con l'ausilio di coltelli manuali o dispositivi automatici di varia dimensione e forma, di acciaio inossidabile. Talvolta alcune di queste macchine disopercolatrici possono indurre un'elevata frammentazione della cera di opercolo, la quale può disperdersi sottoforma di microparticelle nel miele provocando effetti indesiderati come la cristallizzazione.



**Figura 1.5** - Disopercolatura manuale

L'estrazione viene condotta per mezzo di smielatori centrifughi, manuali o automatici, in cui i favi vengono caricati uno per uno, per mezzo di appositi cestelli. Anche gli smielatori devono essere, per legge, costruiti in acciaio inossidabile.



**Figura 1.6** – Smielatore radiale per l'estrazione del miele dai favi

Le operazioni di estrazione risultano notevolmente facilitate ove condotte nel minor tempo possibile tra la raccolta dei melari in campo e la successiva centrifugazione nel laboratorio. In tal modo viene sfruttata la temperatura naturalmente elevata dei favi (circa 37 °C), senza la necessità di riscaldarli, come avviene quando le operazioni di smielatura vengono rinviate nel tempo. Oltre ad essere dispendioso da un punto di vista economico, il riscaldamento è pregiudizievole per le caratteristiche chimico-fisiche e organolettiche del prodotto.

### **1.6.5 Filtrazione e decantazione**

Un altro aspetto importante riguarda la rimozione delle impurità solide eventualmente presenti. Queste possono essere estremamente diverse per forma, dimensioni e natura. Possono essere infatti costituite da granelli di sabbia, parti di ape, propoli e infine frammenti di cera.

L'eliminazione di queste impurità consta di due fasi: le operazioni di prima filtrazione e seguente decantazione ed una seconda e più fine filtrazione immediatamente prima del confezionamento del prodotto.

La prima filtrazione viene realizzata in maniera grossolana, utilizzando filtri a maglia metallica o filtri a sacco in tessuto, per caduta diretta del miele all'interno degli stessi filtri, già collocati sui maturatori di decantazione. Questa fase è seguita dall'asportazione di piccole impurità che affiorano dopo qualche giorno, durante la decantazione. La durata della filtrazione dipende dalla temperatura, dalle maglie del filtro, dalla quantità di impurità e dalla viscosità del miele.



**Figura 1.7** – Filtro a sacco

La decantazione consiste nel lasciare il miele a riposo in appositi contenitori, chiamati impropriamente maturatori (la maturazione del miele avviene infatti all'interno degli alveari). La velocità di decantazione è direttamente proporzionale alle dimensioni delle particelle estranee contenute nel miele. Anche le dimensioni del decantatore influenzano la rapidità con cui l'operazione viene ultimata: minore è l'altezza, minore è la distanza che le particelle dovranno percorrere per raggiungere il fondo. In presenza di mieli molto viscosi o a rapida cristallizzazione, o quando l'ambiente di smielatura è caratterizzato da temperature particolarmente basse, si ricorre al riscaldamento del miele ad una temperatura compresa fra i 20 e i 30°C. La temperatura ottimale di conservazione del miele si aggira intorno ai 14°C.



**Figura 1.8** – Maturatori per la decantazione del miele

### **1.6.6 Cristallizzazione semplice**

Una volta ultimata la decantazione, la massa di prodotto fluido appena raccolto viene mescolata attraverso l'ausilio di una pala elettromeccanica al fine di ottenere una maggiore omogeneità e uniformità del miele. Grazie a questo intervento infatti, i cristalli tendono ad assumere una forma più regolare e dimensioni più fini.

### **1.6.7 Preparazione del miele per il confezionamento**

Lo scopo delle aziende che producono e commercializzano miele è quello di riuscire a imporre sul mercato un prodotto la cui qualità sia quanto più vicina possibile alla richiesta del consumatore medio.

La prima scelta che si deve operare consiste nello stabilire se il miele deve presentarsi allo stato liquido o cristallizzato. Come già detto in precedenza, tutti i mieli tendono a cristallizzare e gli unici che rimangono allo stato fluido per lungo tempo sono quelli poveri di glucosio e ricchi in fruttosio, come quello di acacia.

Se si desidera ottenere del miele fluido, il prodotto deve essere naturalmente liquefatto attraverso riscaldamento ad una temperatura compresa fra i 40 e i 48°C, in maniera tale da sciogliere completamente i cristalli presenti.

Il fine di questi interventi non è rivolto alla conservabilità e al mantenimento delle caratteristiche igienico-sanitarie, bensì alla possibilità di mantenere il miele allo stato fluido per tempi prolungati. Va comunque detto che qualora nel miele fossero presenti lieviti vivi, con la pastorizzazione questi vengono inattivati, eliminando così definitivamente ogni successivo rischio di fermentazione.

### 1.6.8 Confezionamento

Il confezionamento dovrebbe consentire un'adeguata presentazione del prodotto tale da attrarre il consumatore finale.

Le operazioni di confezionamento possono essere eseguite manualmente, impiegando contenitori dotati di un rubinetto a taglio, oppure si può ricorrere ad impianti dosatori.

Nel primo caso le uniche avvertenze da seguire riguardano l'eventualità che il miele inglobi aria durante l'operazione e la necessità di chiudere in maniera ermetica i vasi di miele appena riempiti.

Nel caso in cui si disponga invece di una macchina dosatrice, è importante alimentare l'impianto con un flusso di miele continuo, per caduta o attraverso una linea di pompaggio, senza interruzioni.



**Figura 1.9** – Invasettamento con impianto dosatore

Al pari dei dispositivi di chiusura utilizzati, anche i contenitori dovranno essere per uso alimentare e idonei per prodotti a pH moderatamente acido. Il miele viene di solito conservato in contenitori in PET o in fusti metallici il cui interno è vetrificato o verniciato con sostanze idonee al contatto con l'alimento.

## 1.7 CONSERVAZIONE

Nonostante il miele sia un alimento particolarmente stabile, in quanto non attaccato dai comuni microrganismi che determinano l'alterazione degli alimenti, anch'esso subisce un processo d'invecchiamento che comporta modificazioni chimico-fisiche e organolettiche. Tale processo consiste nella perdita delle sostanze volatili, nell'inscurimento del colore, nella variazione della composizione zuccherina, nella diminuzione della carica enzimatica e nell'aumento della concentrazione di HMF.

E' importante precisare che un miele vecchio o degradato non rappresenta un pericolo per la salute umana, anche se può perdere il suo valore nutrizionale e le proprietà tipiche. Da quanto appena detto emerge che il miele dovrebbe essere conservato alla temperatura più bassa possibile, ma le tecnologie operative non permettono di muoversi in questa direzione. Nel caso del miele liquido, la conservazione antecedente all'immissione nel circuito commerciale dovrebbe avvenire in magazzini refrigerati con temperature comprese fra i 2 e i 5° C. Una temperatura così bassa impedisce ai cristalli di glucosio di muoversi evitando la cristallizzazione. Nel caso del miele cristallizzato o cremoso, il prodotto confezionato dovrebbe essere conservato, fino al momento della spedizione, ad una temperatura di circa 14° C, ottimale per il raggiungimento di un adeguato grado di cristallizzazione e per rendere il miele fisicamente più stabile.

In generale, i vasi contenenti il miele non dovrebbero essere mai esposti alla luce solare o ad altre fonti dirette di calore. E' inoltre opportuno che i magazzini di stoccaggio siano destinati solo ed esclusivamente al miele in quanto questo alimento presenta una forte attitudine all'assorbimento di odori e sapori.

## **CAPITOLO 2**

### **MIELE E QUALITA'**

#### **2.1 CONTROLLI UFFICIALI**

Il riferimento normativo italiano in materia di miele è rappresentato dal Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n. 179, in attuazione della Direttiva 2001/110/CE concernente la produzione e la commercializzazione di questo alimento. L'art. 2 di tale decreto stabilisce che il miele deve soddisfare le caratteristiche di composizione specifiche riportate in Tabella 2.1. Per queste determinazioni sono previste anche le metodiche di analisi ufficiali (D.M. 25 luglio 2003 in Gazz. uff. n.185 dell'11 agosto 2003) che permettono di stabilire se il miele commercializzato, venduto in quanto tale o utilizzato in prodotti destinati al consumo umano, è conforme a queste caratteristiche di composizione. Il Decreto Legislativo attualmente in vigore, sostituisce la legge 753/1982 e introduce alcune novità alla luce dei risultati delle diverse ricerche svolte negli ultimi anni circa la composizione chimica del miele.

##### **2.1.1 Determinazione degli zuccheri**

Gli zuccheri vengono determinati come glucosio e fruttosio (somma dei due) e saccarosio, attraverso una metodica HPLC. Si è ormai abbandonata l'obsoleta determinazione degli zuccheri riduttori e del saccarosio apparente, mediante l'utilizzo del reattivo di Fehling. I limiti di 60 e 45 g/100 g come somma di glucosio e fruttosio rispettivamente per i mieli di

nettare e di melata, più bassi rispetto alla normativa precedente, tengono conto del fatto che alcuni mieli, come quelli di melata, presentano un esiguo contenuto di monosaccaridi.

### **2.1.2 Determinazione del contenuto di acqua**

L'umidità del miele viene determinata attraverso la misura dell'indice di rifrazione che, come già spiegato in precedenza, è strettamente legato al contenuto di acqua. Tale determinazione prevede l'utilizzo di un semplice rifrattometro. Per ottenere risultati accurati è opportuno utilizzare miele completamente liquido e alla temperatura ambiente di 20°C. Laddove il valore di temperatura sia differente, è necessario applicare una correzione (aggiungendo o sottraendo al valore letto lo 0.1% per ogni grado in meno o in più rispetto a 20°C).

Il limite massimo legale del tenore di acqua è stato abbassato dal 21% al 20% per i mieli in genere. E' noto che l'umidità influenza la conservazione del prodotto e che il valore ottimale è ancora più basso. Un miele con un elevato contenuto di acqua va incontro a processi fermentativi. I microrganismi responsabili della fermentazione naturale del miele sono i cosiddetti "lieviti osmofili", chiamati in questo modo poiché riescono a sopravvivere alle elevate pressioni osmotiche dovute all'alto tenore in zuccheri. Tale processo fermentativo determina la formazione di etanolo, anidride carbonica e acidi a spese degli zuccheri presenti. L'origine dei lieviti può essere diversa. Essi possono infatti, derivare dal nettare o dalla melata, dall'alveare, dall'ambiente, dai locali, dalle attrezzature di lavorazione o dalle stesse api che possono entrare in contatto con substrati vegetali contaminati da questi lieviti. Essi possiedono la capacità di crescere ad alte concentrazioni zuccherine, di moltiplicarsi in ambiente acido senza particolari esigenze nutritive e di svilupparsi a temperature comprese fra 10 e 30 °C.

**Tabella 2.1** - Caratteristiche di composizione del miele secondo la normativa vigente

Parametro	Limite generale	Limiti particolari
Tenore di glucosio e fruttosio	Minimo 60 g/100 g	-minimo 45 g/100 g: miele di melata. Solo o in miscela con miele di nettare
Saccarosio	Minimo 5 g/100 g	-massimo 10 g/100g: miele di robinia ( <i>Robinia pseudoacacia</i> ), erba medica ( <i>Medicago sativa</i> ), banksia ( <i>banksia menziesii</i> ), sulla ( <i>Hedysarium coronarium</i> ), eucalipto rosastro ( <i>eucalyptus camaldulensis</i> ), <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> , <i>Citrus spp.</i>  -massimo 15 g/100 g: miele di lavanda ( <i>Lavandula spp.</i> ), borragine ( <i>Borago officinalis</i> )
Acqua	Massimo 20 g/100 g	-massimo 23 g/100 g: miele di brughiera ( <i>Calluna</i> ) e miele per uso industriale  -massimo 25 g/100 g: miele di brughiera ( <i>Calluna</i> ) per uso industriale
Sostanze insolubili in acqua	Massimo 0.1 g/100 g	-massimo 0.5 g/100 g: miele torchiato
Conducibilità elettrica	Massimo 0.8 mS/cm	-minimo 0.8 mS/cm: miele di melata e di castagno, soli o in miscela con altri mieli tranne che con quelli elencati sotto  -nessun limite: miele di corbezzolo ( <i>Arbutus Unedo</i> ), erica ( <i>Erica spp.</i> ), eucalipto ( <i>Eucalyptus spp.</i> ), tiglio ( <i>Tilia spp.</i> ), brugo ( <i>Calluna vulgaris</i> ), <i>Leptospermum</i> , <i>Melaleuca spp.</i>
Acidità libera	Massimo 50 meq/kg	-massimo 80 meq/kg: miele per uso industriale
Indice diastatico	Minimo 8 u.d./g	-minimo 3 u.d./g: miele con basso tenore naturale di enzimi (es. di agrumi) e tenore di HMF non superiore ai 15 mg/kg
Idrossimetilfurfurale (HMF)	Massimo 40 mg/kg	-massimo 80 mg/kg: miele di origine dichiarata da regioni con clima tropicale e miscele di tali tipi di miele.

I prodotti della fermentazione non sono tossici per l'uomo, ma le ripercussioni più gravi si hanno sulle caratteristiche organolettiche. La fermentazione può determinare infatti lo sviluppo di bolle di anidride carbonica e di schiuma in superficie, la formazione di un odore e di un aroma aciduli e fruttati e un gusto leggermente acido. Nei casi più gravi, può avvenire una disgregazione della struttura con separazione di fasi.

Alcuni tipi di miele sono soggetti più di altri ai fenomeni fermentativi. Il processo è influenzato dal periodo stagionale di raccolta, dall'ambiente di stoccaggio e dalle

temperature di conservazione. Anche lo stato fisico del miele svolge un ruolo rilevante in tal senso. Infatti, le medesime condizioni di umidità compatibili con la non fermentazione di un miele allo stato liquido possono per contro determinarla nel miele in fase di cristallizzazione, quando si rendono libere le molecole d'acqua con conseguente aumento dell'attività.

Tornando all'umidità, bisogna notare che le norme attualmente in vigore prevedono un valore massimo ancora troppo elevato rispetto al rischio di fermentazione nelle normali condizioni di conservazione del miele. Per evitare questo problema si dovrebbe fissare la soglia massima al 17% di umidità. Resta comunque la possibilità di intervenire durante il processo produttivo con la deumidificazione.

### **2.1.3 Determinazione del contenuto di sostanze insolubili in acqua**

Il miele può contenere elementi figurati come granuli di polline ed elementi indicatori di melata, e particelle solide di varia natura (frammenti di cera, di insetti, polvere). La determinazione totale di queste sostanze insolubili viene eseguita per via gravimetrica in seguito a separazione per filtrazione da una soluzione acquosa di miele.

### **2.1.4 Determinazione della conducibilità elettrica**

Il parametro della conducibilità elettrica ha ormai sostituito il contenuto in ceneri. Come già spiegato in precedenza, la conducibilità elettrica è direttamente proporzionale al contenuto di sali minerali. La determinazione viene eseguita tramite un conduttimetro su una soluzione acquosa di miele ed è espressa in mS/cm. La normativa fissa due diversi valori limite: inferiore e superiore a 0.8 mS/cm rispettivamente per i mieli in genere e per i mieli di melata e di castagno. Sono esclusi alcuni mieli uniflorali con conducibilità elevata.

### **2.1.5 Determinazione di pH, acidità libera, acidità combinata o lattoni e acidità totale**

La normativa prevede la sola valutazione dell'acidità libera, ma il metodo potenziometrico applicato permette di determinare nell'ambito della stessa analisi, anche pH, acidità combinata o lattoni e acidità totale, la quale si ottiene per somma di acidità libera e lattoni. La normativa vigente fissa il limite minimo di acidità a 50 meq/kg. E' stato inoltre introdotto un limite di 80 meq/kg per il miele ad uso industriale, che non era previsto nella normativa precedente.

### **2.1.6 Determinazione dell'attività diastatica**

L'indice diastatico, espresso in unità diastatiche (u.d.) per grammo di campione, viene determinato mediante metodo fotometrico con l'impiego di un substrato insolubile di amido, legato a un gruppo cromoforo blu, che viene idrolizzato dall'enzima presente.

La norma fissa un valore di indice diastatico generale non inferiore a 8 u.d./g. Per i mieli che hanno naturalmente un basso tenore di enzimi (es. miele di agrumi) e di HMF, tale limite scende a 3 unità.

Alcuni tipi di miele, come quelli di corbezzolo, erica e rosmarino, sono naturalmente poveri di enzimi e risultano in qualche modo penalizzati da queste disposizioni normative. Infatti, se il basso contenuto diastatico è "fisiologico" e non dovuto ad un processo termico o invecchiamento, il limite di HMF è per essi fissato a 15 mg/kg e non 40 mg/kg come per gli altri mieli.

### 2.1.7 Determinazione dell'idrossimetilfurfurale (HMF)

Il limite legale imposto per il tenore di HMF è 40 mg/kg. In base al metodo di analisi ufficiale la determinazione avviene per HPLC, ancorché il gruppo di ricerca presso il quale il presente lavoro è stato sviluppato ha avuto modo di confutare l'applicabilità di tale metodo per mieli di almeno una origine botanica (miele di corbezzolo), proponendo nel contempo un metodo HPLC alternativo ed esente da bias<sup>11</sup>. La recente normativa ha introdotto il limite particolare di 80 mg/kg per quei mieli che vengono prodotti in regioni a clima tropicale e miscele di tali tipi di miele. Si tratta chiaramente di mieli che già al momento dell'estrazione presentano alti valori di HMF.

Generalmente, nel miele appena estratto l'HMF è assente ma si forma successivamente per degradazione degli zuccheri in ambiente acido o attraverso la reazione di Maillard. Il suo contenuto aumenta in tutti i mieli in maniera diversa a seconda delle temperature a cui il campione viene esposto. La concentrazione di HMF rappresenta quindi un importante indice della degradazione chimica che il miele subisce nelle fasi di lavorazione e di conservazione.

Nonostante l'HMF non influisca sulla salubrità del prodotto, è opportuno dire che la qualità del miele è tanto maggiore quanto più basso è il tenore in idrossimetilfurfurale, in quanto esso rappresenta un indice di freschezza. Si ritiene che prima del confezionamento, il contenuto di HMF non debba essere superiore a 10 mg/kg per garantire un livello di freschezza ottimale.

Il processo di formazione dell'HMF è condizionato da numerosi fattori quali l'acidità dell'ambiente e la composizione stessa del campione. Mieli uniflorali diversi, con diversa

---

<sup>11</sup> Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Tapparo A., Sanna G., *Talanta*, 68, 1390-1395 (2006)

concentrazione degli zuccheri e soprattutto con pH diverso, presentano differenze nella formazione dell'HMF e nella degradazione del prodotto. Occorre tenere presente che, durante la conservazione, esiste una temperatura critica - compresa fra i 25 e i 30°C - alla quale corrisponde una rapida evoluzione di HMF, particolarmente nei mieli che, per le loro caratteristiche naturali, presentano bassi valori di pH, associati a valori più elevati di acidità libera.

## **2.2 CONTROLLO DELLA SALUBRITA'**

Il D. Lgs. 179/2004 all'art. 4 vieta di produrre, vendere, detenere per vendere, somministrare o distribuire per il consumo miele non corrispondente all'art. 5 della Legge 30 aprile 1962, n. 283 (Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande), cioè contenente sostanze estranee alla sua composizione o comunque dannose per la salute umana.

I controlli ufficiali di cui abbiamo parlato precedentemente possono quindi essere completati dalla ricerca di sostanze estranee, residui di contaminanti sia di origine ambientale che derivanti dall'attività apistica.

### **2.2.1 Contaminanti di origine ambientale**

Le interazioni fra l'alveare e l'ambiente circostante possono talvolta portare a fenomeni di contaminazione del miele. Dal traffico veicolare e dagli impianti di riscaldamento possono derivare residui di piombo, cadmio e idrocarburi policiclici aromatici, mentre il nichel può provenire da insediamenti industriali. L'utilizzo di recipienti metallici inadatti può infine determinare contaminazione da zinco e ferro. Alla luce di quanto appena detto, è evidente

che la scelta della postazione degli apiari deve essere tale da ridurre il più possibile il rischio di inquinamento.

Numerosi metalli pesanti sono naturalmente presenti nella frazione minerale, in quanto vengono assorbiti direttamente dal suolo ad opera delle piante oppure sono aerodispersi o depositati su particelle polliniche, e si trovano quindi nel nettare e nella melata. La legge non prevede un limite massimo residuale per questi metalli, ma in base ai dati sperimentali disponibili, è possibile definire un range di variabilità per le loro concentrazioni. Ad esempio, per il piombo i range di variabilità sono 0.01-0.05 mg/kg; per il cromo: 0.005-0.015 mg/kg; per il nichel: 0.02-0.2 mg/kg; per il ferro: 1.65-4.0 mg/kg; per lo zinco: 0.5-3.0 mg/kg.

Un altro esempio di contaminante di origine ambientale è rappresentato dai farmaci utilizzati in ambito agricolo. Le api sono estremamente sensibili agli antiparassitari: quando vengono investite dall'insetticida muoiono sul campo o durante il volo di rientro all'alveare. Nel caso invece di prodotti non particolarmente tossici per l'ape, questa può segnalare la presenza della molecola nell'ambiente sotto forma di residui. Le api rappresentano quindi un efficace filtro e la possibilità che i principi attivi degli agrofarmaci possano raggiungere il miele nell'alveare è molto remota.

### **2.2.2 Contaminanti derivanti dall'attività apistica**

Le sostanze usate per il controllo delle patologie delle api (in particolare varroasi e peste americana) rappresentano un rischio di contaminazione decisamente più reale.

La normativa di riferimento in materia di residui di miele, oltre alle leggi già citate, è rappresentata dal Regolamento CEE 2377/1990 e successive modifiche, che definisce la procedura per la determinazione dei Limiti Massimi di Residui (LMR) di medicinali

veterinari negli alimenti di origine animale. Secondo tale regolamento, è vietato immettere sul mercato farmaci per i quali non si conosca il destino a livello di prodotto alimentare finito e indica l'EMEA (Agenzia Europea per la Valutazione dei Prodotti Medicinali Veterinari) come l'organismo deputato a valutare queste procedure. Per quanto riguarda il miele non sono ammessi residui di sostanze farmacologicamente attive presenti in specialità veterinarie non autorizzate in apicoltura.

Per quanto riguarda gli acaricidi, questi possono essere distinti in due categorie: di sintesi e naturali. I primi, fra i quali citiamo cymiazolo, fluvalinate, amitraz, flumetrina e coumafos, sono altamente solubili nei grassi e tendono quindi ad accumularsi nella cera. Essi possono essere rinvenuti nel miele in seguito a contaminazione dei favi. Questi principi attivi possono essere somministrati solo attraverso i medicinali veterinari autorizzati. Per ciò che concerne l'impiego come acaricidi di sostanze ritenute non tossiche quali il timolo e gli acidi organici, presenti in natura come costituenti delle piante e del miele, non sono fissati LMR.

Talvolta è possibile ritrovare nel miele residui di antibiotici in seguito a trattamenti effettuati contro le malattie delle api quali la peste americana. Quando ciò accade, significa che le azioni di controllo delle patologie sono state eseguite in modo illegale, facendo ricorso a farmaci non autorizzati. La normativa vigente consente solo l'impiego, in seguito a prescrizione veterinaria, di farmaci appositamente registrati.

### **2.3 CONTROLLO DELLA GENUINITA'**

Il controllo della genuinità consiste nella ricerca di eventuali adulterazioni subite da parte del miele. Gli interventi atti al controllo della genuinità possono interessare componenti

specifici, presenti in alcuni tipi di mieli o derivanti dall'intervento dell'ape, o semplicemente parametri di routine.

Laddove alcuni parametri chimici quali l'attività enzimatica, il tenore di HMF, la conducibilità elettrica o il contenuto di prolina risultino più bassi rispetto ai valori attesi è possibile ipotizzare un'adulterazione a livello glucidico. E' comunque opportuno tenere conto della variabilità di questi parametri nei diversi tipi di miele e non dimenticare che alcuni di essi variano anche in seguito a trattamenti termici o a tempi di conservazione prolungati.

L'analisi quali-quantitativa del profilo glucidico può fornire utili informazioni circa eventuali adulterazioni, poiché i mieli adulterati presentano in genere una più elevata concentrazione di di- e trisaccaridi. Le tecniche analitiche maggiormente impiegate per questo scopo sono quelle di tipo cromatografico (HPLC e GC). Anche in questo caso si deve comunque tenere a mente che la concentrazione di zuccheri del miele è variabile nel tempo e che alcuni mieli uniflorali hanno un contenuto più o meno variabile di zuccheri. Per tale motivo il dato fornito dalla definizione del profilo glucidico spesso non è risolutivo per stabilire se vi siano state o meno delle adulterazioni del prodotto. La determinazione dei rapporti isotopici può in parte ovviare a questo problema. Il principio su cui si basa tale tipo di analisi è che il contenuto di carbonio a peso atomico 12 e 13 degli zuccheri è diverso nel miele naturale e nelle sostanze organiche provenienti da piante come il mais o la canna da zucchero. Questo metodo permette, tramite la spettrometria di massa, di individuare aggiunte di zucchero di canna e di mais anche del 7-10%. Non è comunque possibile determinare la presenza di zuccheri estranei derivanti da piante quali la barbabietola, che utilizzano gli stessi isotopi del carbonio della maggior parte delle piante nettariifere dei nostri climi. Metodi basati sulla risonanza magnetica nucleare volti

alla determinazione del rapporto deuterio/idrogeno possono essere più utili in questo senso.

L'adulterazione con zucchero di canna può essere inoltre rilevata attraverso analisi al microscopio volte alla ricerca di costituenti specifici. Recentemente sono stati avviati studi che vedono la combinazione di metodi spettroscopici (IR e NMR) e chemiometrici, i quali consentono di ottenere una sorta di impronta digitale molecolare del prodotto alimentare e che sembrano essere molto promettenti per la definizione della genuinità del miele.

## **2.4 CONTROLLO DELLA QUALITA'**

Il concetto di qualità riferito al miele è molto complesso e riguarda tutti i passaggi che vanno dalla scelta della postazione operata dall'apicoltore sino al consumatore.

Il controllo di qualità deve prevedere necessariamente l'esame organolettico e la determinazione di alcuni parametri chimico-fisici quali l'umidità (importante ai fini della conservabilità) e il tenore di HMF (indice di freschezza). Affinché un miele possa essere definito "di qualità", tali parametri dovranno presentare valori più ristretti rispetto a quelli previsti dalla normativa. Ad esempio, nei concorsi viene in genere richiesto un tenore di umidità inferiore al 18% e un contenuto di HMF inferiore a 10 mg/kg. La valutazione della pulizia può essere effettuata, oltre che attraverso un esame visivo, mediante la filtrazione di una soluzione acquosa di miele attraverso apposito filtro che trattiene i corpi estranei eventualmente presenti. La determinazione viene eseguita mediante pesatura prima e dopo filtrazione e può essere completata dall'osservazione microscopica dei residui presenti nel filtro stesso (filth test).

Un altro indice di qualità può essere rappresentato dall'attività degli enzimi diastasi e invertasi, in quanto il calore e l'invecchiamento prolungato provocano la loro progressiva inattivazione.

## **2.5 CONTROLLO DELL'ORIGINE BOTANICA**

### **2.5.1 Analisi chimico-fisiche**

Molti parametri sono correlati all'origine floreale dei mieli. Tra questi troviamo il colore, il quale viene determinato oggettivamente attraverso il riferimento della scala Pfund, impiegando un comparatore ottico. Attualmente si sta diffondendo anche l'utilizzo del colorimetro Hanna. Ciascun miele uniflorale rientra in una gamma di colorazione ben definita la cui valutazione rappresenta, dal punto di vista commerciale, un criterio molto importante.

Il pH si misura tramite determinazione diretta su una soluzione acquosa di miele. Acidità libera, lattoni e acidità totale vengono determinati per via potenziometrica. Questi parametri forniscono generalmente dati abbastanza caratteristici dell'origine botanica.

La conducibilità elettrica che come già spiegato in precedenza, è strettamente correlata al contenuto di minerali, e permette di differenziare i mieli di melata e castagno rispetto ai mieli di nettare o - più in generale - ai mieli chiari. Anche la rotazione specifica può contribuire alla definizione dell'origine botanica. Infatti i mieli di melata presentano valori positivi di tale parametro, contrariamente a quelli di nettare.

Alcuni tipi di miele presentano naturalmente uno specifico tenore in enzimi; ecco quindi che anche l'indice diastatico può contribuire alla determinazione dell'origine floreale dei mieli.

Anche lo spettro zuccherino può fornire informazioni rilevanti in tale contesto. La quantità di glucosio e fruttosio, il rapporto fra le loro concentrazioni, il tenore di zuccheri superiori, o la presenza di un determinato zucchero possono essere abbastanza indicativi dell'origine floreale. E' tuttavia opportuno porre l'accento sul fatto che talvolta mieli appartenenti a origini botaniche diverse possono presentare uno spettro zuccherino molto simile. Va inoltre considerato il ruolo di tutti quegli enzimi che intervengono in una serie di trasformazioni a carico degli zuccheri, fra i quali troviamo l'enzima invertasi, la cui attività è influenzata dal calore e dalla conservazione. Questo rappresenta un indice di grande variabilità e rende estremamente difficile l'utilizzo del profilo glucidico per la definizione dell'origine floreale.

Anche i composti responsabili dell'aroma del miele sono stati usati come marcatori specifici per alcuni prodotti uniflorali. L'estrazione della componente volatile tramite opportuni solventi e la sua definizione quali-quantitativa ha mostrato spesso differenze fra i mieli uniflorali. Ottimi risultati sono stati raggiunti con l'analisi dinamica dello spazio di testa e notevoli passi avanti sono stati fatti grazie all'ausilio di metodiche di microestrazione su fase solida, che hanno permesso anche la determinazione di componenti meno volatili dell'aroma.

I composti fenolici rappresentano un'altra classe utilizzata per determinare l'origine botanica. Alcuni di essi sono marker specifici di particolari origini floreali, come il metilantranilato e l'esperetina per il miele di agrumi, il kaempferolo per il miele di rosmarino, l'acido omogentisico per il miele di corbezzolo. Va comunque ricordato che non per tutti i mieli uniflorali sono stati individuati dei marcatori specifici.

## 2.5.2 Analisi melissopalinologiche

Tra gli elementi figurati che è possibile trovare in sospensione nel miele, i più importanti sono i granuli di polline, diretta espressione dei fiori visitati dall'ape. La bottinatrice viene infatti a contatto con le antere del fiore, e alcuni granuli pollinici vengono accidentalmente raccolti e introdotti nella borsa melaria. Qui, una parte dei granuli viene filtrata ad opera della valvola a forma di X che separa stomaco e intestino, mentre una parte rimane e si troverà successivamente nel miele. I fattori che influenzano la presenza del polline nei campioni di miele sono svariati: morfologia del fiore, numero di stami e quantità di polline che essi producono, quantità di nettare prodotto, dimensione dei granuli pollinici, presenza di nettari extraflorali, sterilità degli stami, unisessualità della specie botanica. I fattori appena citati sono responsabili del cosiddetto inquinamento primario, ed essendo legati fondamentalmente alla pianta portano ad una presenza di polline nel miele relativamente costante nell'ambito della stessa specie botanica. I diversi tipi di polline vengono definiti come iperrappresentati, normali o iporappresentati a seconda che la loro presenza nel nettare sia rispettivamente abbondante, normale o scarsa. Sono ad esempio, piante con polline iperrappresentato il castagno (*Castanea sativa*) e l'eucalipto (*Eucalyptus spp.*), mentre sono specie a polline iporappresentato il rosmarino (*Rosmarinus*) e il timo (*Thymus*).

Esiste anche una forma di inquinamento secondario che si verifica nell'ambito dell'alveare, quando l'ape bottinatrice cede ad un'altra ape il suo carico di nettare. Il polline che si trova all'interno dell'arnia, sui favi, sul corpo delle api o depositato nelle celle, può penetrare nel miele in formazione. L'inquinamento terziario avviene invece durante l'operazione di smielatura mentre quello quaternario deriva dai granuli pollinici presenti nell'atmosfera.

Si definisce analisi melissopalinologica l'esame condotto sul contenuto di polline presente nel miele al fine di ottenere informazioni circa l'origine botanica e/o geografica. La determinazione dell'origine botanica è possibile laddove la sorgente di nettare o di melata contenga elementi microscopici tipici, e in cui il contenuto primario di sedimento non sia stato alterato per aggiunta secondaria (per esempio durante l'estrazione) o per rimozione.

L'analisi prevede la separazione dei granuli pollinici e degli altri elementi figurati eventualmente presenti (spore, alghe verdi etc.), attraverso diluizione e centrifugazione di un'aliquota di miele; il sedimento ottenuto viene incluso fra due vetrini e analizzato al microscopio ottico.

L'analisi pollinica qualitativa consiste nell'identificazione dei granuli e degli altri elementi figurati e nella definizione delle rispettive percentuali di presenza. Il principio di tale analisi si basa sul fatto che i granuli di polline si differenziano morfologicamente l'uno dall'altro e quindi, esaminati al microscopio, sono riconoscibili come appartenenti a una specie, a un genere o a una famiglia botanica.

L'analisi quantitativa permette invece di stabilire l'appartenenza di un campione a una precisa classe di rappresentatività per i pollini (vedi Tab. 2.2).

Il metodo è affetto da numerosi problemi:

- differenti specie di piante producono differenti proporzioni di pollini;
- la quantità di polline può variare da stagione a stagione;
- la resa di nettare può essere differente in fiori maschili e femminili;
- le api potrebbero aver prelevato il polline di un certo tipo ma non il nettare;
- la maggior parte del polline può essere stato raccolto da piante che non dovevano costituire la sorgente per il miele.

A tutte queste problematiche si aggiunge la variabile entità dei diversi tipi di inquinamento

**Tabella 2.2** - Classi di rappresentatività dei pollini

<b>Classe I</b>	<b>PK/10 g inferiore a 20.000 (mieli a polline iporappresentato)</b>
<b>Classe II</b>	<b>PK/10 g compreso tra 20.000 e 100.000 (mieli a polline normale)</b>
<b>Classe III</b>	<b>PK/10 g compreso tra 100.000 e 500.000 (mieli a polline iperrappresentato)</b>
<b>Classe IV</b>	<b>PK/10 g compreso tra 500.000 e 1 milione (mieli a polline fortemente iperrappresentato o di pressatura)</b>
<b>Classe V</b>	<b>PK/10 g superiore a 1 milione (mieli di pressatura)</b>

A tutte queste problematiche si aggiunge la variabile entità dei diversi tipi di inquinamento di cui abbiamo parlato precedentemente e l'impossibilità da parte dell'analisi melissopalinologica di rivelare se si siano verificate manipolazioni (ad es., aggiunte fraudolente di polline o filtrazioni del miele) che abbiano in qualche modo alterato il profilo quali-quantitativo del polline presente.

Infine nel caso di mieli uniflorali, come quello di agrumi o di corbezzolo, in cui il polline rappresentativo è presente in quantità molto basse e variabili, l'analisi melissopalinologica non consente la sicura determinazione dell'origine botanica.

## **2.6 CONTROLLO DELL'ORIGINE GEOGRAFICA**

La possibilità di distinguere i mieli in base alla zona di produzione è molto importante in quanto il valore commerciale di questo alimento è spesso correlato all'origine geografica.

La legge attuale prevede inoltre che l'origine del prodotto venga indicata in etichetta (art. 4 D. Lgs. 179/2004) ed è quindi fondamentale poter usufruire di metodi di controllo della denominazione.

L'analisi dello spettro pollinico è da anni lo strumento più utilizzato per la georeferenziazione del miele. In alcuni casi, l'origine geografica può essere determinata attraverso la presenza di pollini caratteristici di piante che hanno una distribuzione limitata ad una certa regione. Più di frequente è la combinazione specifica di alcune forme polliniche ad essere indicativa della provenienza. E' chiaro che questo tipo di determinazione va incontro a tutte le problematiche di cui abbiamo parlato nel paragrafo precedente (miele filtrato etc.).

La determinazione di elementi in tracce è stata proposta in diversi studi come correlata all'origine geografica. E' ragionevole infatti supporre che la composizione degli elementi in tracce presenti nel miele sia strettamente connessa alle caratteristiche geochimiche del suolo sul quale sono cresciute le piante bottinate. Ad esempio, nell'ambito delle pregresse attività di questo gruppo di ricerca si è riusciti a discriminare campioni di miele multiflora prodotti a circa 50 Km di distanza<sup>12</sup>.

Numerosi studi hanno dimostrato che il profilo amminoacidico permette di individuare importanti differenze fra mieli appartenenti a diverse origini geografiche.

I flavonoidi, noti per essere marcatori dell'origine botanica del miele, possono servire anche come marcatori dell'origine geografica.

Le ricerche per la determinazione dell'origine geografica del miele sono ancora all'inizio ma vi sono promettenti metodi analitici che, combinati con tecniche chemio metriche, si candidano a fornire un valido strumento per una corretta georeferenziazione.

---

<sup>12</sup> S. Salis, Tesi di dottorato in Scienze dei sistemi agrari e delle produzioni alimentari, XXI ciclo, Università degli studi di Sassari, (A.A. 2007-2008)

## CAPITOLO 3

### CARATTERISTICHE DEI MIELI UNIFLORALI

#### 3.1 INTRODUZIONE

Secondo l'attuale legislazione in materia (D. Lgs. 179/2004 art. 3), il miele può riportare in etichetta un'indicazione che faccia riferimento all'origine botanica "...se il prodotto è interamente o principalmente ottenuto dalla pianta indicata e ne possiede le caratteristiche organolettiche, fisicochimiche e microscopiche".

Il vantaggio rappresentato dai mieli uniflorali è dato dalla possibilità di accedere ad una fascia di mercato selezionata. Prodotti differenziati con caratteristiche riconoscibili stimolano la curiosità del consumatore più attento e ne soddisfano il gusto in maniera particolare. Inoltre, la possibilità di etichettare un miele secondo l'origine floreale richiede una serie di interventi legati al controllo di tale definizione e questa è la ragione per la quale, negli ultimi anni, vi è stato un crescente interesse verso lo sviluppo di metodi chimico-analitici volti al controllo di tale definizione. Nei paragrafi successivi verranno descritte le principali caratteristiche dei mieli uniflorali più importanti dal punto di vista della produzione italiana, focalizzando l'attenzione sugli aspetti organolettici, sulle caratteristiche chimico-fisiche e su quelle melissopalino-logiche.

#### 3.2 MIELE DI ACACIA (*Robinia pseudacacia* L. – Leguminosae)

E' uno dei mieli più apprezzati grazie alla sua permanente liquidità e al suo aroma delicato.

In Italia viene prodotto principalmente nella zona prealpina e lungo la dorsale

appenninica. Grandi quantità vengono importate dai Paesi dell' est europeo (Ungheria) e dalla Cina, ma la qualità di tali importazioni è decisamente inferiore se paragonata a quella delle produzioni italiane. Le delicate caratteristiche organolettiche possono essere facilmente alterate dalla presenza di altri nettari o da errate tecniche produttive.



**Figura 3.1** Fiori di Acacia

Il miele di acacia rimane liquido a lungo e non cristallizza mai completamente. Il suo colore varia, in genere, da quasi incolore a giallo paglierino chiaro. Il suo odore, di debole intensità, può ricordare a volte il profumo dei fiori di robinia. Nei mieli di importazione spesso l'odore viene definito vegetale, di carta, poco fine, di "straccio bagnato". Il sapore è molto dolce, normalmente acido mentre l'aroma è di solito poco persistente.

Questo tipo di miele è caratterizzato da bassi valori di diastasi, conducibilità elettrica, colore e acidità. Presenta spesso elevati valori di fruttosio e di rapporto fruttosio/glucosio. La percentuale di polline di Robinia nei mieli di acacia è molto variabile e in genere superiore al 15%. Questo miele appartiene alla I classe di rappresentatività.

### 3.3 MIELE DI AGRUMI (*Citrus spp.* – Rutacee)

Con il termine “miele di agrumi” si indicano tutti i mieli prodotti sulle varie specie di *Citrus*. I mieli uniflorali più comuni sono quelli di arancio e di limone, soli o in miscela fra loro. Questi mieli sono apprezzati per l'intensità e per la finezza dell'aroma. Talvolta è possibile ritrovare nei mieli di agrumi altre essenze quali sulla e fieno greco che ne alterano le caratteristiche organolettiche.



**Figura 3.2** Fiori di arancio

Allo stato liquido si presenta da quasi incolore a giallo paglierino chiaro mentre quando cristallizza il colore varia da bianco, a volte perlaceo, a beige chiaro. Il miele di agrumi fresco ha un odore intenso che ricorda i fiori di zagara, fragrante; con il passare del tempo si sviluppa un odore meno fresco e intenso, più fruttato.

E' caratterizzato da bassi valori di attività diastolica, conducibilità elettrica e colore. Da rilevare la presenza caratterizzante di caffeina. La percentuale di polline di *Citrus* è molto variabile e in genere superiore al 10%. Appartiene alla I classe di rappresentatività.

### 3.4 MIELE DI ASFODELO (*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. – Liliacee)

E' prodotto principalmente in Sardegna, ma la pianta è diffusa lungo le coste mediterranee della Penisola. Nonostante le potenzialità della pianta, la produzione di miele non è costante per via delle condizioni climatiche e del grado di sviluppo delle colonie all'epoca della fioritura (febbraio-maggio). Altre fioriture vicine (sulla, agrumi, rosmarino) possono incidere sulla qualità di questo tipo di miele.



**Figura 3.3** Fiori di asfodelo

Allo stato liquido si presenta da quasi incolore a giallo paglierino con tonalità verdi. Generalmente cristallizza finemente nei mesi successivi la produzione e il colore varia da bianco ad avorio. L'odore, molto debole, ricorda il profumo erbaceo della pianta. Si tratta di un miele scarsamente caratterizzato che presenta bassi valori di diastasi e acidità libera. La percentuale di polline di *Asphodelus* è molto bassa, di solito inferiore al 2%, anche in relazione ai forti inquinamenti di polline di *Trifolium repens* gr.

### 3.5 MIELE DI CARDO (*Galactites tormentosa* Moench – Compositae)

Le produzioni italiane più importanti di miele di cardo riguardano la Sardegna, la Sicilia e

l'isola d'Elba. In realtà, la sua commercializzazione è rilevante soprattutto per l'apicoltura sarda, per la quale rappresenta una delle principali risorse.

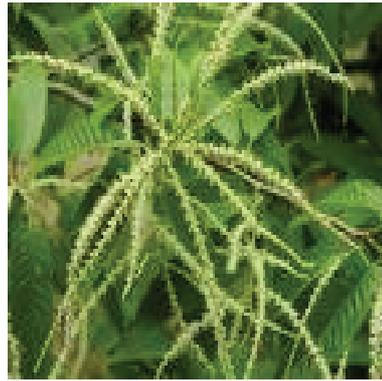


**Figura 3.4** Fiore di cardo

Il miele di cardo cristallizza spontaneamente alcuni mesi dopo il raccolto. Il colore varia da ambra chiaro ad ambra, con tonalità arancio e spesso, quando liquido, fluorescenza verde; quando cristallizza il colore varia invece da beige chiaro a beige scuro con tonalità gialle. L'odore è di media intensità e ha una connotazione florale. L'aroma è caratterizzato da una duplice natura: subito florale/fruttato, poi con retrogusto animale, putrescente, di farina di pesce. La percentuale di polline di *Carduus* è variabile e in genere compresa fra 5 e 25%. Appartiene alla I classe di rappresentatività. Da un punto di vista analitico è scarsamente caratterizzato e nessuno degli aspetti chimico-fisici può al momento dare indicazioni certe per la definizione dell'origine botanica.

### **3.6 MIELE DI CASTAGNO (*Castanea Sativa* Miller – Fagaceae)**

Il miele di castagno rappresenta una delle principali produzioni uniflorali a livello italiano. Se ne ottengono grandi quantità su tutto l'arco alpino, lungo la dorsale appenninica e nelle zone montuose delle maggiori isole.



**Figura 3.5** Fiori di castagno

Le sue caratteristiche particolari (colore scuro, odore pungente, sapore fortemente amaro) non incontrano in genere il gusto del consumatore medio ma quello dei consumatori più evoluti. Si trova spesso in miscela naturale con la melata prodotta sulla pianta stessa o con il miele di tiglio.

Si presenta allo stato liquido, con cristallizzazione molto lenta e non sempre regolare. Il colore varia dall'ambra più o meno scuro, con tonalità rossiccio/verdastre nel caso del miele liquido, al marrone nel cristallizzato. L'odore è intenso, pungente e fenolico mentre il sapore, non eccessivamente dolce è caratterizzato da un retrogusto quasi sempre amaro. La percentuale di polline di *Castanea* è comunemente superiore al 90% e la classe di rappresentatività è intermedia fra III e IV.

Il miele di castagno presenta valori di conducibilità elettrica e pH tendenzialmente alti e valori di acidità medio - bassi. E' caratterizzante la presenza di isomaltosio.

### **3.7 MIELE DI CORBEZZOLO (*Arbutus Unedo* L. – Ericaceae)**

Una produzione significativa di miele uniflorale di corbezzolo avviene esclusivamente in Sardegna e in alcune zone della maremma grossetana. Tale produzione è influenzata, quantitativamente e qualitativamente, dalle condizioni climatiche all'epoca della fioritura la

quale, essendo molto avanzata (ottobre-gennaio), limita lo sfruttamento come risorsa nettariifera alle zone dove l'attività di raccolta da parte delle api è possibile anche in autunno-inverno. Sebbene la pianta sia diffusa anche in Sicilia, non si conoscono produzioni di miele di corbezzolo provenienti da questa regione.



**Figura 3.6** Fiori di corbezzolo

Questo miele presenta uno spiccato sapore amaro che ne costituisce la principale peculiarità e che contribuisce a determinarne l'elevato valore commerciale.

La cristallizzazione avviene rapidamente, in maniera a volte irregolare per l'eccesso di umidità. Il colore è ambrato nel miele liquido e nel caso del miele cristallizzato varia da nocciola a marrone, con tonalità grigio-verdi. Il gusto dolce si percepisce solo all'inizio della degustazione ed è quasi completamente mascherato dalla forte componente amara.

Il miele di corbezzolo ha un contenuto di enzimi estremamente basso e può a volte, presentare un indice diastatico inferiore al limite di 3 u.d. previsto dalla normativa. I valori di umidità e acidità sono al contrario, elevati così come quelli di conducibilità elettrica. La percentuale di polline di *Arbutus* è molto bassa (compresa fra 8 e 20%) e la classe di rappresentatività è la I.

### 3.8 MIELE DI ERICA (*Erica Arborea* L. – Ericaceae)

Le regioni italiane nelle quali si hanno le produzioni più importanti di miele di Erica sono Liguria, Toscana, Umbria e Sardegna. Ha caratteristiche organolettiche estremamente peculiari che non sempre incontrano il gusto dei consumatori. Inoltre, gli elevati valori di umidità, HMF e acidità lo rendono poco conservabile e ne riducono il valore commerciale.



**Figura 3.7** Fiori di erica

Il miele di erica cristallizza rapidamente formando una massa morbida di cristalli fini. Allo stato liquido non è mai completamente limpido. Il colore è quello dell'ambra con riflessi arancio o rossi, nel caso del miele liquido. Nel prodotto cristallizzato il colore è in genere marrone. L'odore, di media intensità, è caratteristico del fiore mentre il sapore, normalmente dolce, ha una leggerissima punta amara. La percentuale di polline di *Erica* è di solito superiore al 45% e nel sedimento si riscontra una presenza costante di materiale cristallino insolubile. La classe di rappresentatività può variare da II a III.

### 3.9 MIELE DI EUCALIPTO (*Eucalyptus calimaldulensis* Dehnh. – Myrtaceae)

In Italia, le produzioni principali di miele di eucalipto provengono dalle zone costiere delle regioni centro-meridionali, Calabria, Sicilia e Sardegna. Dal punto di vista organolettico è un miele molto caratteristico (aroma e odore forti di tipo animale) e per tale ragione non è apprezzato da tutti.



**Figura 3.8** Fiore di eucalipto

Esso cristallizza spontaneamente in breve tempo e si presenta di colore ambrato quando è liquido e beige grigiastro quando cristallizza. Il sapore, normalmente dolce, è a volte leggermente salato e il suo aroma è intenso, ricorda la caramella mou alla liquirizia. Presenta valori medio - alti di diastasi e rapporti fruttosio/glucosio generalmente bassi. La percentuale di polline di *Eucalyptus* è superiore al 90% e la classe di rappresentatività è la III.

### 3.10 MIELE DI LAVANDA (*Lavandula spp.* –Labiatae)

La limitata produzione di miele di lavanda è localizzata, in Italia, nelle zone della Alpi occidentali per *L. angustifolia* (lavanda vera), in Sardegna e nell'isola d'Elba per *L. stoechas* (lavanda selvatica). I mieli uniflorali delle due specie presentano caratteristiche differenti.

A livello europeo le produzioni più significative provengono dalla Francia (*L. angustifolia*) e dalla Spagna (*L. angustifolia* e *L. stoechas*).



**Figura 3.9** Fiori di lavanda

La descrizione che segue è relativa al miele di lavanda vera. Esso cristallizza rapidamente con cristalli medio - fini e si presenta come un miele chiaro, quasi bianco quando non è allo stato liquido. L'odore ha un'intensità che va da media a forte e ha spesso connotazioni vegetali che ricordano l'odore del residuo della pianta dopo infusione o di foglie di fico.

Il sapore, normalmente dolce, è spiccatamente acido e leggermente astringente. Per quanto riguarda le caratteristiche chimico-fisiche l'unica caratteristica rilevante è quella relativa al contenuto particolarmente alto di saccarosio. I mieli provenienti da lavanda vera spontanea contengono una quantità normale di polline. Essi possono collocarsi nella II classe di rappresentatività.

### **3.11 MIELE DI ROSMARINO (*Rosmarinus officinalis* L. – Labiatae)**

La produzione di miele di rosmarino in Italia non è molto diffusa. Le regioni più importanti a tal riguardo sono Puglia, Sardegna e isole minori. Le produzioni sono invece

molto più importanti in Francia, Spagna e Nord Africa. Le rare partite di miele di rosmarino presentano ottime possibilità di commercializzazione grazie alle fini caratteristiche organolettiche che lo differenziano dagli altri mieli.



**Figura 3.10** Fiore di rosmarino

La cristallizzazione avviene alcuni mesi dopo il raccolto con cristalli a grana fine. Allo stato liquido si presenta da quasi incolore a giallo paglierino, allo stato cristallizzato bianco o avorio. E' caratterizzato da bassi valori di diastasi, colore e conducibilità elettrica. Ha una rotazione specifica debolmente negativa e fra gli oligosaccaridi va segnalata la presenza di erlosio. La percentuale di polline di *Rosmarinus* è molto variabile e in genere, superiore al 10%. Si colloca nella classe I di rappresentatività.

### **3.12 MIELE DI SULLA (*Hedysarium coronarium* L. – Leguminosae)**

Viene prodotto a partire dall'Appennino emiliano sino alla Sicilia, e si tratta di una produzione tipicamente italiana. La presenza di *Hedysarium* viene considerata come un indice della provenienza italiana.



**Figura 3.11** Fiori di sulla

Viene di solito commercializzato con denominazioni generiche probabilmente perché la pianta e il miele non sono sufficientemente conosciuti. Altri mieli di leguminose (trifoglio, erba medica etc.) hanno caratteristiche simili a quelle del miele di sulla.

Allo stato liquido si presenta da quasi incolore a giallo paglierino chiaro. Quando cristallizza il colore varia da bianco ad avorio. L'odore è molto debole e spesso non rilevabile mentre l'aroma è vegetale, di legumi verdi. Presenta valori bassi di conducibilità elettrica, colore e pH. E' caratterizzato da un alto tenore di saccarosio e ha caratteristiche analoghe a quelle degli altri mieli chiari. La percentuale di polline è elevata (superiore al 50%) e la classe di rappresentatività alla quale questo miele fa riferimento è la II.

### **3.13 MIELE DI TIGLIO (*Tilia spp.* – Tiliaceae)**

Viene prodotto principalmente nell'arco alpino, nell'Appennino settentrionale e talvolta, in zone urbane o suburbane sui tigli coltivati. Può trovarsi miscelato a miele di castagno o di melata.



**Figura 3.12** Fiori di tiglio

La cristallizzazione avviene molto tardi con cristalli grossi e irregolari. Nei mieli più puri il colore è ambra chiaro allo stato liquido, da bianco a crema nel cristallizzato. Il colore varia sino all'ambrato in funzione della presenza di melata. Ha un odore fresco e balsamico, e un sapore normalmente dolce che può presentare un retrogusto amaro nei mieli molto puri. Si tratta di un miele scarsamente caratterizzato per il quale si segnala la costante presenza del genziobiosio. La percentuale di polline di *Tilia* è estremamente variabile, ma quasi sempre bassa anche in relazione agli inquinamenti da polline di *Castanea*.

### **3.14 MIELE DI MELATA DI ABETE (*Abies alba* Miller, *Picea excelsa* Link – Pinaceae)**

Tra i mieli di melata, quello di abete è il più rinomato. La denominazione si riferisce sia a produzioni ottenute sull'abete bianco che su quello rosso. Le principali produzioni provengono dalla Toscana.



**Figura 3.13** Insetti produttori di melata

Il miele si presenta liquido e molto viscoso. Il colore varia dall'ambra scuro a quasi nero (nel caso dell'abete bianco), a volte con una leggera fluorescenza verde petrolio. L'odore è di media intensità, balsamico, di resina. Il sapore è meno dolce e meno acido rispetto ai mieli di nettare. E' caratterizzato da valori elevati di conducibilità elettrica, colore e pH. La rotazione specifica è positiva e presenta un basso tenore di fruttosio e un elevato contenuto in oligosaccaridi fra cui isomaltosio, melezzitosio, raffiniosio, trealosio ed erlosio. Gli elementi figurati indicatori di melata sono presenti in quantità variabile e vi è spesso abbondanza di pollini appartenenti a specie anemofile.

### **3.15 MIELE DI MELATA DI METCALFA (*Metcalfa pruinos* (Say))**

La produzione di melata di metcalfa si ha in genere, nelle aree pianeggianti o nelle basse colline, in tutte le regioni che si affacciano sulla pianura padana e al sud fino a Lazio e Abruzzo. A differenza delle altre melate, quella di metcalfa si definisce in base all'insetto che la produce anziché alla pianta: questo avviene a causa della polifagia dell'insetto che non permette di definire con precisione l'origine vegetale.

Questo miele si mantiene liquido a lungo e il colore va da ambra scuro a nero pece se il prodotto è liquido, marrone se cristallizzato. L'odore di media intensità ricorda la frutta

cotta e il sapore, non eccessivamente dolce, è a volte leggermente salato o acido. Presenta valori di diastasi, conducibilità elettrica, colore, pH e acidità elevati. La rotazione specifica è positiva. Gli elementi indicatori di melata sono presenti in quantità variabile e anche in questo caso vi è abbondanza di pollini appartenenti a specie anemofile.

## CAPITOLO 4

### GELATINA REALE

#### 4.1 INTRODUZIONE

La gelatina reale, più comunemente nota come pappa reale, viene secreta dalle ghiandole ipofaringee delle giovani api operaie per nutrire le larve (nei primi giorni di vita) e l'ape regina adulta (per tutta la vita). Si tratta di un prodotto che non è soggetto ad alcun tipo di conservazione nell'alveare, ma viene somministrato immediatamente dopo la secrezione.

Per tale ragione, la gelatina reale non è considerata un prodotto d'alveare tradizionale.

L'unico momento nel quale è possibile la sua estrazione da parte degli apicoltori si verifica quando essa si accumula nelle celle reali a causa di un lento consumo da parte delle larve.

La differenziazione fra l'ape regina e le operaie è strettamente relazionata all'alimentazione che ha luogo durante gli stadi larvali. Tutte le uova di sesso femminile possono potenzialmente generare una regina ma questo avviene solo quando, durante lo sviluppo della larva e in particolare nei primi quattro giorni di vita, ad esse è destinata un'alimentazione diversa da quella delle altre larve. L'allevamento della regina è regolato da meccanismi complessi all'interno dell'alveare, e induce in una larva giovane una serie di risposte ormonali che ne determineranno il corretto sviluppo ad ape regina. Questa si differenzia da una comune ape operaia per diversi aspetti:

- la sua morfologia: l'ape regina ha organi riproduttivi particolarmente sviluppati mentre l'ape operaia sviluppa principalmente gli organi preposti allo svolgimento del suo lavoro (mandibole più forti, ghiandole per la secrezione della gelatina reale, ghiandole

- per la produzione della cera);
- il periodo di sviluppo: per la regina dura mediamente 15.5 giorni mentre per l'operaia 21 giorni;
  - durata della vita: la regina vive per oltre 5 anni mentre l'ape operaia vive per massimo 90 giorni;
  - il comportamento: la regina depone fino a diverse migliaia di uova al giorno, mentre le api operaie depongono uova solo occasionalmente. A differenza delle api operaie inoltre, la regina non partecipa mai ad alcuna delle attività dell'alveare.



**Figura 4.1** Ape regina

La grande fertilità e l'ampia durata della vita dell'ape regina che – ricordiamolo - viene nutrita solo ed esclusivamente con gelatina reale, hanno portato inizialmente a credere che tale alimento potesse avere gli stessi effetti sull'uomo. Già durante gli anni '50 vennero pubblicati i primi articoli che pubblicizzavano le virtù della gelatina reale, in riferimento a ricerche condotte in diversi ospedali. Non fu tuttavia possibile rinvenire l'esatta origine di queste informazioni che vennero quindi considerate prive di fondamento.

Il mito della gelatina reale ebbe origine attraverso una speculazione commerciale che, alla luce dei risultati del tutto preliminari ottenuti da entomologi e fisiologi, sfruttò le vere (o

presunte...) virtù terapeutiche e le scarse conoscenze che allora si avevano riguardo questo alimento ancora poco diffuso, al fine di incrementarne l'appeal commerciale.

Negli anni immediatamente successivi alla sua commercializzazione, la gelatina reale divenne via via più conosciuta al grande pubblico e la crescente domanda motivò gli esperti del settore a migliorare le tecniche di produzione, portando un numero sempre maggiore di apicoltori a specializzarsi in tale attività. Allo stesso tempo, si intensificarono le ricerche relative al controllo di qualità del prodotto commerciale e all'identificazione delle proprietà biologiche e cliniche. Come vedremo nei paragrafi successivi sono numerosi gli studi relativi agli effetti dell'assunzione di gelatina reale sulla salute umana, ma non esistono al momento studi clinici completi che li possano confermare.

## 4.2 COMPOSIZIONE CHIMICA

I principali costituenti della composizione chimica della gelatina reale sono, nell'ordine: acqua, proteine, zuccheri, lipidi e sali minerali. Sebbene essi siano presenti in misura variabile da un campione all'altro, la composizione di questo alimento si può considerare pressoché costante in funzione sia delle colonie, che delle razze d'api e dei periodi di produzione.

L'acqua costituisce circa i due terzi della gelatina reale fresca. Per quanto riguarda le sostanze azotate, le proteine costituiscono mediamente il 73.9% di questa frazione e - delle sei proteine più importanti - quattro sono glicoproteine. Gli amminoacidi costituiscono in media il 2.3% del contenuto totale di composti azotati, i peptidi lo 0.16%. Sono stati identificati tutti gli amminoacidi essenziali per l'uomo ed altri ancora. Tra i primi, quelli più importanti sono acido aspartico e glutammico. Sono inoltre presenti diversi enzimi fra i quali citiamo la glucosio ossidasi, la fosfatasi e la colinesterasi.

**Tabella 4.1** Composizione chimica della gelatina reale<sup>13</sup>

	Minimo	Massimo
Acqua	57%	70%
Proteine	17% del peso secco	45% del peso secco
Zuccheri	18% del peso secco	52% del peso secco
Lipidi	3,5% del peso secco	19% del peso secco
Minerali	2% del peso secco	3% del peso secco

E' stata inoltre identificata una proteina simile all'insulina. Gli zuccheri principali sono fruttosio e glucosio, presenti in proporzioni simili a quelle del miele, ma con prevalenza di fruttosio. In molti casi il contenuto totale di questi due monosaccaridi costituisce il 90% degli zuccheri totali. Sono presenti, in quantità minori, anche maltosio, trealosio, melibiosio, ribosio ed erlosio.

Il profilo lipidico rappresenta la caratteristica più peculiare della gelatina reale. Esso è costituito principalmente da acidi grassi liberi, soprattutto a catena corta (da 8 a 10 atomi di carbonio), a differenza di ciò che si riscontra nella maggior parte dei prodotti di origine animale e vegetale nei quali vengono rinvenuti acidi grassi con un numero di atomi di carbonio che va da 14 a 20. Questi acidi grassi sono ritenuti essere i maggiori responsabili dell'attività biologica sino ad ora oggettivata per la gelatina reale. Tra di essi, il più importante è l'acido 10-idrossi-2-decenoico (10-HDA), seguito dal suo equivalente saturo, l'acido 10-idrossidecanoico. Sono inoltre presenti lipidi non polari, steroli (incluso il colesterolo), e una frazione non saponificabile di idrocarburi simile a quella riscontrabile per gli estratti di cera d'api.

<sup>13</sup> Lercker G., Caboni M.F., Vecchi M.A., Sabatini A. G., Nanetti A., Apicoltura 8:11-21

Il contenuto totale di ceneri equivale a circa l'1% del prodotto fresco. Gli elementi più abbondanti sono K, Ca, Na, Zn, Fe, Cu e Mn ma il potassio è quello leggermente più abbondante.

Il contenuto di vitamine è stato oggetto di numerosi studi, in quanto la gelatina reale risulta esserne particolarmente ricca. Sono state rintracciate solo vitamine idrosolubili, e dalla letteratura emerge che siano presenti solo tracce di acido ascorbico. Le vitamine liposolubili sono invece risultate essere totalmente assenti.

Recentemente è stata dimostrata la presenza di piccole quantità di testosterone. Sono state inoltre identificate due sostanze eterocicliche, la biopterina e la neopterina, diversi nucleotidi fra i quali citiamo adenosina, uridina, guanosina, iridina e citidina, AMP, ADP e ATP. Sono presenti anche acetilcolina e acido gluconico. Allo stato attuale, sono ancora in atto numerosi studi volti a definire in maniera completa la composizione chimica della gelatina reale.

### **4.3 PROPRIETA' FISICHE**

La gelatina reale è una sostanza omogenea, di colore biancastro con tonalità gialle o beige. Possiede un caratteristico odore fenolico e un sapore tendenzialmente acido. La sua densità è approssimativamente di 1.1 g/cm<sup>3</sup> ed è parzialmente solubile in acqua. Le soluzioni acquose di gelatina reale possono essere chiarificate tramite trattamento con soda.

La sua viscosità varia in relazione al contenuto di acqua e al periodo di conservazione. Essa aumenta lentamente quando il prodotto viene conservato a temperatura ambiente o a 5°C. Tale incremento pare essere legato ad un aumento nella concentrazione di composti azotati non solubili in acqua e ad una riduzione dell'azoto solubile e degli

amminoacidi liberi. Questi cambiamenti sono apparentemente dovuti alla continua attività enzimatica e alle interazioni fra la frazione lipidica e quella proteica. L'aggiunta di saccarosio determina una maggiore fluidità della gelatina reale. Alcuni residui solidi presenti nei campioni di gelatina reale, quali frammenti di pelle larvale, sono sintomo di purezza. A seconda delle modalità di estrazione del prodotto è possibile rinvenire pezzi di cera. Talvolta la gelatina reale sviluppa, durante il periodo di conservazione, piccoli granuli derivanti dalla precipitazione di alcuni suoi costituenti.

#### **4.4 TECNICHE DI PRODUZIONE**

Come abbiamo già spiegato precedentemente, la gelatina reale non è soggetta ad alcun tipo di immagazzinamento e viene trasferita direttamente, dalle api nutrici alle larve giovani che la consumano. Tale aspetto ha per anni rappresentato un ostacolo per l'estrazione di questo prodotto. Esiste però un momento in cui nelle celle reali le larve ricevono molta gelatina e - per un breve periodo - ne lasciano una parte sul fondo della cella per consumarla in un secondo momento. Su questa piccola eccedenza temporanea è basato l'attuale procedimento di estrazione.

La cella reale rappresenta l'unica fonte dalla quale è possibile estrarre quantitativi rilevanti di gelatina reale, e la sua costruzione da parte delle api ha luogo in due casi specifici:

- quando avviene la morte naturale o accidentale della regina, e nasce quindi l'esigenza di allevarne un'altra;
- nel periodo della sciamatura, quando le api delle grosse colonie si dividono per formare altre famiglie; prima della partenza della regina vecchia con parte delle bottinatrici e dei fuchi viene avviato l'allevamento delle nuove regine.

Per aver continuamente a disposizione gelatina reale per la raccolta, è necessario creare artificialmente lo stimolo alla costruzione di celle reali. Questo avviene dando l'impressione alla colonia di essere orfana e di dover allevare una nuova regina: ciò determina la costruzione di nuove celle reali nei favi da parti delle api operaie.

Per rendere funzionale l'estrazione è stato ideato uno speciale telaino in cui si concentra l'allevamento delle nuove api regine. Esso è provvisto di supporti in cui vengono applicate delle stecche di legno estraibili, portanti delle celle reali artificiali fatte da cupolini di cera entro ognuna delle quali viene trasferita una larva di operaia dell'età di 12-36 ore.



**Figura 4.2** Telaino portastecche con cupolini artificiali applicati

In questo modo, diverse larve possono essere accettate ed elette a future api regine. Esse vengono quindi alimentate con gelatina reale e le cellette vengono progressivamente allungate a forma di celle reali in tutto simili a quelle naturali. Trascorsi tre giorni, l'apicoltore preleva il telaino e procede all'estrazione della gelatina reale dai singoli cupolini, dopo aver allontanato le larve da ciascuna delle celle. Questo metodo permette di ottenere anche 200-300 mg di gelatina reale per ogni cupolino. Al fine di ottenere buoni risultati nella produzione di gelatina reale, l'apicoltore deve assicurarsi che siano soddisfatte alcune condizioni:

- presenza di un ambiente favorevole alla vita delle api, escludendo ad esempio la presenza di fitofarmaci;
- costante e continua presenza di fioriture nettariifere e pollinifere per tutto il periodo dell'estrazione;
- alveari forti con regine giovani, ben popolati di api nutrici;
- alimentazione ben curata delle colonie d'api.

Ma entriamo ora nello specifico dei metodi di produzione. Questi possono essere classificati in due categorie: naturali e artificiali. I primi si basano sull'utilizzo di celle naturali che la colonia costruisce sui favi. In questo caso non si utilizzano i cupolini artificiali di cui abbiamo parlato precedentemente, ma l'estrazione riguarda solo ed esclusivamente le celle reali che naturalmente le api hanno costruito e che si trovano dislocate nell'alveare. In casi come questi la produzione è limitata e non sempre della migliore qualità.

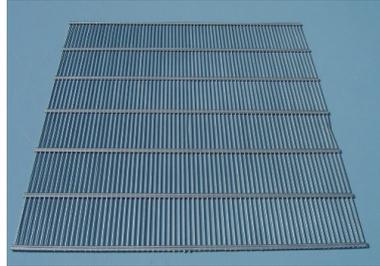
I metodi artificiali, che fanno invece utilizzo dei telaini portastecche, possono essere suddivisi in due gruppi:

- per estensione in verticale;
- per estensione in orizzontale.

Nel primo caso la famiglia viene estesa in altezza e la gelatina reale si produce sopra il nido, per esempio in un melario separato da griglia escludi-regina.

Nel secondo caso invece, la famiglia viene divisa orizzontalmente confinando la regina da una parte, mentre nell'altra si produce la gelatina reale. In questo caso specifico si può utilizzare la cosiddetta arnia a cassone. Si tratta di un'arnia particolare, suddivisa in tre parti che ospitano ciascuna una famiglia diversa.

Le famiglie ai lati sono su 10 telaini e hanno la regina; la famiglia centrale è su 7 telaini ed è orfana di regina.



**Figura 4.3** Escludi-regina

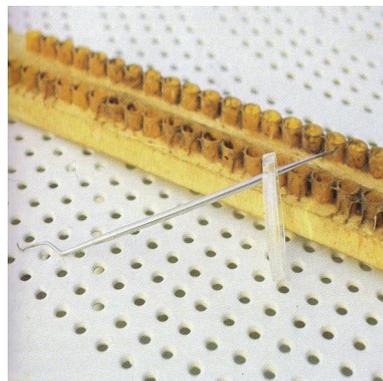
Ogni colonia è separata dall'altra mediante un diaframma ermetico, al centro del quale vi è un'apertura di circa 10x15 cm con escludi regina.



**Figura 4.4** Arnia a cassone

Inoltre, ogni famiglia ha un'apertura propria per accedere e uscire autonomamente dall'alveare. In questo modo, le api al centro sentono solo lievemente la presenza delle regine. Dotando la colonia centrale di celle reali artificiali (i cupolini di cera o plastica citati prima) provviste di giovani larve trapiantate, si ottiene l'allevamento di parecchie celle da cui estrarre la gelatina reale.

Una delle fasi più delicate della produzione di gelatina reale è data dal trapianto delle larve nei cupolini. Si preleva da un comune alveare un favo di covata fresca con larve di età inferiore ai tre giorni. Il favo viene liberato dalle api e posto verticalmente all'interno di un cassetto di protezione per evitarne il raffreddamento con danni alla covata. Le operazioni successive devono essere preferibilmente eseguite in una stanza con una temperatura compresa fra i 20 e i 25 °C ed un'adeguata illuminazione. Il favo con la covata fresca viene trasferito nel laboratorio, e utilizzando il cogli-larva o picking, si esegue il trapianto delle larve (traslarvo). Per facilitare l'accettazione delle larve, sul fondo di ogni cella artificiale viene deposta una goccia di gelatina reale diluita con acqua distillata. Questa operazione è la più complicata e se non viene eseguita correttamente si rischia di compromettere l'intero processo. Il trapianto deve essere condotto con delicatezza ma allo stesso tempo con velocità per non raffreddare - e quindi uccidere - la larva.



**Figura 4.5** Picking o cogli-larva con lente di ingrandimento

Una volta individuata la larva più idonea, si introduce il picking nella celletta, facendo scivolare la punta sotto la larva senza ferirla; successivamente la si preleva rimuovendola dalla celletta e, portandola sulla punta del picking, la si depone sul fondo del cupolino artificiale sopra la goccia di gelatina reale. Terminato il trapianto in tutti i cupolini, le

stecche vanno montate sul telaino apposito che si introduce nella famiglia dello scompartimento centrale dell'arnia a cassone.

Dopo 72 ore dal trapianto, si procede con il prelievo delle stecche le quali vengono direttamente portate in laboratorio. Per prima cosa si provvede tramite un bisturi all'accorciamento delle celle reali costruite sui cupolini artificiali, per agevolare l'asportazione delle larve che avverrà con il picking. Attraverso un aspiratore automatico si preleva quindi la gelatina reale che verrà immessa direttamente in un contenitore di vetro, passando attraverso un filtro che trattiene tutti i residui di cera. Una volta terminata questa operazione, la gelatina reale viene conservata in frigo, in contenitori di vetro scuro e al buio. Le stecche possono essere preparate nuovamente trapiantandovi altre larve e riponendole nel telaino porta-stecche dentro il cassone per compiere una nuova estrazione dopo altre 72 ore. Il ciclo si potrà ripetere per tutta la primavera ed estate. La famiglia orfana andrà continuamente rifornita di api nutrici.

#### **4.5 CONSERVAZIONE**

La gelatina reale ha una shelf-life molto limitata, e la conservazione a lungo termine porta a numerosi cambiamenti nella sua composizione chimica quali l'aumento di acidità, il decremento del contenuto in amminoacidi liberi e la diminuzione dell'attività della glucosio ossidasi. Tali cambiamenti inducono a pensare che anche l'attività biologica della gelatina reale possa essere in qualche modo influenzata da periodi di conservazione prolungati. La refrigerazione ed il congelamento rallentano notevolmente i mutamenti nella composizione chimica. Tali variazioni hanno luogo, sebbene in misura ridotta, anche quando la gelatina reale è conservata in forma liofilizzata.

La conservazione a temperature comprese fra 0 e 5 °C è solo un requisito minimo per

garantire la stabilità della gelatina reale. A tale scopo la temperatura ideale di conservazione è  $-17^{\circ}\text{C}$ . Al momento non esistono, anche a livello legislativo, dei limiti di sicurezza relativi alla salvaguardia dell'attività biologica. In Europa il tempo medio di conservazione raccomandato è di 18 mesi in congelatore. Dopo lo scongelamento e il confezionamento, il prodotto può essere mantenuto in frigo per un periodo non superiore ai 12 mesi.

Tuttavia, nella pratica commerciale, la gelatina reale liofilizzata e i prodotti contenenti gelatina reale vengono conservati a temperatura ambiente, a volte anche per alcuni anni. La forma liofilizzata è più stabile rispetto a quella fresca ma solo nei primi due mesi di conservazione a temperatura ambiente non si sono riscontrati segni di deterioramento.

Analogamente ad altri prodotti d'alveare, la gelatina reale presenta pochi problemi di contaminazione microbica. Ciononostante durante la produzione devono essere osservate alcune precauzioni. Condizioni igieniche di lavoro e contenitori puliti sono dei requisiti indispensabili per garantire la salubrità del prodotto; sarebbe inoltre opportuno utilizzare contenitori ermetici per evitare non solo la contaminazione da parte di microrganismi ma anche fenomeni ossidativi.

#### **4.6 AUTENTICITA' E FRESCHEZZA**

La conoscenza della composizione chimica della gelatina reale è di fondamentale importanza per stabilire dei parametri di qualità, e permettere di stabilire la sua presenza in altri prodotti. Attualmente diversi Paesi quali Svizzera, Bulgaria, Brasile e Uruguay hanno definito standard nazionali di qualità per questo prodotto.

La determinazione dell'acido 10-idrossi-2-decenoico rappresenta la via più seguita per la ricerca di eventuali adulterazioni subite dalla gelatina reale. Ad ogni modo la

concentrazione di questo analita varia in un range molto ampio, e per tale ragione non sempre può dare indicazioni precise in tale ambito. Sono stati condotti degli studi volti a verificare se i rapporti degli isotopi stabili di Carbonio e/o Azoto possano essere in qualche modo utilizzati per tali tipi di controllo ma, sebbene molto promettenti, essi richiedono ulteriori approfondimenti<sup>14</sup>. In generale possiamo affermare che l'adulterazione con miele determina un decremento nel contenuto di proteine e lipidi e un aumento nel tenore di zuccheri<sup>15</sup>. Quando l'adulterazione coinvolge più del 25% del prodotto e viene effettuata con yogurt, bianco d'uovo o amido di mais si verifica un aumento del contenuto di acqua, una diminuzione della concentrazione di proteine, lipidi (in particolare dell'acido 10-idrossi-2-decenoico), nonché una minore solubilità della matrice in mezzo alcalino<sup>16</sup>. Analisi al microscopio, volte alla ricerca di sedimenti e all'identificazione dei granuli pollinici possono dare indicazioni circa l'origine geografica e rivelare eventuali miscele con altri prodotti<sup>17,18</sup>. Recentemente è stata proposta come marker per l'autenticità della gelatina reale una proteina chiamata apalbumina<sup>19</sup>.

Un altro aspetto fondamentale per la qualità della gelatina reale riguarda la ricerca di parametri utili per definirne la freschezza. L'attività della glucosio ossidasi si candida ad essere un buon indice di freschezza in quanto pare essere influenzata dal tempo e dalla temperatura di conservazione. A 20°C l'attività di tale enzima decresce in misura

---

<sup>14</sup> Stocker A., Isolation and characterization of substances from Royal Jelly. PhD Thesis; Université d'Orléans; Orléans (France) (2003).

<sup>15</sup> Serra Bonhevi J., Escola Jorda R., Deutsche Lebensmittel-Rundschau 87, 256-260 (1991)

<sup>16</sup> Garcia-Amoedo L.H., Almeida-Muradian L.B., Química Nova 30(2) 257-259 (2007)

<sup>17</sup> Louveax J., Maurizio A., Vorwhol G., Bee World 59(4) 139-157 (1978)

<sup>18</sup> Ricciardelli D'albore G., Attidella Accademia gioenia di Scienze Naturali in Catania 19 45-60 (1986)

<sup>19</sup> Simuth J., Bilikova K., Kovacova E., Kuzmova Z., Schroeder W., J Agric Food chem 52 (8) 2154-2158 (2004)

significativa nell'arco di un mese, per annullarsi completamente nel giro di un anno. Anche a 4°C si verifica una diminuzione, seppure abbastanza ridotta, dell'attività della glucosio ossidasi. E' opportuno comunque ricordare che gli studi sulla relazione fra attività della glucosio ossidasi e la freschezza della gelatina reale necessitano di ulteriori approfondimenti, a causa della naturale variabilità che caratterizza l'enzima anche nel prodotto fresco<sup>20</sup>.

Sono stati condotti diversi esperimenti per valutare la possibilità di utilizzare la concentrazione di furosina come indice della freschezza di questo alimento<sup>21</sup>. La furosina è uno dei prodotti derivanti dalla reazione di Maillard ed ha una concentrazione molto bassa nella gelatina reale appena estratta<sup>22</sup>, ma il suo tenore tende ad aumentare nel tempo e in funzione della temperatura.

#### **4.7 USI COMMERCIALI DELLA GELATINA REALE**

La gelatina reale può presentarsi in commercio sotto diverse forme: come prodotto fresco, miscelata ad altri prodotti (ad es. miele), o liofilizzata. La produzione e la vendita della gelatina reale fresca possono essere gestite anche da piccole aziende in quanto non sono richiesti particolari requisiti tecnologici. In tale forma può essere direttamente addizionata ad altri alimenti, supplementi dietetici o cosmetici. Per ciò che concerne la commercializzazione su vasta scala viene in genere preferita la forma liofilizzata in quanto quest'ultima ha una shelf-life più lunga e ha requisiti di conservazione meno restrittivi.

---

<sup>20</sup> Boselli E., Caboni M.F., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Lercker G., *Apidologie* 34: 1-7 (2003)

<sup>21</sup> Marconi E., Caboni M.F., Messia M.C., Panfili G.J., *J Agric Food Chem* 50 2825-2829 (2002)

<sup>22</sup> Messia M.C., Caboni M.F., Marconi E., *Atti del Convegno "Strategie per la valorizzazione dei prodotti dell'alveare"*, Università degli Studi del Molise, Campobasso, pp. 83-92 (2003)

Anche la gelatina reale liofilizzata può essere addizionata ad altri prodotti di varia natura così come quella fresca. La sua produzione richiede investimenti più elevati e una quantità di prodotto fresco consistente.

#### 4.7.1 Integratore alimentare

La gelatina reale appartiene ad una categoria di prodotti noti come supplementi dietetici, o integratori alimentari. Essi vengono consumati non tanto per il loro contenuto calorico o per le loro caratteristiche organolettiche, ma per il loro supporto alla dieta quotidiana con particolari sostanze quali vitamine, minerali, acidi grassi etc.



**Figura 4.6** Varietà di prodotti contenenti gelatina reale (da sinistra a destra): gelatina reale liofilizzata con solvente, sapone, fiale con soluzioni di gelatina reale, yogurt, crema cosmetica, gelatina reale fresca, shampoo con gelatina reale

La gelatina reale fresca viene generalmente venduta in piccoli flaconcini inseriti all'interno di scatole in polistirene aventi la funzione di proteggere il prodotto da luce e variazioni di temperatura. Alcuni produttori vendono la gelatina reale quando questa si trova ancora nelle celle reali, dopo aver rimosso le larve e sigillato le celle con della cera. La gelatina reale venduta in questa modalità tende a perdere i suoi requisiti di freschezza in più breve

tempo rispetto a quella venduta in flaconcini. D'altro canto, questo tipo di vendita - che avviene direttamente fra produttore e consumatore - garantisce a quest'ultimo la sicurezza di un prodotto fresco e non trattato. In qualsiasi forma essa venga commercializzata, la gelatina reale dovrebbe essere mantenuta ad una temperatura uguale o inferiore ai 5°C durante tutte le fasi intercorrenti la produzione e la vendita.

#### **4.7.2 Prodotti alimentari**

La miscela di gelatina reale e miele rappresenta la maniera più comune nella quale questo prodotto può essere rinvenuto in altri alimenti. Tale miscela è caratterizzata da un sapore piacevole e unisce le peculiarità del miele a quelle della gelatina reale.

Un altro alimento al quale viene addizionata comunemente la gelatina reale è lo yogurt. Esso ha un'acidità simile a quella della gelatina reale e presenta grossomodo gli stessi requisiti di conservazione.

Talvolta, anche i supplementi vitaminici o i succhi di frutta possono essere arricchiti di gelatina reale liofilizzata.

#### **4.7.3 Prodotti farmaceutici**

Nonostante non vi siano ancora solide basi scientifiche che dimostrino con certezza gli effetti benefici di questo alimento sulla salute umana, la gelatina reale può rientrare nella composizione di prodotti farmaceutici per via della sua azione stimolante, ma può essere anche utilizzata per risolvere problemi di salute specifici.

La forma di gelatina reale privilegiata per tale tipo di impiego è quella liofilizzata. Le confezioni includono in genere un solvente nel quale disciogliere il prodotto prima dell'assunzione orale (Fig. 4.7). In altri casi, la gelatina reale può essere commercializzata

sottoforma di tavolette nelle quali si trovano eccipienti quali zuccheri, gomma arabica etc., o ancora sottoforma di soluzione acquosa contenuta in opportune fialette in vetro, alle quali vengono addizionati alcol o estratti di propoli per prevenire la proliferazione microbica.

Sono inoltre presenti in commercio prodotti a base di gelatina reale, miele ed estratti di ginseng. Poiché questi prodotti non sono considerati né come medicinali né come alimenti, non è obbligatorio riportare nella confezione tutti gli ingredienti.

L'uso della gelatina reale come medicinale è molto popolare in Asia e nell'Est Europa, dove la normativa riguardante i prodotti di tipo medico è diversa rispetto alla nostra o a quella del Nord America.



**Figura 4.7** Confezione di gelatina reale liofilizzata con flaconi di solvente (acqua e glucosio) per uso orale

#### 4.7.4 Prodotti cosmetici

Ad eccezione dell'Asia, negli altri continenti il settore che fa il più ampio uso di gelatina reale è quello cosmetico. Essa è utilizzata nelle preparazioni dermatologiche, o anche in creme e unguenti indicati per ustioni o lesioni di altro tipo. Per questo genere di applicazioni la forma liofilizzata è quella favorita.

#### **4.7.5 Altri impieghi**

Talvolta la gelatina reale può essere impiegata nel settore della nutrizione animale. Ad esempio, può essere occasionalmente somministrata ai cavalli da corsa e a scopo sperimentale, viene utilizzata per nutrire insetti.

## CAPITOLO 5

### PROPRIETA' BIOLOGICHE DELLA GELATINA REALE

#### 5.1 EFFETTI FISIOLGICI SULLE API

Gli effetti derivanti dall'assunzione di gelatina reale da parte delle larve rappresentano la base da cui è partita buona parte del “mito” relativo a questo alimento. La stupefacente risposta ormonale delle larve in seguito alla nutrizione con gelatina reale portò a credere che essa potesse avere i medesimi effetti sull'uomo. Si osservò infatti, che tale risposta era determinante non solo per la differenziazione fra l'ape regina e le api operaie, ma era anche responsabile della grande fertilità e longevità della regina.

Furono portati avanti diversi studi volti alla ricerca di ormoni o altre sostanze che fossero in grado di determinare lo sviluppo delle larve ad api regina, e che conferissero a quest'ultima qualità superiori rispetto a quelle delle altre api. Alla fine degli anni '80 il mistero riguardante gli “effetti miracolosi” della gelatina reale non era stato ancora chiarito e furono formulate diverse ipotesi, spesso contrastanti fra loro. Venne ad esempio proposto un meccanismo di nutrizione che prevedeva proporzioni di sostanze nutrienti differenti per le operaie e per la regina. Altri invece invocarono il diverso contenuto di zuccheri come fattore chiave per la differenziazione<sup>23</sup>. Anche la viscosità fu da alcuni ritenuta parametro determinante a tal riguardo<sup>24</sup>. In realtà, ancora oggi non è

---

<sup>23</sup> Weiss K., *Apidologie* 6, 95-120 (1975)

<sup>24</sup> Sasaki, M., Tsuruta, T. and Asada, S. *Chemistry and biology of social insects* (edito da Eder J., Rembold H.). Munich, German Federal Republic, Verlag J. Papemy 306-307 (1987)

noto quale sia il meccanismo di azione della gelatina reale e quali componenti siano effettivamente responsabili di tali effetti sorprendenti sulle larve.

## 5.2 PROVE CIRCOSTANZIALI NON CONFERMATE

La gelatina reale fu inizialmente pubblicizzata per i suoi presunti effetti di ringiovanimento<sup>25</sup>. Molti consumatori hanno spesso dichiarato di aver risolto gran parte dei loro problemi di salute grazie all'assunzione di gelatina reale. In molti casi si trattava di disordini di natura cronica per i quali altri tipi di trattamento non avevano portato i risultati sperati, tanto da definire “miracolosi” gli effetti della gelatina reale. Fra i presunti benefici della gelatina reale citiamo un generale senso di benessere, una maggiore resistenza alla fatica, migliore capacità di apprendimento e memoria più efficiente. In altri termini, la gelatina reale pare avere un generale effetto stimolante ed essere di aiuto per la risposta immunitaria e per le funzioni dell'organismo.

## 5.3 STUDI SCIENTIFICI

La gelatina reale è risultata non essere tossica se iniettata in topi e ratti ad alti dosaggi<sup>26</sup>. Essa non ha inoltre mostrato attività mutagena in seguito a studi condotti sulla *Salmonella typhimurium*<sup>27</sup>.

Sono stati riportati casi di dermatite da contatto in 2 pazienti su 10 sottoposti a patch test<sup>28</sup>. La pratica delle iniezioni intramuscolari e intraperitoneali è stata completamente

---

<sup>25</sup> De Belfever B., La gelee royale des abeilles. Maloine, Paris (1958)

<sup>26</sup> Hashimoto T., Tori M., Asakawa Y., Wollenweber E., Zeitschrift für Naturforschung C 43, 470-472 (1988)

<sup>27</sup> Tamura T., Fujii A., Kubiyama N., Honeybee Science 6 (1) 7-12 (1985)

<sup>28</sup> Takahashi M., Matsuo I., Ohkido M., Contact Dermatitis, 9 (6) 452-455 (1983)

abbandonata per via del rischio di reazioni allergiche molto gravi<sup>29</sup>. Attualmente, la gelatina reale viene somministrata oralmente o mediante applicazioni esterne (nella cosmesi).

Alcuni studi condotti in vitro hanno dimostrato che l'acido 10-idrossidecanoico è provvisto di attività antibiotica. Tale attività non pare essere influenzata negativamente dall'esposizione al calore ma tende comunque a diminuire per malconservazione del prodotto. Per gli studi sull'attività antibiotica dell'acido 10-idrossidecanoico sono stati presi in considerazione i seguenti microrganismi: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*<sup>30,31</sup>. L'attività antimicrobica è stata valutata essere pari ad un quarto di quella mostrata dalla penicillina nei confronti del *Micrococcus pyrogenus*. L'acido 10-idrossidecanoico si è anche dimostrato essere un buon fungicida<sup>32</sup>. Si è inoltre osservata una migliore resistenza da parte dei topi alle infezioni virali. L'azione antibiotica non è stata osservata a pH superiori a 5.6. Poiché le iniezioni endovena, intramuscolo e intraperitoneali determinerebbero un innalzamento del pH a 7.4, e il pH dell'intestino supera la soglia di 5.6, il valore terapeutico dell'azione antibiotica degli acidi grassi è da considerarsi trascurabile nel caso di applicazioni interne, ma rimane comunque effettivo nel caso delle applicazioni topiche.

### 5.3.1 Studi clinici su animali

In seguito a somministrazione orale sono stati osservati effetti positivi sulla riproduttività di polli, quaglie e conigli, non necessariamente dovuti ad un'azione di tipo ormonale. Nei

---

<sup>29</sup> Dillon J.C., Louveaux J., Cah. Nutr. Diet., 22 (6) 456-465 (1987)

<sup>30</sup> Lavie P., Chauvin vol. 3, 1-115 (1968)

<sup>31</sup> Yatsunami K., Echigo T., Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University No.25, 13-221 (1985)

<sup>32</sup> Blum M.S., Novak A.F., Taber III, 5 Science, 130 452-453 (1959)

conigli sono stati riscontrati, in seguito ad una dieta normale implementata con 200-300 mg di gelatina reale per kg corporeo, maggiore fertilità e sviluppo embrionale<sup>33</sup>. Uno studio condotto su quaglie giapponesi ha mostrato un raggiungimento più precoce della maturità sessuale e un incremento notevole nel numero di uova deposte da parte dei soggetti la cui dieta era stata supplementata con alti dosaggi di gelatina reale liofilizzata<sup>34</sup>. Bonomi ha osservato nelle galline un miglioramento della fertilità (e quindi un aumento del numero di uova deposte) in seguito a somministrazione orale giornaliera di 5 mg di gelatina reale per kg di cibo<sup>35</sup>. Nello stesso studio sono stati documentati aumenti di peso per polli, pernici e fagiani alimentati con i medesimi quantitativi di gelatina reale.

Dosaggi di 1 g di gelatina reale per kg di cibo determinano nei topi un incremento della velocità dello sviluppo, tuttavia ottengono l'effetto opposto<sup>36</sup>. La somministrazione di 0.02 g di gelatina reale a vitelli nati da meno di sette giorni produce un aumento di peso dell'11-13%<sup>37</sup>. I soggetti coinvolti nello studio hanno mostrato inoltre una mortalità inferiore e una maggiore resistenza alle infezioni.

In altri tipi di studi alcune malattie umane sono state simulate negli animali al fine di identificare il meccanismo di azione della gelatina reale. Grazie a tale tipo di ricerche, è attualmente noto che nei conigli la gelatina reale riduce il livello di colesterolo e di trigliceridi nel plasma nonché il colesterolo depositatosi nelle arterie<sup>38,39</sup>.

---

<sup>33</sup> Khattab M.M., Radwan A.A., Afifi, E.A., In Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates. Cairo, Egypt, 6-10 November 1988. IBRA, London, U.K. (1989)

<sup>34</sup> Csuka, J., Baumgartner J., and Dubay J., *Zivocisna Vyroba*, 23 (5) 395-400 (1978)

<sup>35</sup> Bonomi A., *Apitalia*, 10 (15), 7-13 (1983)

<sup>36</sup> Chauvin R., *Traite' de biologie de l'abeille*. Paris, France, Masson et Cie, Tome III, 116-1154 (1968)

<sup>37</sup> Radu-Tudorache G., Oita N., Luca A., Hritcu V., *Cercetari Agronomice in Moldova*, 2, 131-133 (1978)

<sup>38</sup> Cho Y.T., *Amer. Bee J.*, 117, 36-38 (1977)

<sup>39</sup> Carli H.O., De Cornejo L.G., Maljar L., *Ministerio de Asuntos Agrarios*, Buenos Aires, Argentina, 63 pp. (1975)

Vittek e Halmos stabilirono che l'assunzione orale accelera il processo di guarigione nel decorso di patologie ossee nei conigli<sup>40</sup> mentre Fuji, nel 1990, osservò nei ratti un'accelerazione della risposta anti-infiammatoria<sup>41</sup>. Altri ricercatori hanno testato la gelatina reale e alcuni dei suoi componenti su cellule tumorali, rilevando l'azione inibitoria esercitata dell'acido 10-idrossidecanoico<sup>42</sup> e di alcuni acidi dicarbossilici. Recentemente, Tamura ha riportato l'azione di inibizione di crescita di tumori nei ratti in seguito a somministrazione orale di gelatina reale<sup>43</sup>. Tale inibizione è stata considerata non significativa per tumori a rapida crescita (leucemia) ma rilevante per tumori a crescita più lenta.

### 5.3.2 Studi clinici sull'uomo

Sono state eseguite numerose ricerche sugli effetti della gelatina reale sulla salute umana, in particolari nei Paesi dell'est europeo. Ad ogni modo, molti di questi studi sono di difficile interpretazione poiché spesso vengono omessi i dettagli dei metodi utilizzati e vengono presi in considerazione, per la definizione dei presunti effetti della gelatina reale, parametri difficilmente oggettivabili (ad es., benessere generale, euforia, ringiovanimento). Inoltre non è possibile escludere a priori eventuali effetti dovuti a trattamenti concomitanti o, ancora, lo studio viene condotto su un numero di pazienti troppo piccolo. Le informazioni che vengono riportate in questo paragrafo devono essere quindi considerate come indicazioni di possibili effetti della gelatina reale sulla salute umana che però richiedono ulteriori approfondimenti clinici.

---

<sup>40</sup> Vittek J., Halmos J., *Csika Stomat.* 68 (3), 207-216 (1968)

<sup>41</sup> Fujii A., Kobayashi S., Ishihama S. Yamamoto H., Tamura T., *Japan J. Pharmacol.*, 53 (3), 331-337 (1990)

<sup>42</sup> Townsend G.F., *Cancer Res.*, 20(5)-3-510 (1960)

<sup>43</sup> Tamura T., Fujii A., Kubiyama N., *Yakurigaku-Zasshi*, 89 (2), 73-80 (1987)

La somministrazione orale effettuata su bambini prematuri ha determinato un miglioramento delle condizioni generali, aumento di peso ed appetito, incremento nel numero di globuli rossi ed emoglobina<sup>44,45,46,47</sup>. Si sono inoltre riscontrati effetti positivi in casi di anoressia, depressione ed ipotensione arteriosa<sup>48</sup>. Anche in presenza di patologie di natura psichiatrica sono stati riscontrati effetti positivi in seguito al trattamento con gelatina reale. In particolare, si sono avuti ottimi riscontri nei casi di astenia, crollo nervoso, problemi emozionali ed effetti collaterali da farmaci psicoattivi<sup>49</sup>. Da sottolineare anche gli effetti stimolanti sul metabolismo, paragonabili a quelli promossi dalle proteine. Si presume che tali effetti siano ascrivibili all'azione di particolari complessi enzimatici<sup>50</sup>.

I meccanismi d'azione della gelatina reale sull'uomo non sono stati ancora chiariti e nessuna delle ipotesi proposte è stata ancora confermata. L'alto contenuto di vitamine come fattore determinante per i benefici osservati è stato subito scartato in quanto gli stessi effetti si dovrebbero osservare anche per altri alimenti ad elevato contenuto vitaminico o – in misura ancora maggiore - per i supplementi vitaminici.

---

<sup>44</sup> Malossi C., Grandi F., Atti del 10 convegno nazionale per lo studio dell'applicazione dei prodotti delle api nel campo medico-biologico, Bologna, Italia, 130-133.(1956)

<sup>45</sup> Prosperi P., Ragazzini F., Riv. Clin. Pediat., 58 (3), 319-332 (1956)

<sup>46</sup> Prosperi P., Ragazzini F., Francalancia L., Atti del 10 convegno nazionale per lo studio dell'applicazione dei prodotti delle api nel campo medicobiologico, Bologna, Italia 134-136 (1956)

<sup>47</sup> Quadri S., Clin. Pediat., Modena 38 (9), 686-690 (1956)

<sup>48</sup> Destrem H., Rev. Franc. Geront, 3 (1956)

<sup>49</sup> Telatin L., Atti del 10 convegno nazionale per lo studio dell'applicazione dei prodotti delle api nel campo medicobiologico, Bologna, Italia (156), 211-214 (1956)

<sup>50</sup> Martinetti R., Caracristi C., Atti del 10 convegno nazionale per lo studio dell'applicazione dei prodotti delle api nel campo-medico-biologico, Bologna, Italia, 139-144 (1956)

## CAPITOLO 6

# DETERMINAZIONE RP-HPLC DEGLI AMMINOACIDI LIBERI NEL MIELE DI CORBEZZOLO

### 6.1 STATO DELL'ARTE ED OBIETTIVI

Gli amminoacidi liberi rappresentano una frazione minoritaria ma comunque importante della composizione chimica del miele. La loro origine si deve alle api, al nettare e – soprattutto - al polline, che ne è la fonte principale. Per tale ragione la distribuzione degli amminoacidi liberi nei diversi tipi di miele è stata utilizzata in passato per la determinazione dell'origine botanica e geografica<sup>51</sup>. In particolare gli amminoacidi arginina, triptofano e cistina sono risultati essere caratteristici per alcune origini floreali<sup>52</sup>, mentre il primo esempio di discriminazione geografica dei mieli è stato riportato da Gilbert nel 1981<sup>53</sup>. Inoltre, anche i rapporti enantiomerici degli amminoacidi si sono dimostrati un utile strumento per l'individuazione della zona di produzione<sup>54</sup>.

La definizione quali-quantitativa del profilo amminoacidico del miele è stata eseguita inizialmente per via gascromatografica<sup>2,3,55,56,57</sup> e, in seguito e con risultati migliori, attraverso la cromatografia liquida<sup>4,58,59,60,61,62,63,64</sup>.

---

<sup>51</sup> Anklam E., Food Chem 63, 549-562 (1998)

<sup>52</sup> Pirini A., Conte L.S., Francioso O., Lercker G., J. High Res. Chromatogr. 15, 165-170 (1992)

<sup>53</sup> Gilbert J., Shephard M.J., Wallwork M.A., Harris R.G., J. Apic. Res. 20, 125-135 (1981)

<sup>54</sup> Pawloska M., Armstrong D.W., Chirality 6, 270-276 (1994)

<sup>55</sup> Bouseta A., Scheirman V., Collin S., J. Food Sci. 61, 683-694

<sup>56</sup> Conte L.S., Miorini M., Giomo A., Bertacco G., Zironi R., J. Agric Food Chem 46, 1884-1849 (1998)

Negli articoli appena citati, poca attenzione è stata riservata ad aspetti eminentemente analitici quali ad esempio la validazione dei metodi analitici proposti. Un approccio promettente dal punto di vista della determinazione degli amminoacidi nel miele è stato proposto da Nozal<sup>65</sup>; purtroppo, il protocollo proposto richiede strumentazione non comunemente disponibile in tutti i laboratori (un sistema HPLC-MS).

In tutti i metodi indicati, lo step chiave è rappresentato dalla derivatizzazione degli analiti. Lo stato dell'arte relativo ai metodi di derivatizzazione è stato riassunto da Gonzalez in una recente pubblicazione<sup>13</sup>. Dall'esame delle metodiche sino ad ora pubblicate emerge che non esiste ancora una tecnica di derivatizzazione ottimale, ma i risultati migliori si ottengono attraverso reazione precolonna con fenilisotiocianato (PITC)<sup>66,67,68</sup>. Il PITC reagisce con i gruppi amminici primari e secondari dando derivati stabili e rivelabili all'UV; inoltre, l'eccesso di derivatizzante non interferisce in alcun modo in sede di analisi.

---

<sup>57</sup> Patzold R., Bruckner H., *Eur. Food Res. Technol.* 223, 347-354 (2006)

<sup>58</sup> Perez Arquille C., Herrera Marteache A., *Alimentaria* 24, 67-71 (1987)

<sup>59</sup> Cometto P.M., Faye P.F., Di Paola Naranjo R., Rubio M.A., Aldao M.A.J., *J. Agric. Food Chem.* 51, 5079-5087

<sup>60</sup> Hermosin I., Chicòn R.M., Cabezudo M.D., *Food Chem* 83 263-268 (2003)

<sup>61</sup> Iglesias M.T., de Lorenzo C., Polo M.C., Martín-Alvarez P.J., Pueyo E., *J. Agric. Food Chem* 52, 84-89 (2004)

<sup>62</sup> Cotte J.F., Casabianca H., Giroud B., Albert M., Lheritier J., Grenier-Loustalot M.F., *An. Bioanal. Chem.* 378, 1342-1350 (2004)

<sup>63</sup> Gonzalez A.M., Gomez J.A., Cordon C., Garcia-Villanova R.J., Sanchez J., *Food Chem* 95, 148-156 (2006)

<sup>64</sup> Pereira V., Pontes M., Camara J.S., Marques J.C., *J. Chromatogr A* 1189, 435-443 (2008)

<sup>65</sup> Nozal M.J., Bernal J.L., Toribio M.L., Diego J.C., Ruiz A., *J Chromatogr A* 1047, 137-146 (2004)

<sup>66</sup> Henrikson R.L., Meredith S.C., *Anal. Biochem* 136, 65-69 (1984)

<sup>67</sup> Alonso M., Alvarea A.I., Zapico J., *J. Liq. Chromatogr* 17, 4019-4030 (1994)

<sup>68</sup> Guitart A., Hernandez-orte P., Cacho J., *Quim Anal* 15, 217-223 (1996)

Le condizioni di derivatizzazione sono state a lungo studiate sia in termini di composizione del tampone<sup>69,70</sup> che di tempo di reazione<sup>71,72</sup>.

Il miele di corbezzolo rappresenta uno dei prodotti più importanti dell'apicoltura della Sardegna. Esso è rinomato, sia in Italia che all'estero, per il suo caratteristico sapore amaro. Nonostante la sua importanza e le sue peculiari caratteristiche, sono stati condotti pochi studi sulle sue proprietà. Gli approfondimenti sino ad ora svolti, hanno riguardato il profilo degli acidi organici<sup>73</sup>, il contenuto totale di polifenoli<sup>74</sup>, le caratteristiche chimico-fisiche e melissopalinologiche<sup>75</sup>. L'acido omogentisico è stato indicato come marker per questa origine botanica<sup>76</sup> e per la sua determinazione, è stata proposta una metodica RP-HPLC successivamente ottimizzata dal nostro gruppo di ricerca<sup>77</sup>. Recentemente, si è scoperto che l'acido omogentisico produce un'interferenza nella determinazione cromatografica dell'HMF, secondo la metodica HPLC proposta dalla International Honey Commission. Per tale ragione, è stato messo a punto e validato un nuovo metodo analitico che ovviasse a questo problema<sup>78</sup>.

---

<sup>69</sup> Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L., J Chromatogr 336, 93-104 (1984)

<sup>70</sup> Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L., Frost B., J. AOAC Int. 70, 241-247 (1987)

<sup>71</sup> Hagen S.R., Frost B., Augustin J., J. AOAC Int 72, 912-916 (1989)

<sup>72</sup> Fierabracci V., Masiello P., Novelli M., Bergamini E., J. Chromatogr 570, 285-291 (1991)

<sup>73</sup> Cherchi A., Spanedda L., Tuberoso C., Cabras P., J. Chromatogr A 669, 59-64 (1994)

<sup>74</sup> Floris I., Vacca V., Franco M.A., Del Caro A., Marras P.M., Reniero F., Apicoltura 9, 119-133 (1994)

<sup>75</sup> Persano Oddo L., Piazza M.G., Sabatini A.G., Accorti M., Apidologie 26, 453-465 (1995)

<sup>76</sup> Cabras P., Angioni A., Tuberoso C., Floris I. Reniero F., Guillou C., Ghelli S., J. Agric Food Chem 47, 4064-4067 (1999)

<sup>77</sup> Scanu R., Spano N., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Sanna G., Tappararo A., J Chromatogr A 1090, 76-80, 2005

<sup>78</sup> Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Tappararo A., Sanna G., Talanta 68, 1390-1395 (2006)

L'obiettivo del presente lavoro consiste nella definizione del profilo quali-quantitativo degli amminoacidi liberi nel miele di corbezzolo. A tale scopo, è stato sviluppato e validato un metodo RP-HPLC con derivatizzazione precolonna degli analiti tramite PITC. Lo studio ha visto l'impiego di 16 campioni di miele di corbezzolo, provenienti da diverse regioni dell'Italia e della Francia<sup>79</sup>.

## **6.2 SEZIONE SPERIMENTALE**

### **6.2.1 Campioni**

I sedici campioni oggetto di studio sono stati raccolti nel biennio 2005-2006. Quattordici di essi sono di origine italiana: nove provengono dalla Sardegna (S1-S9), tre dalla Toscana (T1-T3), uno da Piemonte (P) e Umbria (U), rispettivamente. Gli altri due sono stati acquistati in Corsica (C1-C2). Tutti i campioni sono stati conservati ad una temperatura di 4°C immediatamente dopo l'acquisto. Prima di ogni determinazione analitica essi sono stati omogeneizzati mediante mixer.

### **6.2.2 Estrazione**

L'estrazione degli amminoacidi liberi dai campioni di miele di corbezzolo è stata eseguita in accordo con il metodo descritto da Adams<sup>80</sup>. Sono stati pesati accuratamente 20 g di miele ai quali sono stati addizionati 4 mg di norleucina, scelta come standard interno. Essi sono stati disciolti in 50 mL di HCl 0.01 M e si è portato il pH al valore di 2.1 mediante

---

<sup>79</sup> Spano N., Piras I., Ciulu M., Floris I., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Sanna G., J. AOAC Int 92 1145-1156 (2008)

<sup>80</sup> Adams R.F., J. Chromatogr 95, 189-212 (1974)

aggiunte di NaOH 0.1 M.

Per l'eliminazione degli zuccheri, è stata impiegata una colonna costituita da resina di Amberlite IR-120, la cui preparazione ha previsto:

- l'attivazione della resina mediante trattamento con HCl 2M per due ore;
- la sospensione in una soluzione tampone citrato/fosfato (pH = 2.1);
- l'introduzione della sospensione in una colonna di vetro (diametro 10 mm, lunghezza 170 mm);
- il lavaggio della resina mediante soluzione tampone.

La soluzione del campione è stata introdotta nella colonna di estrazione, in seguito a filtrazione su carta. Sono stati eseguiti ripetuti lavaggi con HCl 2M sino a saggio di Fehling negativo. Gli amminoacidi sono stati quindi eluiti in 25 mL di NH<sub>3</sub> 2M e l'estratto è stato conservato a -20 °C.

### **6.2.3 Derivatizzazione**

La procedura di derivatizzazione è stata eseguita in accordo con il lavoro di Alonso<sup>17</sup>. Sono stati prelevati 300 µL di estratto ammoniacale e sono stati portati a secco ad una temperatura non superiore a 38 °C. Il campione è stato poi solubilizzato in 18 µL di una miscela EtOH:TEA:H<sub>2</sub>O (7:1:1, v/v/v) e posto a reagire con 2 µL di PITC per 10 min.

### **6.2.4 Analisi RP-HPLC**

La soluzione è stata evaporata a secchezza e il residuo è stato disciolto in 200 µL di eluente A. Esso consiste in una miscela 10/90 (v/v) di (1) acetonitrile e (2) una soluzione acquosa 0.23 M in acetato di sodio, 6.5 x 10<sup>-3</sup> M in TEA portata a pH 6.4 per aggiunta di acido acetico (eluente A).

Come componenti della fase mobile sono stati adottati l'eluente A e una miscela 40:60 (v/v) di acqua e acetonitrile (eluente B). Tutti i solventi sono stati preventivamente filtrati per mezzo di membrane con pori del diametro di 0.45  $\mu\text{m}$  per rimuovere qualsiasi impurità. Gli amminoacidi presi in considerazione per lo studio sono: acido aspartico (Asp), acido glutammico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), glutammina (Gln), glicina (Gly), istidina (His), alanina (Ala), arginina (Arg), cisteina (Cys), valina (Val), metionina (Met), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), norleucina (Nor), lisina (Lys), tirosina (Tyr), prolina (Pro), triptofano (Trp) e ornitina (Orn). Le condizioni cromatografiche del metodo messo a punto sono riportate in Tabella 6.1.

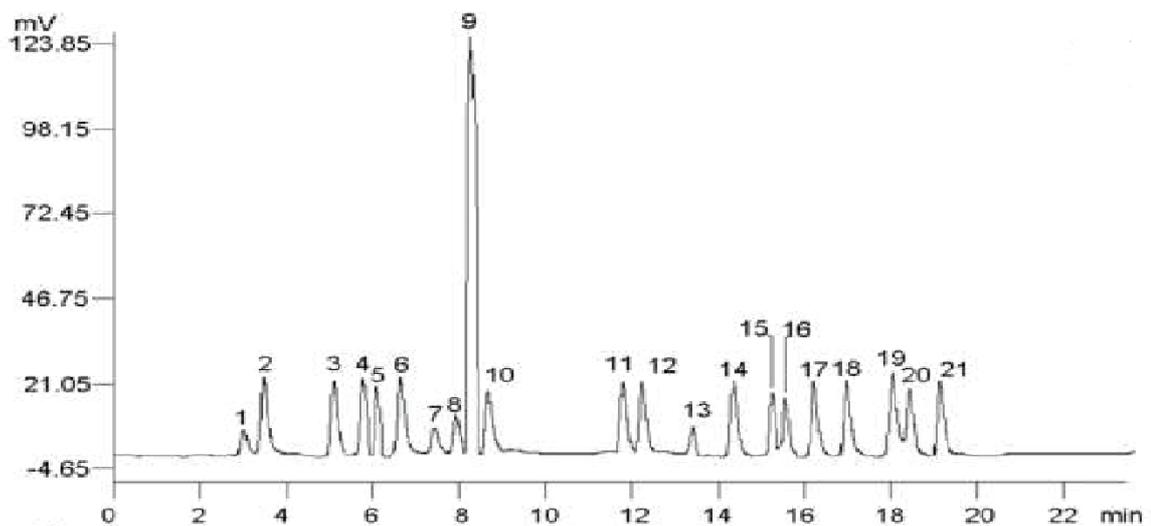
**Tab. 6.1** Condizioni cromatografiche messe a punto per la determinazione del profilo degli amminoacidi liberi

<b>RP-HPLC</b>	
<b>Strumento</b>	Perkin Elmer Series 200 Pump
<b>Loop di Campionamento</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Colonna C<sub>18</sub></b>	Alltima C <sub>18</sub> 5 $\mu\text{m}$ (4.6 mm x 20 mm)
<b>Precolonna</b>	Alltima C <sub>18</sub> (4.6 mm x 20 mm)
<b>Rivelatore UV-Vis</b>	Perkin-Elmer Series 200 UV-Vis $\lambda = 254 \text{ nm}$
<b>Eluenti</b>	A = 760 mL di (19g CH <sub>3</sub> COONa in 1 l di H <sub>2</sub> O + 500 $\mu\text{L}$ di TEA, pH=6.4 per aggiunta di CH <sub>3</sub> COOH)+ 60 mL di CH <sub>3</sub> CN B = CH <sub>3</sub> CN in H <sub>2</sub> O al 60%
<b>Sistema di eluizione in gradiente</b>	A/B = 84/16 per 13 min A/B = 54/46 in 5 min A/B = 0/100 in 2 min A/B = 100/0 in 2.5 min A/B = 84/16 in 1 min
<b>Durata totale</b>	23.5 min
<b>Flusso</b>	1 mL min <sup>-1</sup>

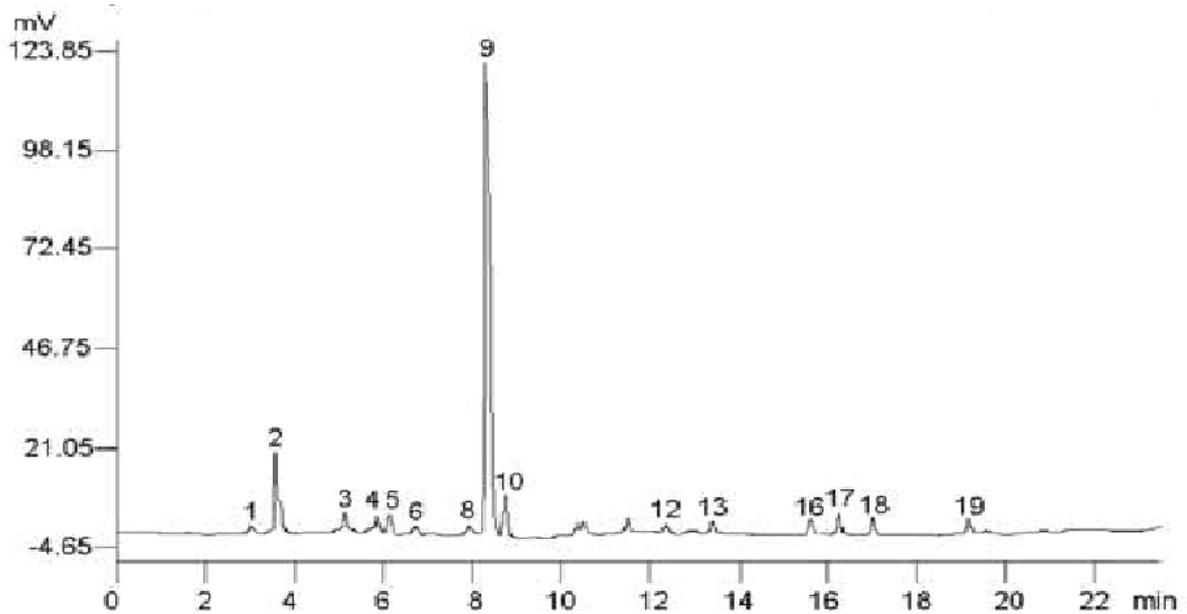
## 6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 6.3.1 Separazione cromatografica

L'ottimizzazione delle condizioni sperimentali ci ha permesso di mettere a punto un metodo RP-HPLC rapido che consente una soddisfacente separazione di 21 diversi amminoacidi. La figura 6.1 mostra il cromatogramma di una miscela dei 21 standard derivatizzati, mentre in figura 6.2 è riportato il cromatogramma relativo ad un campione di miele di corbezzolo.



**Figura 6.1** Cromatogramma di una miscela equimolare dei 21 standard derivatizzati



**Figura 6.2** Cromatogramma di un campione di miele di corbezzolo

**Identificazione dei picchi:** 1, Asp; 2, Glu; 3, Asn; 4, Gln; 5, Ser; 6:Gly; 7, His; 8, Arg; 9, Pro; 10, Ala; 11, Tyr; 12, Val; 13, Met; 14, Cys; 15, Ile; 16, Leu; 17, Nor; 18, Phe; 19, Trp; 20, Orn; 21, Lys.

L'eluizione completa degli analiti avviene in meno di 20 min, con una durata della corsa inferiore del 20% rispetto a quanto riportato da Cometto<sup>9</sup> per la separazione di 15 amminoacidi derivatizzati con PITC. La rapidità della separazione non incide in maniera negativa sulla risoluzione: solo due coppie di picchi (Ile-Leu, Trp-Orn), risultano essere non completamente risolte a livello della linea di base.

### 6.3.2 Amminoacidi liberi nel miele di corbezzolo

Il metodo utilizzato per la determinazione degli amminoacidi nei campioni di miele è quello della curva di calibrazione mediante standard interno. In Tabella 6.2 è riportata la concentrazione degli amminoacidi liberi nei campioni di miele di corbezzolo sottoposti ad

indagine, mentre in figura 6.4 è riportata una rappresentazione grafica della composizione percentuale media degli amminoacidi nel miele di corbezzolo.

L'amminoacido più abbondante è risultato essere la Prolina (75-538.0 mg/kg). Il contenuto medio da noi determinato (280 mg/kg), è inferiore rispetto a quelli medi indicati nei lavori di White<sup>81</sup> (483 mg/kg) e Cotte<sup>12</sup> (415 mg/kg), relativi ad un gran numero di mieli di diversa origine. La concentrazione media di prolina nei campioni analizzati, è anche nettamente inferiore a quanto rilevato da Nozal<sup>15</sup> per il miele di erica (467 mg/kg), facente parte, come quello di corbezzolo, della famiglia delle *Ericaceae*.

Hanno presentato concentrazioni decisamente inferiori, ma comunque significative, l'acido glutammico (1.1-84.0 mg/kg; contenuto medio, 28.2 mg/kg), l'arginina (8-39.8 mg/kg; contenuto medio, 22.6 mg/kg), la fenilalanina (6.8-56 mg/kg; contenuto medio, 21.6 mg/kg), e l'alanina (9.0-38 mg/kg; contenuto medio, 22.5 mg/kg). Le concentrazioni medie di Glu, Phe e Ala rientrano all'interno dell'intervallo previsto dai dati sino ad ora pubblicati<sup>6,10,12,15</sup> per mieli di diversa origine botanica, mentre la concentrazione di Arg nei mieli di corbezzolo appare più elevata rispetto a quella delle altre origini floreali, con l'eccezione del miele di timo<sup>10</sup>.

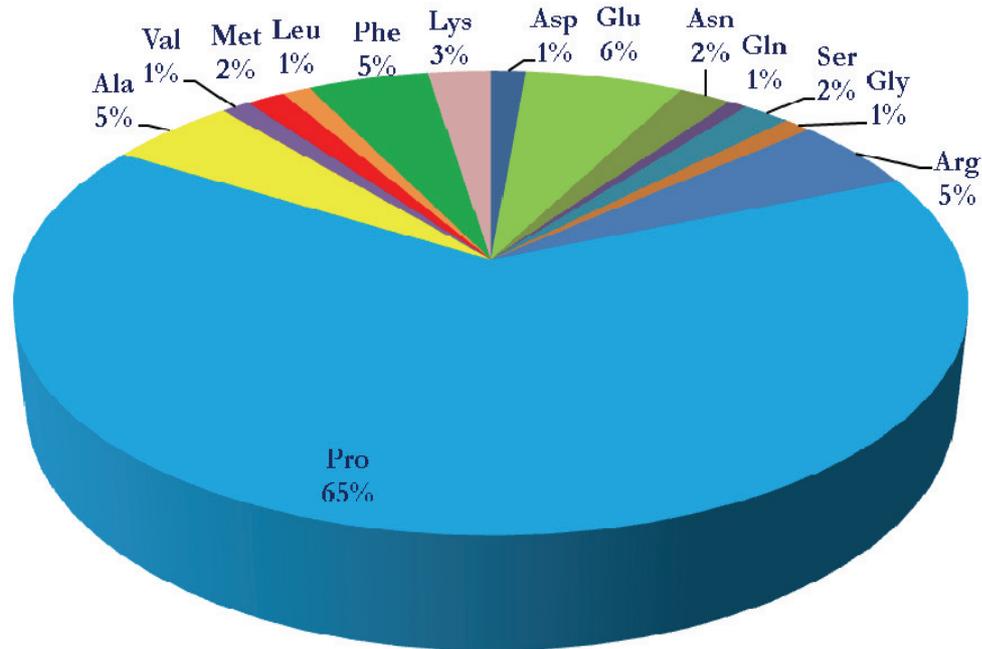
Anche gli amminoacidi Val, Met e Leu sono stati quantificati in tutti i campioni con concentrazioni comprese fra 1 e 10 mg/kg. Altri cinque amminoacidi (Glu, Ser, Gly, Asp e Asn) sono risultati essere costantemente presenti, sebbene in alcuni casi in concentrazioni inferiori al limite di quantificazione. Sono state rinvenute tracce di Ile solo nei campioni C2, T2, S2 e S3. Infine, His, Cys, Tyr, Orn e Trp sono risultati assenti in tutti i campioni.

---

<sup>81</sup> White J.W. Jr., Rudyj O.N., J. Apic. Res. 17, 89-93 (1978)

**Tabella 6.2** Concentrazione degli amminoacidi liberi nei campioni di miele di corbezzolo (mg/kg)

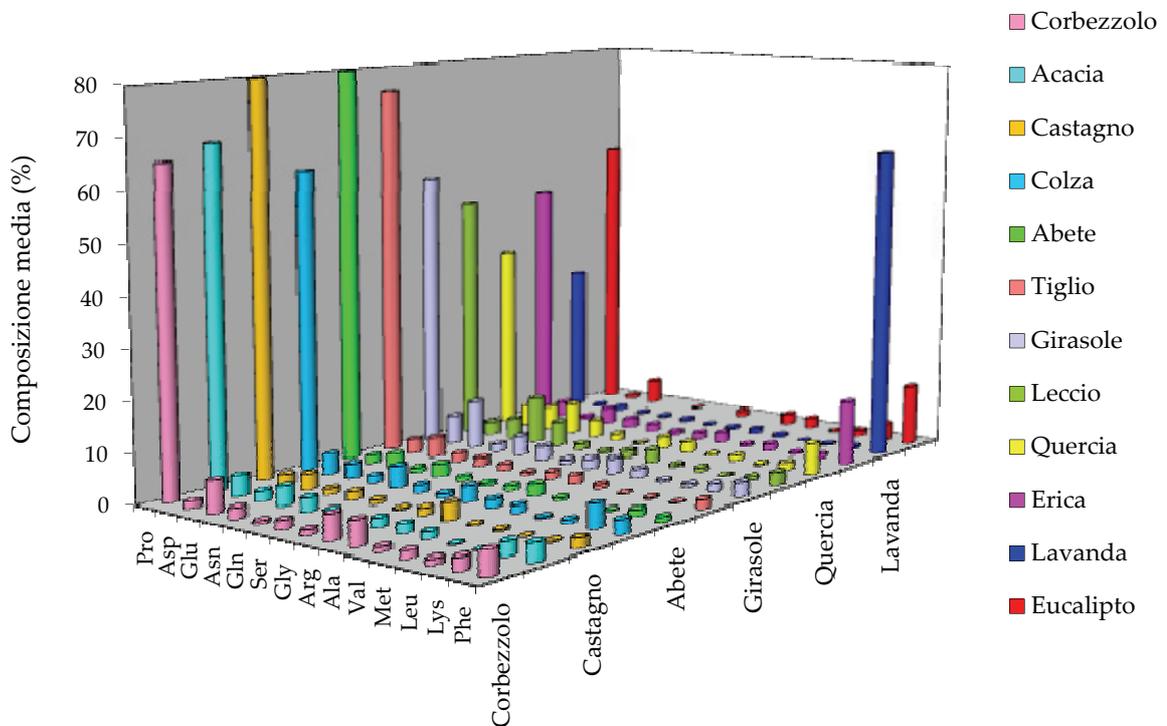
AA	Mieli																Composizione	
	C1	C2	T1	T2	T3	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	U	P	Media	%
Asp	<0.06	6.2±0.4	8.2±0.8	<0.06	2.9±0.4	<0.06	<0.06	<0.06	3.6±0.8	3.8±0.2	1.2±0.6	0.6±1	2.6±0.3	0.98±0.02	11.6±0.4	22±2	6.3±6.4	1.45
Glu	11±1	67.9±0.9	60.6±0.1	28±1	22±2	53±2	17.3±0.1	8.6±0.2	23.1±0.5	2.8±0.3	1.1±0.7	1.8±0.3	13±2	20±3	84±4	36.6±0.8	28±25	6.49
Asn	<0.6	10±1	16±1	2.4±0.3	8.7±0.2	19±2	5.0±0.1	<0.6	<0.6	<0.6	5.2±0.8	<0.6	4.3±0.3	5±1	16±1	12±1	9.4±5.6	2.17
Gln	1.3±0.5	3.6±0.2	1.4±0.3	1.2±0.3	2.0±0.3	10.2±0.4	2.00±0.05	1.4±0.3	4.8±0.7	3.3±0.4	0.9±0.2	<0.3	2.3±0.3	1.3±0.7	11±1	4.4±0.1	3.4±3.2	0.78
Ser	7.9±0.4	7.9±0.7	11±1.0	7.5±0.3	<0.3	20±2	8.2±0.3	1.7±0.4	1.40±0.03	6.4±0.5	5.2±0.5	4.3±0.8	3±1	5±1	16±1	20±2	8.4±6.0	1.93
Gly	4.7±0.4	5.0±0.4	<0.2 <sup>b</sup>	0.6±0.3	20.0±0.1	6.8±0.6	2.1±0.2	1.0±0.2	1.62±0.08	2.60±0.02	0.90±0.03	3.3±0.6	8±1	5.4±0.9	5.8±0.7	6.0±0.1	4.9±4.8	1.13
His	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	0.00
Arg	19.4±0.2	14.2±0.5	12.8±0.5	18±2	39±4	27±3	14.9±0.6	18.1±0.1	31±1	8±1	43±2	39.8±0.2	33±2	16±3	10.6±0.3	17±1	23±11	5.21
Pro	250±4	360±5	416±9	205±6	227.3±0.7	414±2	438±1	156.5±0.7	73±6	94±2	84±2	102±1	412±2	320±14	470±20	538.0±0.7	280±160	65.63
Ala	10.6±0.4	19.2±0.2	18±2	10.0±0.6	11.0±0.6	22±1	14.0±0.1	9.0±0.6	25.08±0.04	38±4	33.4±0.2	24.94±0.08	28±2	30.4±0.5	35±2	30.9±0.6	22±10	5.17
Tyr	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.00
Val	3.2±0.1	4.1±0.4	4.2±0.2	13.0±0.6	6.8±0.2	8.7±0.5	4.7±0.1	3.1±0.1	1.27±0.09	2.6±0.5	1.2±0.5	0.9±0.3	1.03±0.06	1.7±0.3	10.7±0.6	16.2±0.1	5.2±4.6	1.20
Met	4.7±0.3	1.7±0.1	8.7±0.1	6.3±0.2	25±2	7.7±0.4	4.5±0.2	0.60±0.05	1.8±0.3	1.26±0.05	2.8±0.2	0.94±0.06	1.53±0.03	1.9±0.3	14±1	25±2	6.8±8.0	1.56
Cys	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.00
Ile	<0.02	<0.06	<0.02	<0.06	<0.02	<0.02	<0.06	<0.06	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.06	0.00
Leu	2.5±0.3	3.4±0.5	4.6±0.9	6.8±0.3	3.9±0.4	4.4±0.3	1.9±0.1	1.5±0.1	3.1±0.2	8.3±0.2	8.0±0.9	8.0±0.9	5.4±0.1	4.3±0.4	9.5±0.3	5.2±0.4	5.1±2.4	1.16
Phe	13.4±0.4	28.6±0.2	13.6±0.2	27.6±0.6	15±2	21.5±0.2	15.4±0.1	6.8±0.8	10.2±0.5	16.1±0.8	31±1	26±1	20±2	17.3±0.9	56±1	26.8±0.5	22±12	4.97
Trp	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.02	<0.05	<0.05	0.00
Orn	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.00
Lys	10.4±0.3	6±1	4.7±0.2	8±1	8.5±0.1	8.4±0.4	6.7±0.1	16±1	15.5±0.4	33±1	20±4	8±1	7±1	20±3	6.4±0.2	2.3±0.1	11.3±7.8	2.60
Tot	339±4	538±5	580±9	334±7	392±5	623±5	535±1	224±2	195±6	220±5	238±6	220±2	541±5	449±15	757±21	762±4	436±192	100.00



**Figura 6.3** Composizione percentuale media degli amminoacidi liberi nei mieli di corbezzolo

Paragonando i dati relativi al contenuto totale di amminoacidi del miele di corbezzolo con i valori riportati da altri autori sulla base di un pool molto ampio di campioni di diversa origine floreale<sup>2,6,10,12,15</sup>, emerge che la concentrazione di amminoacidi riscontrata nei nostri campioni appare sostanzialmente bassa. I dati sperimentali relativi al contenuto totale di amminoacidi variano infatti, da 194.9 mg/kg (campione S4) a 759.3 mg/kg (campione U), con una concentrazione media di 436 mg/kg. Il contenuto medio di amminoacidi liberi totali riportato in altri lavori varia da 286.1 per il rododendro<sup>2</sup> a 1831.6 mg/kg per la lavanda<sup>12</sup>. Solo tre tipi di miele mostrano un contenuto medio di amminoacidi inferiore a quello di corbezzolo: acacia<sup>12</sup> (400.2 mg/kg), colza<sup>12</sup> (342 mg/kg) e rododendro<sup>2</sup>. Nel lavoro di Pirini<sup>2</sup> viene attribuito al miele di acacia un contenuto medio di 561.2 mg/kg, ma va sottolineato che il dato è riferito ad un unico miele uniflorale. E'

possibile supporre che l'esigua concentrazione di amminoacidi nel miele di corbezzolo sia ascrivibile al contributo ridotto da parte della pianta. E' infatti noto che il polline del corbezzolo è pesantemente iporappresentato, a causa della peculiare forma a otre rovesciata del fiore, che impedisce la presenza di significative quantità del polline in questo tipo di miele<sup>26</sup>. In figura 6.4 riportiamo una rappresentazione grafica che illustra il profilo degli amminoacidi liberi in diversi mieli uniflorali.



**Figura 6.4** Profilo degli AA liberi in mieli di diversa origine botanica

Se si prende in considerazione il miele di erica, facente parte, come quello di corbezzolo, della famiglia delle *Ericaceae*, emerge che il suo contenuto totale (1609 mg/kg)<sup>15</sup> di amminoacidi liberi è quasi quattro volte maggiore rispetto a quello del miele da noi preso in esame. Con la sola eccezione della Met, la concentrazione media di ciascun

amminoacido è decisamente maggiore nel miele di erica rispetto a quello di corbezzolo. Per contro l'Arg, mai rintracciata nel miele di erica, è uno degli amminoacidi più abbondanti del miele di corbezzolo.

## 6.4 VALIDAZIONE

### 6.4.1 Limite di rivelabilità (LoD) e di quantificazione (LoQ)

Questi parametri sono stati calcolati in accordo con il metodo ULA1 (Upper Limit Approach)<sup>82</sup> approvato dalla IUPAC. Per ciascun analita sono state preparate, derivatizzate e analizzate soluzioni a concentrazioni vicine al limite di rivelabilità atteso. Ciascuna misura è stata ripetuta 3 volte. Nella Tabella 6.3 sono riportati i valori di LoD e LoQ ottenuti per ciascun amminoacido. I limiti di rivelabilità e quantificazione calcolati variano rispettivamente negli intervalli 0.02-0.06 mg/l e 0.4-0.12 mg/l. I dati ottenuti nel nostro studio sono confrontabili con quelli pubblicati da Nozal e i suoi collaboratori<sup>15</sup>.

### 6.4.2 Precisione

La precisione del metodo proposto è stata valutata sia in termini di ripetibilità che di riproducibilità.

La ripetibilità è stata determinata attraverso 5 repliche consecutive dell'analisi dei campioni P e S3, ed espressa in termini del coefficiente di variazione percentuale  $CV\%_{\text{exp,r}}$ . I dati relativi alla ripetibilità sono riportati in Tabella 6.4.

---

<sup>82</sup> Mocak J., Bond A.M., Mitchell S., Schollary G., Pure & Appl Chem 69, 297-328, IUPAC recommendation, document 550/35/87

La ripetibilità media varia fra 1.1 (Pro) e 8.0% (Gly). Il range di concentrazione dei diversi analiti gioca ovviamente un ruolo importante nelle performances di ripetibilità. Alti livelli

**Tabella 6.3** LoD e LoQ

AA	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)
Asp	0.02	0.06
Glu	0.1	0.3
Asn	0.2	0.6
Gln	0.1	0.3
Ser	0.1	0.3
Gly	0.05	0.15
His	0.02	0.06
Arg	0.4	1.2
Pro	0.05	0.15
Ala	0.4	1.2
Tyr	0.1	0.3
Val	0.1	0.3
Met	0.1	0.3
Cys	0.1	0.3
Ile	0.02	0.06
Leu	0.02	0.06
Phe	0.1	0.3
Trp	0.05	0.15
Orn	0.05	0.15
Lys	0.4	1.2

di concentrazione sono in genere caratterizzati da bassi valori di CV%. E' stata valutata l'accettabilità dei risultati relativi alla ripetibilità utilizzando il modello proposto da

Horwitz<sup>83</sup>. Secondo tale modello, è possibile calcolare un CV% teorico sulla base del livello di concentrazione atteso. Se il rapporto fra il CV% sperimentale e quello teorico è inferiore a 1.5, i dati sperimentali sono da considerarsi accettabili. Come mostrato nella Tabella 6.4, i valori dei CV%<sub>exp,r</sub> sono sempre al di sotto del limite superiore previsto dalla teoria di Horwitz.

La riproducibilità è stata invece stimata attraverso cinque diverse analisi, condotte sul campione U in sessioni analitiche diverse nell'arco di un mese. Come per la ripetibilità, sono stati calcolati i coefficienti di variazione percentuali CV%<sub>exp,R</sub> (Tabella 6.4), ed è stata valutata l'accettabilità delle performances di riproducibilità attraverso il modello di Horwitz. Dai dati ottenuti emerge che anche per quanto riguarda la riproducibilità i dati sono da considerarsi accettabili.

---

<sup>83</sup> Horwitz W., Anal Chem 54, 67A-76A (1982)

**Tabella 6.4** Ripetibilità e riproducibilità

AA	RIPETIBILITA'					RIPRODUCIBILITA'	
	Campione P CV% <sub>exp,r</sub>	Campione P CV% <sub>0H,r</sub>	Campione S3 CV% <sub>exp,r</sub>	Campione S3 CV% <sub>0H,r</sub>	Media CV% <sub>exp,r</sub>	Campione U CV% <sub>exp,R</sub>	Campione U CV% <sub>0H,R</sub>
Asp	2.3	10.0	-	-	2.3	3.4	16.6
Glu	1.6	9.2	3.0	11.5	2.3	4.3	12.3
Asn	3.9	10.9	-	-	3.9	6.1	15.8
Gln	5.2	12.7	9.1	15.1	7.1	11.3	16.8
Ser	1.2	10.1	6.0	14.6	3.6	7.3	15.8
Gly	6.9	12.1	9.1	15.8	8.0	12.1	18.4
Arg	1.4	10.4	1.6	10.2	1.5	2.8	16.8
Pro	0.7	6.1	1.5	7.4	1.1	3.6	9.5
Ala	1.5	9.5	4.1	11.4	2.8	5.4	14.1
Val	2.1	10.4	4.3	13.4	3.2	5.6	16.8
Met	0.8	10.8	6.8	17.1	3.8	7.6	16.1
Leu	1.0	12.4	2.6	14.9	1.8	3.2	17.1
Phe	0.8	9.7	2.2	11.9	1.5	2.2	13.1
Lys	3.4	14.0	0.7	10.4	2.1	3.1	18.1

### 6.4.3 Range dinamico lineare

Questo parametro è stato determinato per ciascuno degli amminoacidi quantificati. Si sono osservati, come mostrato dalla Tabella 6.5, ottimi coefficienti di correlazione lineare in tutti i casi.

**Tabella 6.5** Linearità

AA	Range dinamico lineare (mg/ L)	R <sup>2</sup>
Asp	0.2 ÷ 50.0	0.9992
Glu	1.0 ÷ 100.0	0.9980
Asn	1.0 ÷ 50.0	0.9950
Gln	1.0 ÷ 50.0	0.9950
Ser	1.0 ÷ 50.0	0.9940
Gly	0.50 ÷ 50.0	0.9980
Arg	4.0 ÷ 100.0	0.9960
Pro	25.0 ÷ 1000	0.9996
Ala	4.0 ÷ 50.0	0.9970
Val	1.0 ÷ 50.0	0.9994
Met	0.5 ÷ 50	0.9950
Leu	0.2 ÷ 20.0	0.9999
Phe	1.0 ÷ 100.0	0.9980
Lys	2.0 ÷ 50.0	0.9970

#### 6.4.4 Bias

In mancanza di materiali di riferimento certificati, la valutazione dell'esattezza, e quindi dell'assenza di errori sistematici, è stata effettuata mediante prove di recupero. La procedura adottata prevede l'estrazione e l'analisi di tre aliquote di uno stesso campione di miele, di cui due arricchite con quantità note dell'analita per il quale si vuole determinare il recupero percentuale.

La dipendenza della concentrazione sperimentale di ogni amminoacido dalla quantità di analita aggiunta al campione è espressa dalla relazione

$$C_{\text{sperim}} = C_0 + q_a/m$$

dove:

$C_{\text{sperim}}$  è la concentrazione sperimentale di analita

$C_0$  è la concentrazione di analita nel campione senza aggiunta

$q_a$  è la quantità di standard aggiunta

$m$  è la quantità pesata di miele.

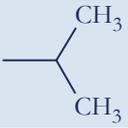
Il metodo utilizzato per il calcolo del recupero si basa sull'applicazione di metodi di regressione lineare (nello specifico, minimi quadrati) alla dipendenza che intercorre tra la quantità  $C_{\text{sperim}}$  ed il rapporto  $q_a/m$ . La pendenza della retta di regressione così ottenuta del permette di valutare l'entità del recupero.

I dati relativi ai recuperi percentuali ottenuti variano da 84.6% (Phe) e 105% (Lys), in accordo con quanto riportato da Nozal<sup>15</sup> e Pirini<sup>2</sup>. E' stata valutata l'accettabilità dei recuperi seguendo le linee guida descritte nell'AOAC<sup>84</sup>. Nella tabella sono riportati gli intervalli di accettabilità previsti per le concentrazioni da noi determinate. Tutti i recuperi da noi ottenuti rientrano all'interno del range descritto e per tale ragione possiamo concludere che il bias del nostro metodo è ben all'interno del range di accettabilità tipico per questi intervalli di concentrazione.

---

<sup>84</sup> AOAC Peer-Verified Methods<sup>SM</sup> Program Manual on Policies and Procedures, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD

**Tabella 6.6** Prove di recupero

AA	pI	Catena Laterale -R	Quantità di standard aggiunta (mg)	Recuperi (%±DS)	Intervalli di accettabilità (%)
Glu	3.2	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>	0.5	100±11	90÷107
Val	6.0		0.05	100±4	80÷110
Met	5.1	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>	0.05	89.2±0.2	80÷110
Phe	5.5	-CH <sub>2</sub> - 	0.25	86±9	80÷110
Lys	9.7	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0.05	105±4	80÷110

## 6.5 CONCLUSIONI

E' stata ottimizzata e validata una metodica RP-HPLC con derivatizzazione precolonna tramite PITC per la determinazione degli amminoacidi liberi nel miele di corbezzolo. La procedura proposta ci ha permesso di definire, per la prima volta, il profilo qualitativo degli amminoacidi in questo tipo di miele. Il confronto con i mieli di altra origine floreale mostra come il contenuto totale di amminoacidi del miele di corbezzolo sia piuttosto basso. La prolina è - fra tutti - l'amminoacido più abbondante; oltre ad essa, sono stati identificati e quantificati altri 13 amminoacidi in livelli di concentrazione compresi fra 100 e 0.1 mg/kg. Sono state rinvenute tracce di Ile solo in alcuni campioni, mentre Tyr, His, Orn e Trp sono sempre risultati al di sotto dell'LoD. Al momento non è possibile indicare uno degli amminoacidi come marker per il miele di corbezzolo, ma è nostra opinione che il profilo amminoacidico possa fattivamente contribuire insieme ad altri parametri (metalli, polifenoli etc.) alla definizione dell'origine geografica.

## CAPITOLO 7

### DETERMINAZIONE DI ALDEIDI E ACIDI FURANICI

#### NEL MIELE

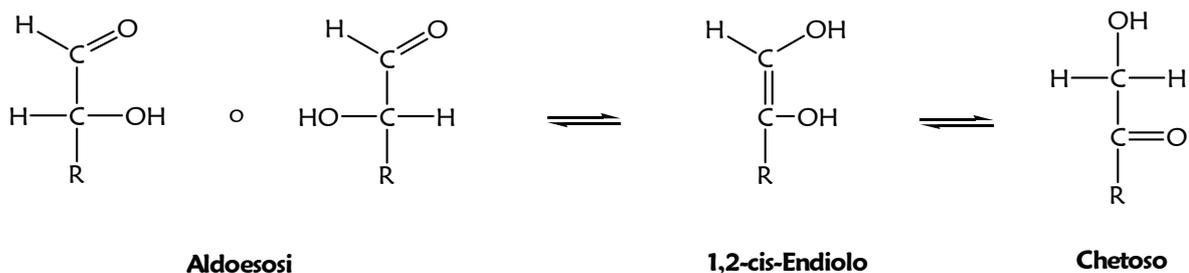
##### 7.1 IMBRUNIMENTI NON ENZIMATICI

Gli alimenti vanno spesso incontro a modificazioni della loro composizione chimica, come ad esempio le trasformazioni che coinvolgono gli zuccheri, note come reazioni di imbrunimento non enzimatico (per distinguerle dall'imbrunimento enzimatico, tipico di frutta e verdura, che coinvolge invece specie polifenoliche). Esse si dicono imbrunimenti in quanto comportano solitamente lo sviluppo di una colorazione bruna che interessa l'alimento in cui avvengono. Tali modificazioni possono avvenire durante la lavorazione, la cottura e/o la conservazione. I processi chimici che appartengono alla categoria degli imbrunimenti non enzimatici sono principalmente:

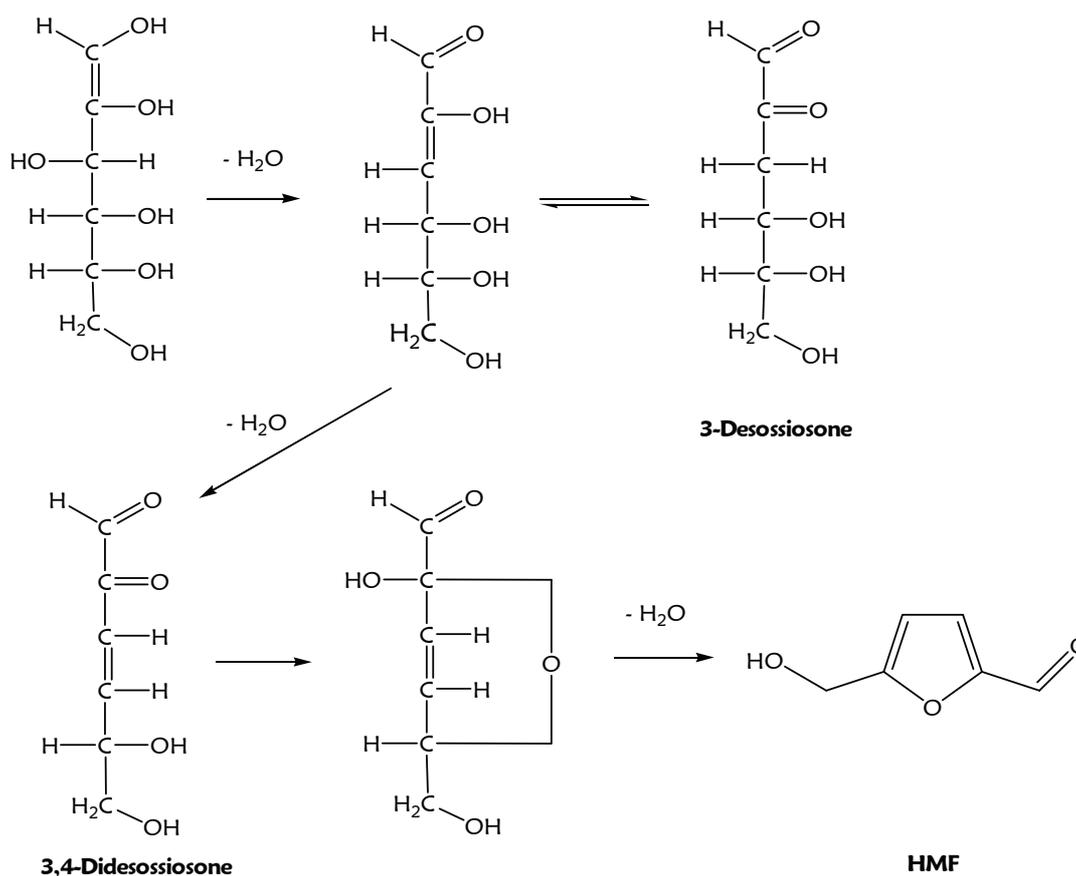
- la caramellizzazione degli zuccheri;
- la reazione di Maillard;
- la degradazione dell'acido ascorbico.

##### 7.1.1 Caramellizzazione degli zuccheri

La caramellizzazione degli zuccheri avviene a temperature superiori a 100 °C e determina lo sviluppo di un'ampia gamma di aromi generalmente associati al caramello. Tale processo chimico determina un'isomerizzazione reversibile di un aldoso o di un chetoso, nella forma aperta, in un intermedio 1,2-cis-endiolo:



L'intermedio formatosi va incontro a disidratazione in ambiente neutro o acido, generando la 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF), la quale è soggetta in seguito, a polimerizzazione:



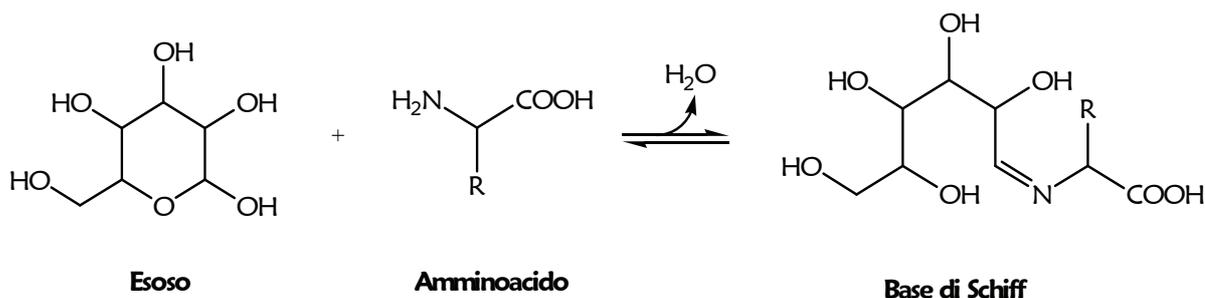
Oltre all'HMF si formano una serie di intermedi di reazione molto reattivi, quali ad esempio i composti  $\alpha$ -dicarbonilici (come il 3-deossialdochetoso) che possono dare

origine a composti ciclici o reagire ulteriormente con composti amminici nella degradazione di Strecker.

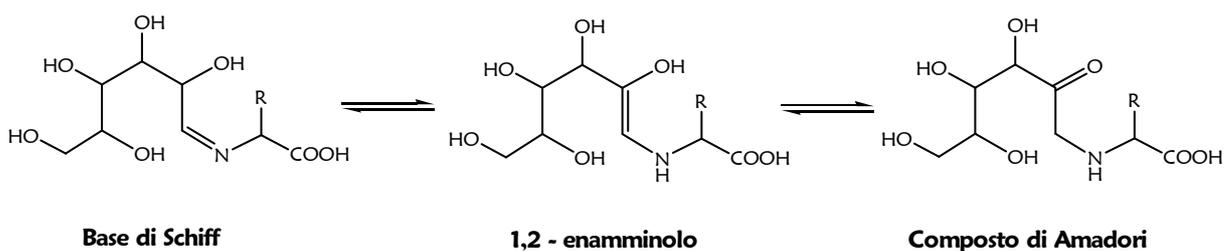
### 7.1.2 Reazione di Maillard

La reazione di Maillard consiste in una rete complessa di processi di glicazione delle proteine, ed è stata oggetto di numerosi studi che hanno permesso di delineare alcuni meccanismi di formazione delle numerose sostanze che si formano durante il suo decorso. Si tratta di reazioni che interessano gli alimenti che contengono allo stesso tempo zuccheri (o composti carbonilici come aldeidi e chetoni derivanti dall'irrancidimento ossidativo dei lipidi) e proteine. Tali reazioni coinvolgono quindi i gruppi carbonilici dei glucidi: aldosi, in particolare glucosio, ma anche il destrosio, il fruttosio, l'amido di mais e le maltodestrine, e gruppi amminici liberi, terminali o appartenenti alle catene laterali degli amminoacidi come la lisina. La reazione è favorita da calore, luce, metalli e pH leggermente alcalino e si suddivide in tre fasi.

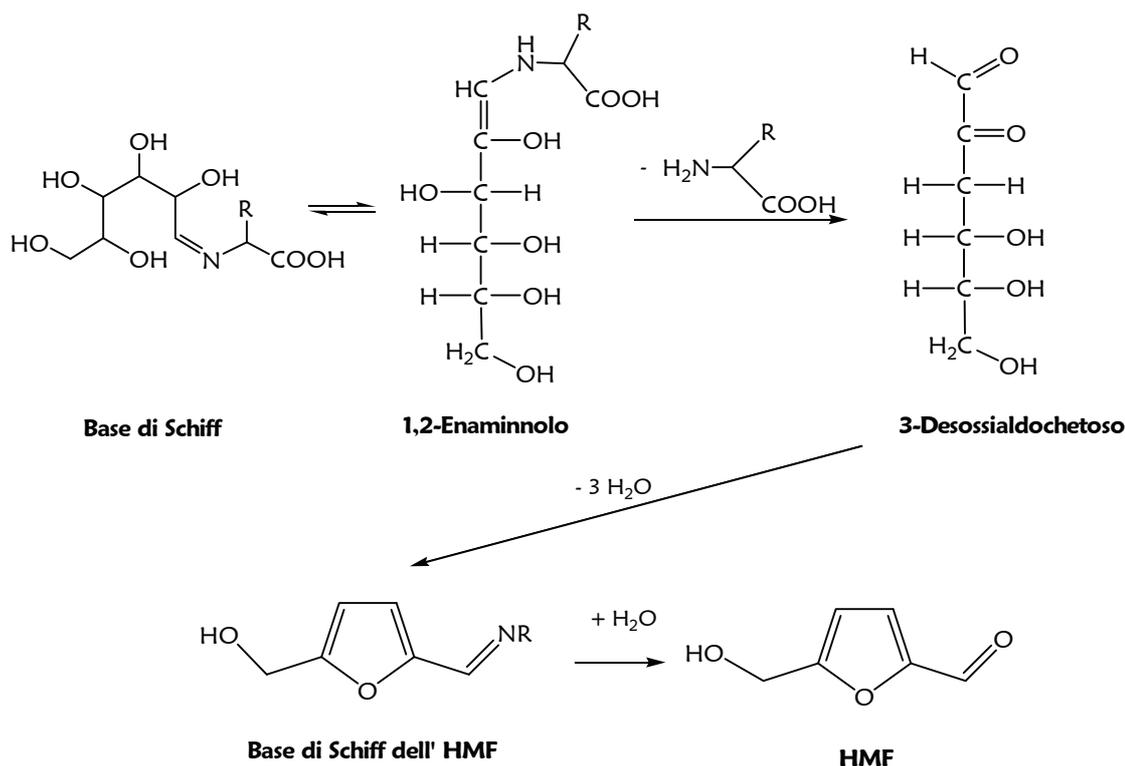
La prima fase consiste nella condensazione fra il gruppo carbonilico dell'aldoso e il gruppo amminico libero di un amminoacido a dare un'aldosilammina N-sostituita. Questo è il risultato di un attacco nucleofilo del gruppo  $-NH_2$  dell'amminoacido al gruppo carbonilico elettrofilo dello zucchero. Questo processo può essere definito come una disidratazione dello zucchero ammino-assistita. Il prodotto di tale condensazione perde rapidamente una molecola d'acqua e viene convertito in una base di Schiff, che ciclizzerà in un'aldosilammina.



Data la sua instabilità, l'aldosilammina va incontro al cosiddetto riarrangiamento di Amadori, che porta alla formazione di chetosammine (1-ammino-1-deossi-2-chetosi): questo è considerato il passaggio chiave nella formazione dei più importanti intermedi per la reazione di imbrunimento.



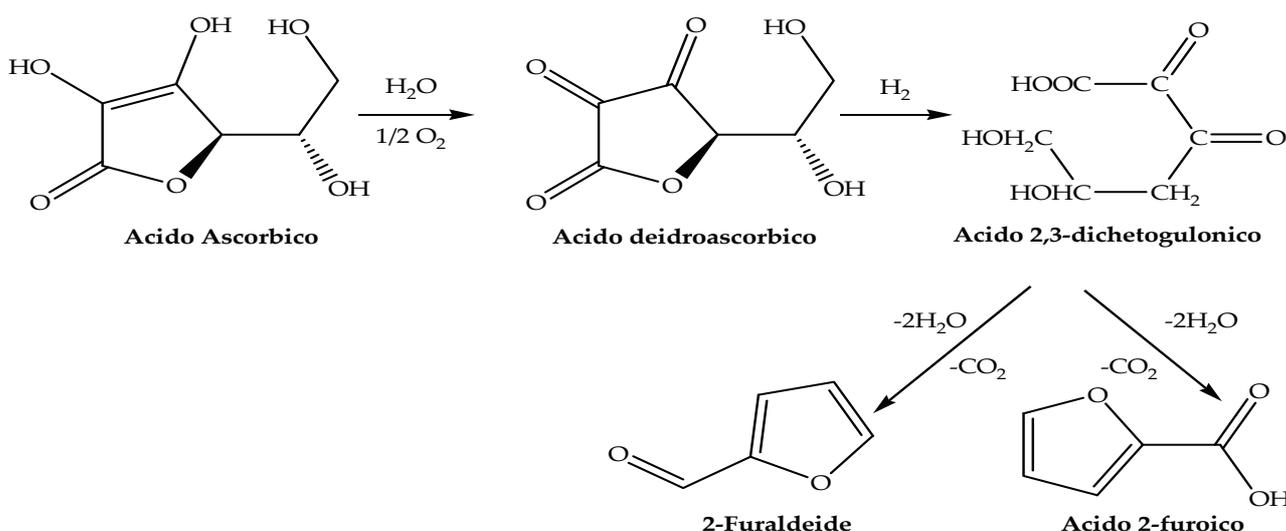
La seconda fase riguarda invece le reazioni che vedono coinvolti i prodotti di Amadori, i quali possono dare reazione di 1,2- o 2,3-enolizzazione (a pH acidi o debolmente basici, rispettivamente), i cui prodotti, in seguito a deamminazione, generano il 3-deossialdochetoso (chiamato anche 3-deossixulosio o 3-deossiosone), le cui successive degradazioni portano alla formazioni di composti colorati e aromatici. Tra i prodotti della degradazione del 3-deossialdochetoso vi è l'HMF, la cui formazione a partire dalla base di Schiff è riassunta come segue.



Nel terzo e ultimo stadio della reazione di Maillard si ha la formazione di pigmenti bruni e lo sviluppo di aromi e gusti di arrostito e tostatura come risultato della polimerizzazione di intermedi altamente reattivi formati durante il procedere della reazione. La classe più importante degli aromi deriva dalla degradazione di Strecker degli amminoacidi, che determina la formazione di aldeidi volatili quali, ad esempio, quelle responsabili del tipico aroma di pane tostato, e di pirazine che contribuiscono invece, all'aroma di cioccolato o degli arrostiti di carne. Tutti questi intermedi ed altri ancora (pirazine, pirroli, pirimidine) reagiscono ulteriormente con gli amminoacidi per formare polimeri e copolimeri azotati chiamati melanoidine responsabili di aromi intensi e della colorazione bruna; la chimica di questi composti non è del tutto nota e il loro meccanismo di formazione è ancora oscuro.

### 7.1.3 Degradazione dell'acido ascorbico

I fenomeni di imbrunimento nei prodotti particolarmente ricchi di acido ascorbico, quali i succhi di agrumi e i concentrati di pomodoro, si possono ricondurre alla trasformazione dell'acido ascorbico in furfurale, il quale dà origine successivamente ai polimeri responsabili della colorazione bruna assunta dagli alimenti, all'acido 2-furoico e altri prodotti.



## 7.2 STATO DELL'ARTE ED OBIETTIVI

Fra tutti gli alimenti a base saccaridica, il miele offre alcune delle condizioni ideali per la formazioni di aldeidi furaniche: alta concentrazione di zuccheri, bassi valori di pH e di attività dell'acqua, presenza di acidi organici. L'HMF rappresenta la più importante delle aldeidi furaniche ed è, come spiegato nei capitoli precedenti, utilizzato come indice di freschezza per il miele. La sua concentrazione aumenta in questo alimento in funzione di diversi fattori: acidità libera, umidità, origine botanica e modalità di conservazione. Un'alta concentrazione di HMF può essere indicativa per la determinazione dell'origine botanica<sup>85</sup>, e di fenomeni indesiderati quali deterioramento<sup>86</sup>, adulterazione<sup>87</sup>, eccessivo

<sup>85</sup> Fallico B., Zappalà M., Arena A., Verzera A., Food Chem 85, 305 (2004)

riscaldamento<sup>88</sup>, e malconservazione. Inoltre, la presenza di composti potenzialmente tossici (come le aldeidi) negli alimenti ha determinato l'incremento dell'attenzione da parte della comunità scientifica verso l'importanza del controllo della qualità e della sicurezza alimentare<sup>89</sup>, al fine di salvaguardare la salute del consumatore. In particolare l'HMF potrebbe avere una potenziale azione citotossica<sup>90</sup>, genotossica<sup>91</sup> e mutagena<sup>92,93</sup>, in accordo con alcuni studi svolti. Altri autori sostengono invece che comunque la 5-idrossimetil-2-furaldeide non rappresenti un rischio per l'uomo<sup>94</sup>. Al momento non è stato ancora chiarito se l'HMF sia effettivamente pericoloso per la salute umana, e tale questione è ancora oggetto di dibattito.

L'International Honey Commission (IHC) propone tre diversi metodi ufficiali per la determinazione dell'HMF nel miele: due di questi sono spettrofotometrici (metodi di Winkler<sup>95</sup> e White<sup>96</sup>), mentre il terzo è di tipo RP-HPLC<sup>97</sup>. I primi risultano essere rapidi ma caratterizzati da bassa selettività e sensibilità, mentre quello cromatografico, sebbene

---

<sup>86</sup> Kim M.H.J., Richardson J., *J. Chromatogr.* 593, 153 (1992)

<sup>87</sup> Ozcan M., Arslan D., Ceylan D.A., *Food Chem* 99, 24 (2006)

<sup>88</sup> Spano N., Ciulu M., Floris A., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Sanna G., *Food Chem* 108, 81 (2008)

<sup>89</sup> Scultheiss J., Jensen D., Galensa R., *J Chromatogr A*, 880, 233 (2000)

<sup>90</sup> Nassberger L., *Hum. Exp. Toxicol.* 9, 211 (1990)

<sup>91</sup> Bruce W.R., Archer M.C., Corpet D.E., Medline A., Minkin S., Stamp D., Yin Y., Zhang X.M., *Mutat Res.* 290, 111 (1993)

<sup>92</sup> Surh Y.J., Liem A., Miller J.A., Tannenbaum S.R., *Carcinogenesis* 15, 2375 (1994)

<sup>93</sup> Zhang X.M., Chan C.C., Stamp D., Minkin S., Archer M.C., Bruce W.R., *Carcinogenesis* 14, 773 (1993)

<sup>94</sup> Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Eisenbrand G., *Food Chem Toxicol.* 38, 801 (2000)

<sup>95</sup> Winkler O., *Lebensm Z., Unters Forsch* 102, 160 (1955)

<sup>96</sup> White J.W., *J AOAC Int* 62, 59 (1979)

<sup>97</sup> Jeuring H.J., Koppers F.J.E.M., *J. Assoc. Off. Agric. Chem* 63, 1215 (1980)

più sensibile e accurato, implica tempi di analisi piuttosto lunghi<sup>98</sup>. Inoltre, l'applicazione di tale metodica per la determinazione dell'HMF nel miele di corbezzolo ha evidenziato la forte presenza di errori sistematici<sup>99</sup>.

Nel miele possono essere presenti anche altre aldeidi e acidi furanici, sebbene in minor quantità e, talvolta, in concentrazioni talmente basse da non poter essere quantificati. Mentre è ormai noto che la presenza in questo prodotto, della 2-furaldeide (2F) e dell'acido 2-furoico (A2F) deriva principalmente dalla degradazione dell'acido ascorbico<sup>100</sup> (vedi Par.7.1), non è stato ancora chiarita l'origine della 3-furaldeide (3F) e dell'acido 3-furoico (A3F), anch'essi talvolta rintracciabili nel miele<sup>101</sup>.

Oltre a quelli già citati, la letteratura scientifica offre numerosi spunti per la determinazione dell'HMF in matrici alimentari<sup>102,103,104,105,106</sup>, mentre pochi lavori sono dedicati alla determinazione degli altri composti furanici<sup>13,17,107</sup>. In tale contesto, uno dei contributi più importanti è dato dal lavoro pubblicato da Nozal e dai suoi collaboratori<sup>17</sup>, che illustra un metodo RP-HPLC per la determinazione simultanea di HMF, 2F, 3F, A2F, A3F e metilantranilato nel miele. Il metodo proposto tuttavia non permette un'analisi

---

<sup>98</sup> Zappalà M., Fallico B., Arena E., Verzera A., Food Control 16, 273 (2005)

<sup>99</sup> Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Tapparo A., Sanna G., Talanta 68, 1390-1395 (2006)

<sup>100</sup> Sawamura M., Takemoto K., Matsuzaki Y., Ulkeda H., Kununose H., J. Agric. Food Chem. 42, 1200 (1994)

<sup>101</sup> Nozal M.J., Bernal J.L., Toribio L., Jimenez J.J., Martin M.T., J. Chromatogr A 917, 95 (2001)

<sup>102</sup> Corradini C., Corradini D., J. Microcolumn Sep. 6, 19 (2004)

<sup>103</sup> Risner C.H., Kiser M.J., Dube M.E., J. Food Sci, 71 C179 (1994)

<sup>104</sup> Teixido E., Santos F.J., Puignou L., Galceran M.T., J. Chromatogr A 1185, 102 (2008)

<sup>105</sup> Edris A.E., Murkovic M., Siegmund B., Food Chem 104, 1310 (2007)

<sup>106</sup> Teixido E., Moyano E., Santos F.J., Galceran M.T., J. Chromatogr A 1185, 102 (2008)

<sup>107</sup> Lo Coco F., Valentini C., Novelli V., Ceccon I., J. Chromatogr A 749, 95 (1996)

diretta del campione, e prevede uno step di estrazione avente il fine di rimuovere le interferenze e aumentare la sensibilità. L'obiettivo del lavoro da noi svolto è stato quello di sviluppare un metodo RP-HPLC atto alla determinazione dei composti furanici citati nel miele senza alcun trattamento preparatorio della matrice<sup>108</sup>.

## 7.3 SEZIONE SPERIMENTALE

### 7.3.1 Campioni

Sono stati presi in esame diciotto campioni di miele provenienti da diverse aree geografiche dell'Italia (Sardegna, Toscana e Piemonte) e della Francia (Corsica), e appartenenti a diverse origine botaniche. In particolare, dodici sono mieli di corbezzolo, due sono mieli di cardo, mentre i restanti quattro sono rispettivamente di eucalipto, cisto, castagno e millefiori. Tutti i campioni sono stati conservati ad una temperatura di 4°C prima di ciascuna analisi.

Dopo aver riportato i campioni a temperatura ambiente in modo graduale, circa 10 g sono stati omogeneizzati per tre minuti. 1 g di campione omogeneizzato è stato trasferito in un becher e solubilizzato, sotto agitazione, in qualche mL di acqua mQ. La soluzione è stata trasferita quantitativamente in un matraccio da 10 mL e si è portato a volume con acqua mQ. La soluzione così preparata è stata iniettata in colonna attraverso un filtro in PVDF ( $\phi = 13$  mm, 0.45  $\mu$ m).

### 7.3.2 Analisi RP-HPLC

---

<sup>108</sup> Spano N., Ciulu M., Floris I., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Salis S., Sanna G., Talanta 78, 310-314 (2009)

Il metodo messo a punto rappresenta l'evoluzione di una metodica sviluppata e validata in precedenza, dal nostro gruppo di ricerca per la determinazione dell'HMF nel miele<sup>15</sup>. I cromatogrammi derivanti dall'applicazione della suddetta metodica a una miscela dei cinque composti furanici ha messo in evidenza la sostanziale inapplicabilità del metodo a causa di alti tempi di ritenzione per gli analiti e fenomeni di "scodamento" dei picchi per i due acidi (A2F e A3F). Per tale ragione, si è stabilito di aumentare la concentrazione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0.1 mol/L (eluente A); tale accorgimento ha rappresentato un compromesso ottimale fra la risoluzione e la durata della corsa cromatografica. Si è stabilito inoltre di adottare il metanolo come eluente B. Il programma di eluizione finale è mostrato in Tabella 7.1.

**Tabella 7.1** Condizioni cromatografiche del metodo per la determinazione di composti furanici nel miele

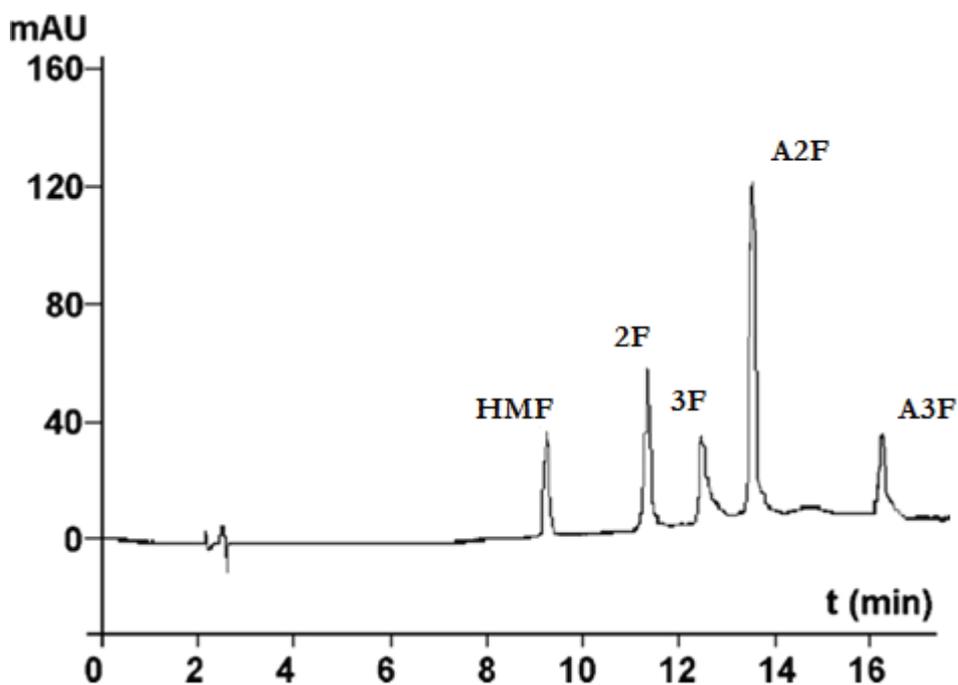
<b>RP-HPLC</b>	
<b>Strumento</b>	<b>Perkin Elmer Series 200 Pump</b>
<b>Loop di Campionamento</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>
<b>Colonna C<sub>18</sub></b>	<b>Alltima C<sub>18</sub> 5 <math>\mu</math>m (4.6 mm x 20 mm)</b>
<b>Precolonna</b>	<b>Alltima C<sub>18</sub> (4.6 mm x 20 mm)</b>
<b>Rivelatore UV-Vis</b>	<b>Perkin-Elmer Series 200 UV-Vis</b> $\lambda = 280$ nm da 0 a 11.5 min $\lambda = 240$ nm da 11.5 a 23 min
<b>Eluenti</b>	<b>A = H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mol/L</b> <b>B = CH<sub>3</sub>OH</b>
<b>Sistema di eluizione in gradiente</b>	A/B = 90/10 per 2 min A/B = 70/30 in 7 min A/B = 70/30 per 2 min A/B = 40/60 in 5 min A/B = 40/60 per 5 min A/B = 90/10 in 1 min A/B=90/10 per 1 min
<b>Durata totale</b>	<b>23 min</b>
<b>Flusso</b>	<b>1.2 mL min<sup>-1</sup></b>

Gli spettri UV degli analiti scelti per questo studio ci hanno permesso di ricavare le lunghezze d'onda corrispondenti ai massimi di assorbanza: HMF (284 nm), 2F (277 nm), 3F (224 nm), A2F (253 nm) e A3F (239 nm). Com'è possibile osservare dalla Tabella 7.1, per il metodo proposto sono state adottate due diverse lunghezze d'onda operative (280 e 240 nm), al fine di garantire un'adeguata sensibilità per tutti i composti furanici.

## 7.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 7.4.1 Separazione cromatografica

Grazie al programma di eluzione messo a punto, tutti gli analiti vengono eluiti e risolti a livello della linea di base entro 17 minuti. L'intera corsa cromatografica si conclude in 23 min. In figura 7.1 è riportato il cromatogramma di una miscela di standard a 2 ppm, mentre nelle figure 7.2 e 7.3 sono mostrati rispettivamente, i cromatogrammi relativi ad un miele di corbezzolo e un miele di cardo.



**Figura 7.1** Cromatogramma di una miscela di standard a 2 ppm

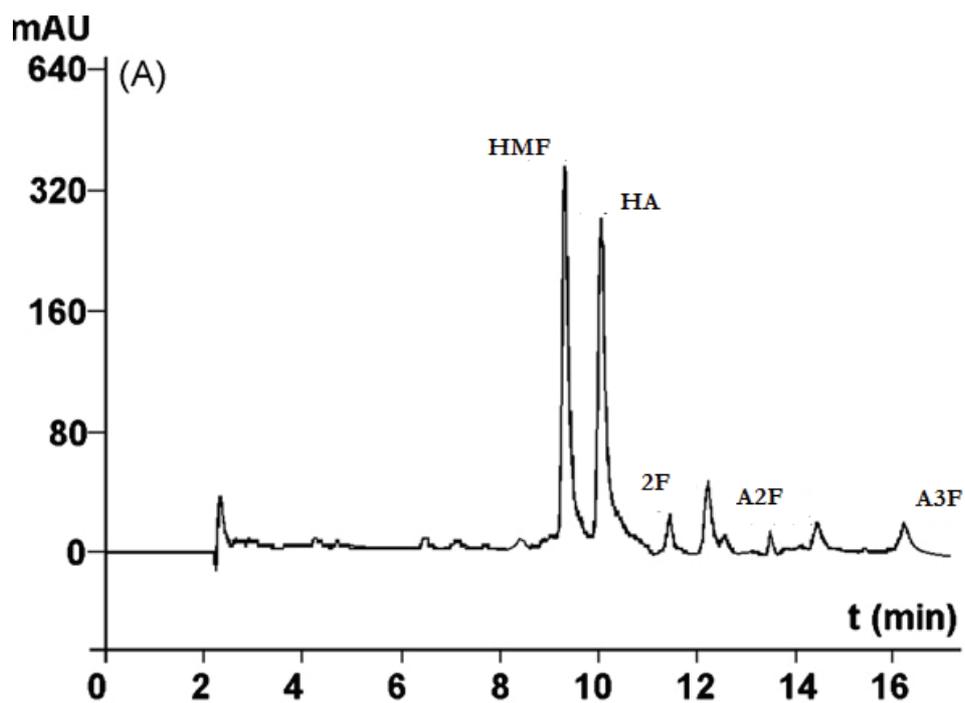


Figura 7.2 Cromatogramma di un miele di corbezzolo (HA = Acido Omogentisico)

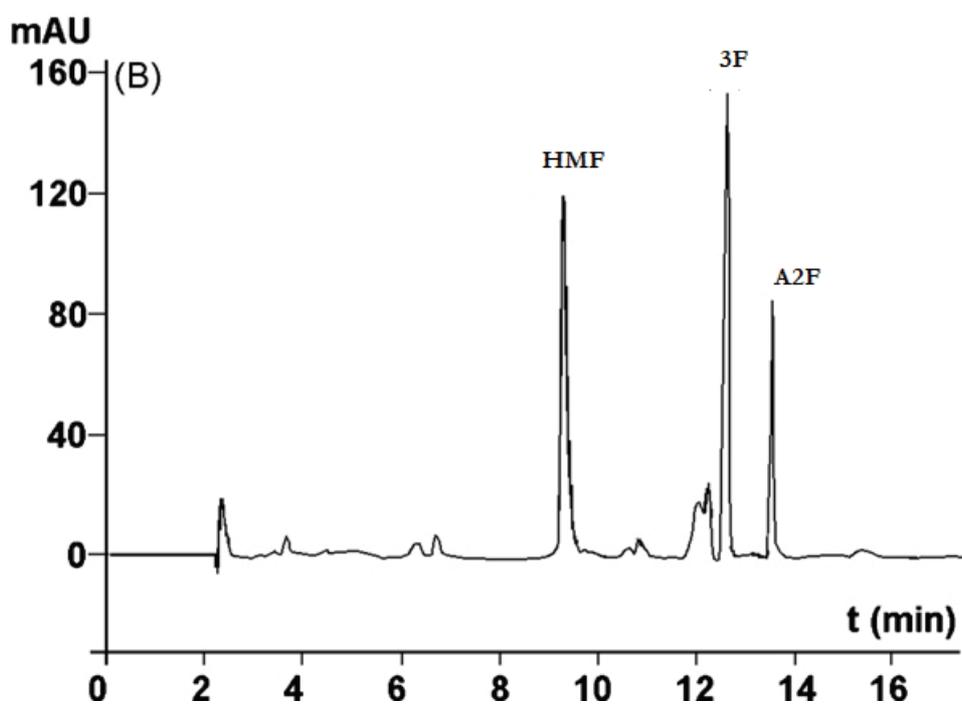


Figura 7.3 Cromatogramma di un miele di cardo

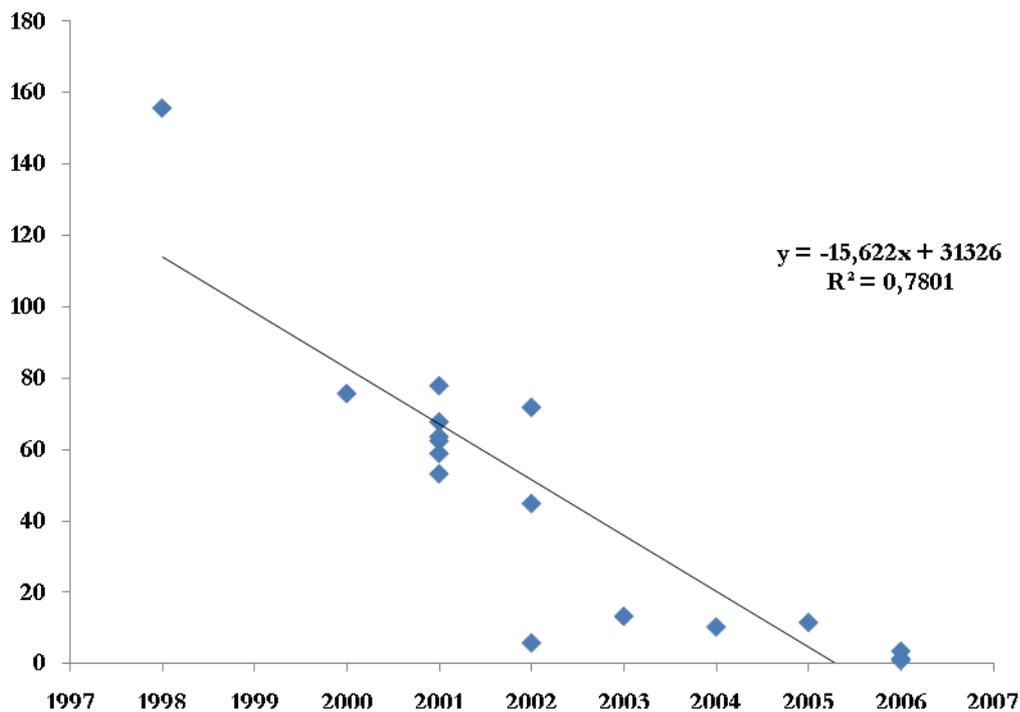
## 7.4.2 Composti furanici nel miele

In Tabella 7.2 riportiamo le concentrazioni dei composti furanici nei campioni di miele analizzati. Tutte le misure sono state eseguite in triplicato. Il metodo quantitativo adottato è quello della calibrazione esterna.

**Tabella 7.2** Concentrazione media di aldeidi e acidi furanici nei campioni di miele analizzati (mg/kg)

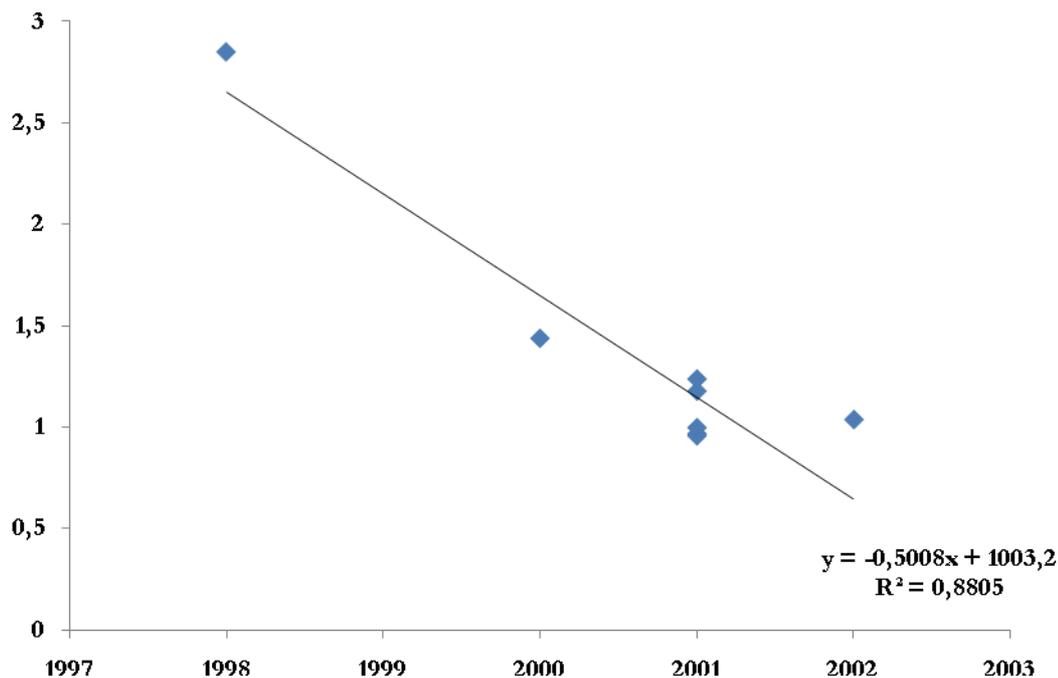
Campioni	Origine Geografica	Origine Botanica	Anno di produzione	HMF	2F	3F	A2F	A3F
SS1	Sardegna	Corbezzolo	2000	75.8±1.0	1.44±0.01	<0.30	0.79±0.02	<0.09
SS2	Sardegna	Corbezzolo	2001	53.3±2.1	0.97±0.02	<0.30	<0.04	<0.09
SS3	Sardegna	Corbezzolo	2001	67.8±0.8	0.96±0.04	<0.30	0.35±0.01	0.84±0.03
SS4	Sardegna	Corbezzolo	2002	5.9±0.2	<0.04	<0.30	<0.04	<0.09
SS5	Sardegna	Corbezzolo	Sconosciuta	150.7±1.6	0.94±0.16	<0.30	0.51±0.01	<0.09
ST1	Toscana	Corbezzolo	2001	62.5±1.2	1.18±0.02	<0.30	1.28±0.05	<0.09
ST2	Toscana	Corbezzolo	2001	78.0±1.2	1.24±0.03	<0.30	1.04±0.02	<0.09
ST3	Toscana	Corbezzolo	2002	71.9±1.4	1.04±0.02	1.66±0.04	2.90±0.07	<0.09
SP1	Piemonte	Corbezzolo	1998	155.8±1.8	2.85±0.09	<0.30	0.63±0.01	<0.09
SC1	Corsica	Corbezzolo	2001	59.0±1.9	<0.04	<0.30	<0.04	<0.09
SC2	Corsica	Corbezzolo	2002	44.97±0.07	<0.04	<0.30	<0.04	<0.09
SU1	Umbria	Corbezzolo	2001	63.7±1.7	1.00±0.03	<0.30	3.8±0.1	<0.09
T1	Sardegna	Cardo	2005	11.6±0.4	<0.04	2.58±0.09	2.15±0.08	<0.09
T2	Sardegna	Cardo	2006	3.57±0.75	<0.04	<0.30	<0.04	<0.09
E	Sardegna	Eucalipto	2004	10.4±0.1	<0.04	3.94±0.15	3.5±0.2	<0.09
MF	Sardegna	Millefiori	2003	13.3±0.2	<0.04	<0.30	3.24±0.02	<0.09
Cs	Sardegna	Cisto	2006	1.4±0.3	<0.04	<0.30	<0.04	<0.09
Ch	Sardegna	Castagno	2006	1.0±0.2	<0.04	<0.30	<0.04	<0.09

L'HMF è stato rinvenuto in tutti i campioni di miele in concentrazioni comprese fra 1.0±0.2 mg/kg (campione Ch, prodotto nel 2006) e 155.8±1.8 mg/kg (campione SP1, prodotto nel 1998). Come emerge dalla figura 7.4, pare esserci una buona correlazione fra la concentrazione di HMF dei campioni e l'anno di produzione.



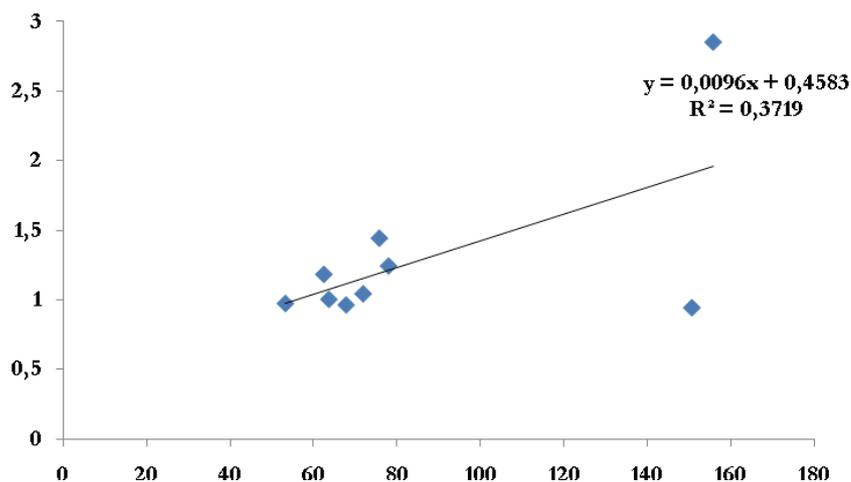
**Figura 7.4** Correlazione fra la concentrazione di HMF (asse y) e l'anno di produzione dei campioni (asse x)

La 2F è stata rinvenuta con concentrazioni maggiori del limite di quantificazione in nove campioni, tutti raccolti fra il 1998 e il 2002. Si tratta in tutti i casi di mieli di corbezzolo e la 2-furaldeide è presente in concentrazioni che variano da  $1.0 \pm 0.2$  mg/kg (SS5) e  $2.85 \pm 0.09$  mg/kg (SP1). I valori da noi ottenuti sono più elevati di quelli riportati da Nozal<sup>17</sup>, anche se è necessario sottolineare che nel suddetto studio sono stati presi in considerazione solo campioni freschi. L'origine botanica sembra avere una minore influenza sul tenore di 2-furaldeide rispetto a quanto osservato per l'HMF. Questa ipotesi è corroborata dalla buona correlazione esistente tra il contenuto di 2F e l'anno di produzione (Figura 7.5). Inoltre, nei campioni raccolti fra il 2003 e il 2006 è stata riscontrata l'assenza dell'analita in questione.



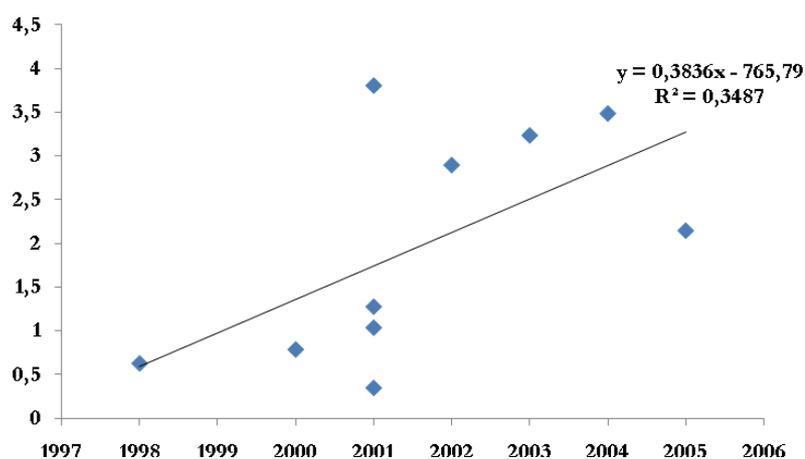
**Figura 7.5** Correlazione fra la concentrazione di 2F (asse y) e l'anno di produzione dei campioni (asse x)

Analizzando i dati ottenuti pare che non vi sia una correlazione fra il contenuto di HMF e quello di 2F, e ciò può essere ascrivibile ai diversi processi chimici che portano alla formazione di questi due composti. In particolare, la reazione di Maillard rappresenta la fonte principale per la 5-idrossimetil-2-furaldeide, mentre la degradazione dell'acido ascorbico è quella che determina la presenza della 2F.



**Figura 7.6** Correlazione fra il contenuto di 2F (asse y) e il contenuto di HMF (asse x)

L'acido 2-furoico è stato quantificato in undici campioni, con concentrazioni che vanno da  $0,35 \pm 0,01$  mg/kg (SS3) a  $3,81 \pm 0,14$  (SU1) mg/kg. A differenza di quanto osservato per la 2-furaldeide, non pare esserci una buona correlazione fra i dati riguardanti la concentrazione di A2F e l'anno di produzione (Figura 7.7). Ad esempio, la più alta concentrazione di acido 2-furoico è stata riscontrata in uno dei campioni più freschi.



**Figura 7.7** Correlazione fra il contenuto di A2F (asse y) e l'anno di produzione dei campioni (asse x)

Anche fra la concentrazione di HMF e quella di A2F pare esserci una cattiva correlazione ( $R^2=0.43$ ), mentre nessuna correlazione è stata osservata fra il tenore di 2F e quello di A2F. E' possibile supporre che l'acido 2-furoico sia una specie intermedia di un complesso processo di degradazione; questo acido si forma velocemente da precursori specifici non sempre presenti nel miele (ad es., l'acido ascorbico) e viene lentamente degradato in reazioni successive, responsabili delle basse concentrazioni di A2F nei campioni più vecchi.

Per quanto riguarda la 3-furaldeide, essa è stata quantificata solo in tre campioni con concentrazioni che vanno da  $1.66\pm 0.04$  mg/kg (campione ST3) a  $3.94\pm 0.15$  mg/kg (campione E). L'acido 3-furoico è stato invece quantificato in un unico campione (SS3) con una concentrazione pari a  $0.84\pm 0.03$  mg/Kg. I dati relativi a questi due analiti sono in accordo con quanto riportato da Nozal<sup>17</sup>.

## 7.5 VALIDAZIONE

### 7.5.1 Limite di rivelabilità (LoD) e di quantificazione (LoQ)

Questi parametri sono stati calcolati in accordo con il metodo ULA1 (Upper Limit Approach)<sup>109</sup> approvato dalla IUPAC. Per ciascun analita sono state preparate e analizzate soluzioni a concentrazioni vicine al limite di rivelabilità atteso. Ciascuna misura è stata ripetuta 3 volte. Nella Tabella 7.3 sono riportati i valori di LoD e LoQ ottenuti per ciascun composto furanico. I limiti di rivelabilità e quantificazione calcolati variano

---

<sup>109</sup>Mocak J., Bond A.M., Mitchell S., Schollary G., Pure & Appl Chem 69, 297-328, IUPAC recommendation, document 550/35/87

rispettivamente negli intervalli 0.001-0.01 mg/L e 0.004-0.03 mg/L. I dati ottenuti nel nostro studio sono confrontabili con quelli pubblicati da Nozal e i suoi collaboratori.

**Tabella 7.3** LoD e LoQ

Analita	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)
HMF	0.003	0.010
2F	0.001	0.004
3F	0.010	0.030
A2F	0.001	0.004
A3F	0.009	0.027

### 7.5.2 Precisione

La precisione del metodo proposto è stata valutata in termini di ripetibilità e riproducibilità.

La ripetibilità è stata determinata attraverso 5 repliche consecutive dell'analisi dello stesso campione di miele, ed espressa in termini del coefficiente di variazione percentuale  $CV\%_{\text{exp,r}}$ . I dati relativi alla ripetibilità sono riportati in Tabella 7.4.

La ripetibilità media varia fra 0.03% (A3F) e 1.63% (3F). E' stata valutata l'accettabilità dei risultati relativi alla ripetibilità utilizzando il modello proposto da Horwitz<sup>110</sup> (vedi Par. 6.4.2). Come mostrato nella Tabella 7.4, i valori dei  $CV\%_{\text{exp,r}}$  sono sempre al di sotto del limite superiore previsto dalla teoria di Horwitz.

La riproducibilità è stata invece stimata attraverso cinque diverse analisi, condotte sul medesimo campione di miele in sessioni analitiche diverse nell'arco di un mese. La riproducibilità media stimata varia da 0.97% (2F) a 3.54% (A3F). Come per la ripetibilità,

<sup>110</sup> Horwitz W., Anal Chem 54, 67A-76A (1982)

sono stati calcolati i coefficienti di variazione percentuali  $CV\%_{\text{exp,R}}$  (Tabella 7.4), ed è stata valutata l'accettabilità delle performances di riproducibilità attraverso il modello di Horwitz. Dai dati ottenuti emerge che anche per quanto riguarda la riproducibilità i dati sono da considerarsi accettabili.

**Tabella 7.4** Ripetibilità e riproducibilità

Analita	RIPETIBILITA'		RIPRODUCIBILITA'	
	$CV\%_{\text{exp,r}}$	HorRat <sub>r</sub>	$CV\%_{\text{exp,R}}$	HorRat <sub>R</sub>
HMF	0.99	0.20	1.47	0.19
2F	0.35	0.04	0.97	0.7
3F	1.63	0.15	2.97	0.19
A2F	0.44	0.05	1.80	0.13
A3F	0.03	0.004	3.54	0.27

### 7.5.3 Range dinamico lineare

Questo parametro è stato determinato per ciascuno degli analiti. Si sono osservati, come mostrato dalla Tabella 7.5, ottimi coefficienti di correlazione lineare in quasi tutti i casi.

**Tabella 7.5** Linearità

Analita	Range dinamico lineare (mg/L)	R <sup>2</sup>
HMF	0.01 ÷ 100	0.9994
2F	0.01 ÷ 200	0.9992
3F	0.05 ÷ 200	0.9939
A2F	0.05 ÷ 100	0.9996
A3F	0.05 ÷ 100	0.9991

### 7.5.4 Bias

In mancanza di materiali di riferimento certificati la valutazione dell'esattezza (e quindi dell'assenza di errori sistematici) è stata eseguita mediante prove di recupero. La procedura adottata prevede l'estrazione e l'analisi di tre aliquote di uno stesso campione di miele, di cui due arricchite con quantità note dell'analita per il quale si vuole determinare il recupero percentuale. I recuperi percentuali ottenuti per ciascuno dei composti furanici sono riportati in Tabella 7.6. E' stata valutata l'accettabilità dei recuperi seguendo le linee guida descritte nell'AOAC<sup>111</sup>. Tutti i recuperi da noi ottenuti rientrano all'interno del range descritto e per tale ragione possiamo concludere che per il nostro metodo l'errore sistematico è – ove presente – all'interno del range di accettabilità previsto dall'AOAC per quel livello di concentrazione.

**Tabella 7.5** Prove di recupero

Analita	Recuperi (%±DS)	Intervallo di accettabilità
HMF	97±14	80-110
2F	83.3±0.6	80-110
3F	99.8±7.4	80-110
A2F	81.0±2.8	80-110
A3F	82.9±0.9	80-110

<sup>111</sup> AOAC Peer-Verified Methods<sup>SM</sup> Program Manual on Policies and Procedures, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD

## 7.6 CONCLUSIONI

E' stato sviluppato e validato un metodo RP-HPLC diretto per la determinazione contemporanea di HMF, 2F, 3F, A2F, e A3F nella matrice miele. Il metodo proposto è stato applicato a 18 campioni di diversa origine botanica e geografica, prodotti in periodi differenti. I risultati ottenuti hanno mostrato la presenza dei cinque analiti a diversi livelli di concentrazione. Ad eccezione dell'HMF, nessuno dei composti è stato quantificato in tutti i campioni sottoposti ad indagine. 2F e A2F sono entrambi risultati presenti in metà dei mieli analizzati con concentrazioni dell'ordine di grandezza dell'unità di ppm, mentre la 3F è stata rintracciata in tre campioni e l'A3F in un solo campione. Sono state prese in considerazione le possibili correlazioni esistenti fra le concentrazioni dei composti furanici e sono state formulate alcune ipotesi circa la formazione di tali composti nel miele. Infine, i parametri di validazione hanno mostrato che il metodo è caratterizzato da bassi valori di LoD e LoQ, un ampio range dinamico lineare e un'ottima precisione. Le prove di recupero hanno dimostrato inoltre, l'accettabilità delle entità dei recuperi in relazione al livello di concentrazione esplorato.

## CAPITOLO 8

### DETERMINAZIONE DI VITAMINE IDROSOLUBILI

#### NEL MIELE E NELLA GELATINA REALE

##### 8.1 LE VITAMINE

Le vitamine costituiscono un insieme eterogeneo di sostanze nutrienti, presenti nei materiali biologici non solo di natura alimentare. Esse non hanno nulla in comune da un punto di vista strutturale e anche per quanto riguarda le loro funzioni biologiche, hanno pochi elementi in comune. Possiamo comunque affermare che:

- sono tutte costituenti essenziali di sistemi biochimici e/o fisiologici della vita animale e vegetale;
- non possono essere sintetizzate in grande quantità dagli organismi animali;
- la loro concentrazione nei materiali biologici è generalmente bassa;
- la loro assenza nei tessuti degli organismi viventi provoca delle patologie specifiche da carenza quali lo scorbuto (carenza di vitamina C), il beriberi (carenza di tiamina) e la pellagra (carenza di niacina).

Il termine vitamina fu coniato nel 1912 da Casimir Funik, il quale giunse vicino all'isolamento del fattore anti-beriberi dalla crusca di riso, impiegando dei polli per verificare gli estratti. Sospettendo che, dal punto di vista chimico il fattore fosse un'ammina introdusse il termine "vitamine" dalla contrazione di "vital amine" (ammina vitale).

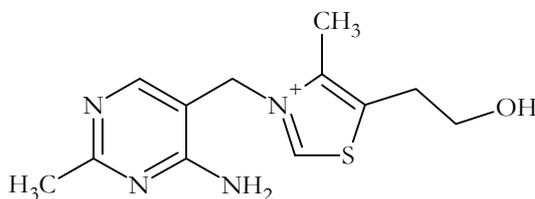
Il primo compito della chimica fu quello di isolare le vitamine allo stato puro e determinarne le strutture: una volta che queste furono note, il passo successivo consistette invece nel mettere a punto sia metodi sensibili ed accurati per la loro determinazione nei prodotti alimentari sia dei processi di sintesi che permettessero l'utilizzo delle vitamine in ambito clinico o come integratori alimentari.

Inizialmente furono utilizzati saggi biologici che si rivelarono inadatti, lenti e costosi; invece ora si utilizzano metodi cromatografici, specialmente in cromatografia liquida ad alte prestazioni.

Le vitamine presentano strutture chimiche molto diverse tra loro per cui, al momento, l'unica classificazione operativamente valida è quella che le distingue in due gruppi: quello delle vitamine idrosolubili (vitamine del gruppo B e vitamina C) e quello delle vitamine liposolubili (vitamine A, E, D, K).

### 8.1.1 Tiamina (vitamina B<sub>1</sub>, aneurina)

La tiamina è una vitamina idrosolubile nella cui struttura troviamo un anello tiazolico ed uno pirimidinico uniti tra loro da un gruppo metilenico (Fig. 8.1).



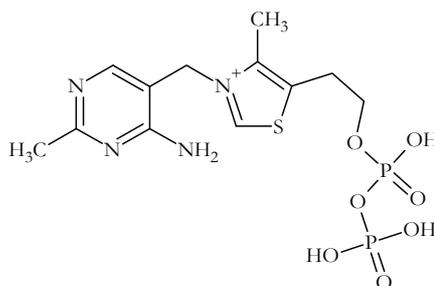
**Figura 8.1** Struttura della tiamina

Essa si trova negli alimenti sia in forma libera (Fig. 8.1), sia come estere pirofosforico (Fig. 8.2) legato ad una proteina. Nelle tecniche analitiche d'uso corrente e nelle tabelle di

composizione degli alimenti non si fa alcuna distinzione fra le due forme.

In linea generale è presente in elevate quantità (0.1-10 mg per 100 g) in alimenti ricchi di carboidrati o comunque associati ad un elevato grado di metabolismo glucidico nel materiale vivente di origine. Particolarmente ricchi di tale vitamina sono i legumi ed il germe dei cereali mentre negli alimenti di origine animale le maggiori concentrazioni si riscontrano nel fegato e nei tessuti muscolari.

La tiamina pirofosfato (TPP) è il gruppo prostetico di molti enzimi che catalizzano la decarbossilazione ossidativa degli  $\alpha$ -chetoacidi, tra i quali ricordiamo l'acido piruvico e l'acido  $\alpha$ -chetoglutarico, che compaiono come intermedi nel ciclo di Krebs (importante tappa del catabolismo cellulare) e nella reazione transchetolasica nel ciclo dei pentosi fosfato (importante per la produzione di NADPH e di ribosio 5'-fosfato). Vi sono inoltre prove che la tiamina, probabilmente come pirofosfato, giochi un ruolo fisiologico a livello del sistema nervoso attraverso meccanismi tuttavia ancora non ben chiariti.

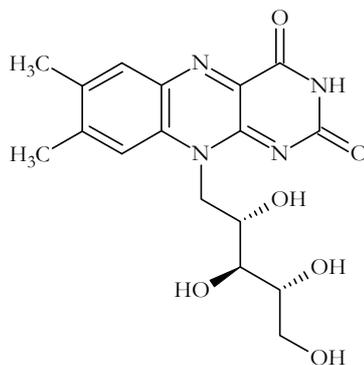


**Figura 8.2** Struttura della tiamina pirofosfato, TPP

La vitamina B<sub>1</sub> è termolabile: resiste discretamente al riscaldamento in ambiente acido ma a pH superiori a 6 trattamenti a caldo, ancorché non estremi come quelli che si verificano nelle fasi di inscatolamento di un alimento, provocano significativi decrementi della sua concentrazione.

### 8.1.2 Riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>)

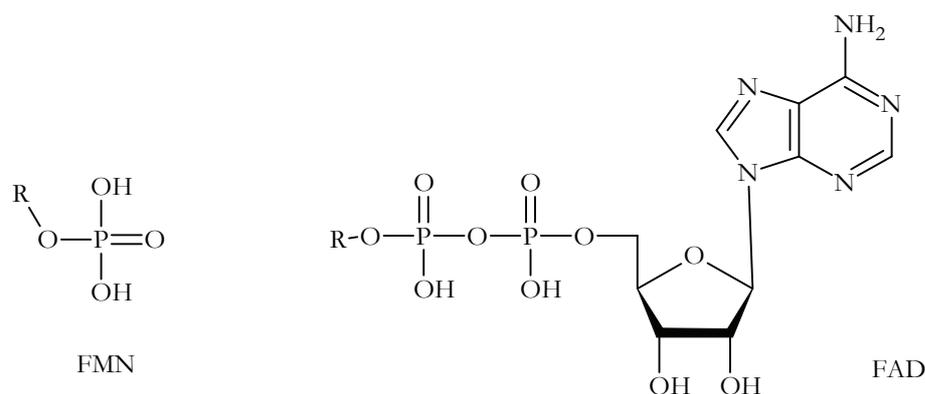
Da un punto di vista strutturale la riboflavina è costituita da un nucleo di isoallosazina a cui è legata una catena laterale di ribitolo (Fig. 8.3).



**Figura 8.3** Struttura della riboflavina

In seguito all'assorbimento a livello intestinale la vitamina B<sub>2</sub> viene trasportata nel sangue ed ivi legata ad alcune proteine plasmatiche (albumina ed altre globuline). Dal sangue essa raggiunge il fegato ed altri tessuti dove viene successivamente convertita in flavina mononucleotide (FMN) e flavina adenina dinucleotide (FAD). Le due forme coenzimatiche (Fig. 8.4) rappresentano i gruppi prostetici dei cosiddetti enzimi flavinici, i quali svolgono un ruolo chiave in varie reazioni di ossidoriduzione del metabolismo dei carboidrati, delle proteine e dei lipidi tra cui ricordiamo la decarbossilazione ossidativa del piruvato, l'ossidazione di acidi grassi ed aminoacidi ed il trasporto degli elettroni durante la fosforilazione ossidativa. Analogamente alla tiamina, la vitamina B<sub>2</sub> è rintracciabile, almeno in piccole quantità, in quasi tutti i tessuti biologici. E' particolarmente abbondante nella carne (0.2 mg per 100 g) e - specialmente - nel fegato (3.0 mg per 100 g). Al contrario della tiamina, i cereali non ne sono particolarmente ricchi mentre lo sono il latte e il formaggio.

R = Riboflavina



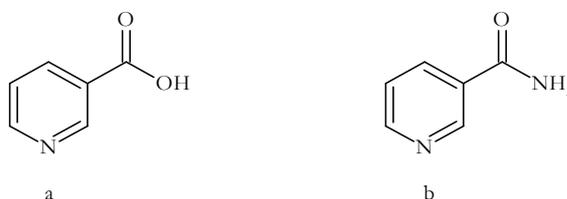
**Figura 8.4** Struttura di FMN e FAD

La riboflavina è una delle vitamine più stabili e le condizioni alcaline che la degradano sono raramente presenti negli alimenti. Un fattore importante che ne causa la degradazione è la luce: esso è trascurabile per alimenti opachi come la carne, mentre per il latte può avere effetti rilevanti. Il prodotto principale della degradazione della riboflavina è il lumicromo, e in condizioni neutre o alcaline si può avere anche la formazione di lumiflavina. Entrambi i prodotti di degradazione hanno un potere ossidante superiore a quello della stessa riboflavina e catalizzano massicce perdite di acido ascorbico (vitamina C).

### 8.1.3 Niacina (vitamina B<sub>3</sub>, PP)

La niacina, nome collettivo che si riferisce tanto all'acido nicotinico che alla nicotinammide (Fig 8.5), è considerata un membro del gruppo B, anche se la definizione di vitamina B<sub>3</sub> è ormai superata. Nei sistemi viventi l'anello piridinico è presente nella nicotina-adenina dinucleotide NAD e nel suo derivato fosfato, NADP. Il NAD è presente come gruppo prostetico in pochi enzimi come la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, ma

le principali funzioni di NAD e NADP nelle cellule consistono nel trasporto di elettroni nei sistemi respiratori.



**Figura 8.5** Struttura dell'acido nicotinico (a) e della nicotinammide (b)

La niacina è presente in piccole quantità in tutte le matrici biologiche, ma la carne ne è la fonte più ricca nella maggior parte dei regimi alimentari. Latte, latticini e uova ne contengono quantità esigue mentre legumi, cereali integrali ne sono più ricchi.

L'uomo ha la capacità di produrre niacina attraverso una via metabolica che parte dall'amminoacido triptofano. L'efficacia di questa via metabolica è molto bassa, per via della competizione con la sintesi proteica. Occorrerebbero infatti 60 mg di triptofano per sostituire 1 mg di acido nicotinico.

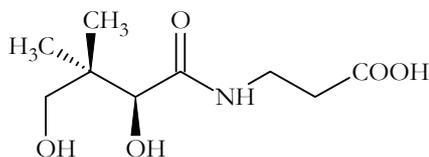
La niacina è stabile nella maggior parte delle condizioni di cottura e solo le perdite per lisciviazione sono significative. Durante la cottura dei cereali può aumentare la sua disponibilità specie se si rende leggermente alcalino il mezzo mediante l'utilizzo di lievito in polvere. Tra tutte le vitamine idrosolubili essa è da considerarsi la più stabile.

#### 8.1.4 Acido pantotenico (vitamina B<sub>5</sub>)

L'acido pantotenico è costituito da una molecola di  $\beta$ -alanina legata, tramite un legame carbamidico, ad un derivato dell'acido butirrico, l'acido pantoico (Fig. 8.6).

L'acido pantotenico è otticamente attivo ma solo il suo isomero destrogiro ha funzione

vitaminica.



**Figura 8.6** Struttura dell'acido pantotenico

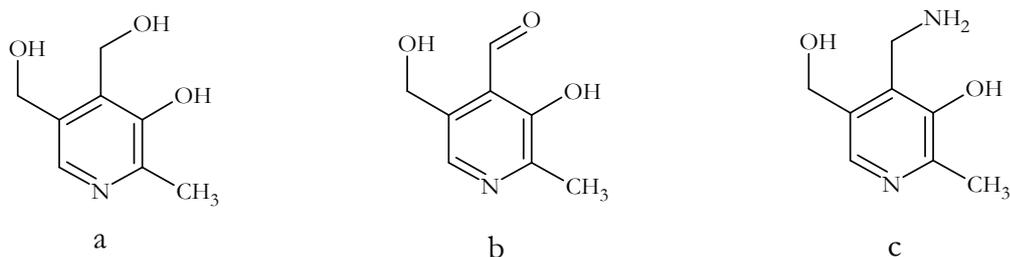
È un costituente del coenzima A (CoA), la cui funzione fondamentale consiste nel trasporto di gruppi acilici e acetilici e, proprio per questo, svolge un ruolo primario in vie metaboliche importanti quali la  $\beta$ -ossidazione e la sintesi degli acidi grassi.

L'acido pantotenico è inoltre un componente della fosfopanteteina la quale, legandosi ad un residuo amminoacidico di serina della proteina trasportatrice di gruppi acili (ACP), costituisce un sito di acilazione degli intermedi nella biosintesi degli acidi grassi. Le sue principali fonti sono il lievito di birra, il fegato, i reni, i semi di sesamo e la gelatina reale. In minore quantità si trova nei semi di girasole, nella soia, nelle uova e nei legumi.

La vitamina B<sub>5</sub> è molto resistente a luce, aria, calore a pH compresi tra 5 e 7. In genere, negli alimenti si verificano perdite di acido pantotenico solo in seguito a cotture prolungate.

### 8.1.5 Piridossina (vitamina B<sub>6</sub>)

La vitamina B<sub>6</sub> si presenta sotto tre diverse forme strutturali che prendono il nome di piridossina, piridossale e piridossamina: esse consistono in derivati piridinici che si differenziano tra di loro per i diversi gruppi chimici che si trovano in posizione *para* rispetto all'atomo di azoto eterociclico (Fig. 8.7).



**Figura 8.7** Struttura di piridossina (a), piridossale (b) e piridossamina (c)

Negli alimenti di origine vegetale le forme prevalenti sono le prime due, mentre nei tessuti animali sono le ultime due. Tuttavia le tre forme della vitamina si possono trovare negli alimenti anche sotto forma di esteri 5'-fosfato, i quali vengono sottoposti nell'organismo ad un processo di idrolisi energia-dipendente per ottenere le forme non fosforilate. La piridossina è particolarmente abbondante nel lievito, nel germe di cereali, nella carne, nel fegato, nelle uova, nel latte, nel pesce e nella frutta.

In seguito all'assorbimento a livello intestinale, la piridossina passa nel sangue dove si lega all'albumina o all'emoglobina. Gran parte della vitamina viene depositata nel fegato dove viene immagazzinata, previa fosforilazione, e da esso viene rilasciata in forma defosforilata e ceduta ai tessuti.

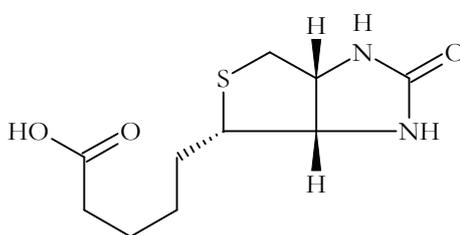
All'interno delle cellule la piridossina viene convertita in piridossale e/o piridossamina che, una volta fosforilate, costituiscono la forma biologicamente attiva della vitamina B<sub>6</sub>, agendo come coenzimi e partecipando al metabolismo degli amminoacidi e di altri composti. La vitamina B<sub>6</sub> non immagazzinata viene eliminata con le urine dopo essere stata ossidata.

Nell'intervallo di pH tipico degli alimenti, la piridossina è molto resistente al calore. Invece le altre due forme sono leggermente meno stabili ma, come per tutte le vitamine

idrosolubili, le principali perdite avvengono per lisciviazione, durante la cottura e durante altre trasformazioni alimentari.

### 8.1.6 Biotina (vitamina B<sub>8</sub>, H)

Strutturalmente la biotina presenta due anelli tra loro condensati: uno tiofenico, a cui è legata una catena laterale di acido valerianico ed uno imidazolico (Fig. 8.8).



**Figura 8.8** Struttura della biotina

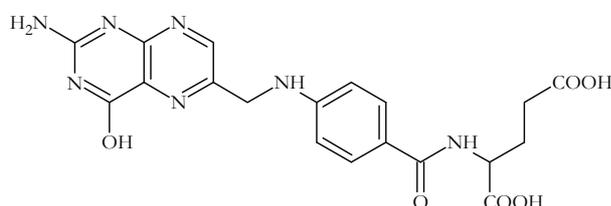
Essa è presente in piccole quantità sia nelle matrici di origine animale che in quelle di origine vegetale. La sola carenza nota è associata ad un consumo eccessivo di uova crude: l'albumine contiene infatti una proteina che è in grado di legare la biotina, che viene denaturata nel corso della cottura.

Questa vitamina è contenuta negli alimenti sia in forma libera che legata alle proteine. Ancora non sono ben noti i meccanismi di assorbimento. Si ritiene che la scissione dalle proteine a cui essa è legata avvenga per opera di una biotinasi secreta nel succo pancreatico. Pare che la biotina, una volta assorbita e passata nel sangue, venga veicolata da albumina ed  $\alpha$  e  $\beta$ -globuline. Non è chiaro se esista anche una proteina di trasporto specifica. La biotina svolge inoltre il ruolo di cofattore di diverse carbossilasi ATP-dipendenti.

La vitamina B<sub>8</sub> è solubile in acqua ed in questo stato è resistente al calore, alle basi ed agli acidi; si decompone per azione della luce ultravioletta e di forti ossidanti.

### 8.1.7 Acido folico (vitamina B<sub>9</sub>)

Dal punto di vista chimico l'acido folico consiste nell'acido pteroilglutammico il quale è formato dall'acido pterico, dato dall'unione della 6-metilpterina e dell'acido p-aminobenzoico (PABA), unito mediante legame ammidico all'acido glutammico (Fig. 8.9).

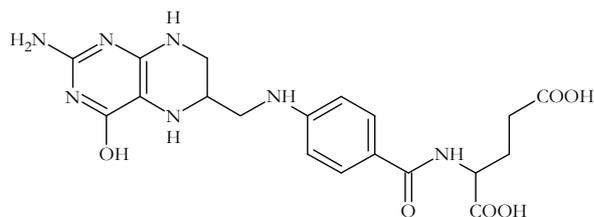


**Figura 8.9** Struttura dell'acido folico

E' molto abbondante negli alimenti dove si trova prevalentemente sotto forma di acido pteroilmonoglutammico (ovvero con una sola molecola di acido glutammico legata al PABA) e solo in minima parte come acido pteroilpoliglutammico. Le sue fonti principali sono il rene, il fegato, le verdure, i legumi e le uova.

I poliglutammati non possono essere assorbiti e per tale ragione vengono convertiti in acido pteroilmono- o diglutammico, tramite un enzima presente nell'intestino.

La forma attiva della vitamina è il tetraidrofolato (FH<sub>4</sub>), il quale viene sintetizzato attraverso due reazioni successive di riduzione della 6-metilpterina, catalizzate dall'enzima tetraidrofolato reduttasi.

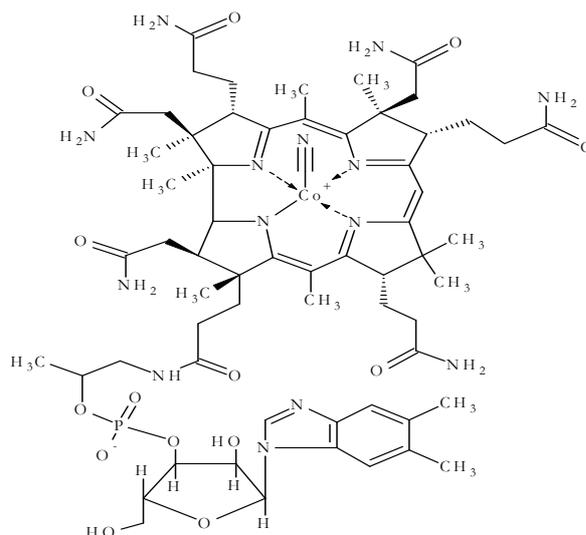


**Figura 8.10** Struttura del tetraidrofolato

La forma ridotta dell'acido folico viene trasportata nel sangue grazie al legame con proteine specifiche. La carenza di acido folico può causare alterazioni della cute, disturbi nervosi e stomatite. Con la cottura parte di questa vitamina viene persa.

### 8.1.8 Cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>)

La struttura di questa vitamina si differenzia da quella delle altre in quanto essa è caratterizzata dalla presenza di uno ione  $\text{Co}^{+3}$  posto all'interno di un complesso sistema ciclico (corrina) che lo coordina con quattro atomi di azoto. Lo ione metallico completa infine il suo interno di coordinazione ottaedrico con un ulteriore legante assiale (una molecola di 5,6-dimetilbenzimidazolo ribonucleotide) e con un gruppo (R) di diversa natura, che ne caratterizza le diverse forme in cui essa viene assunta dagli organismi (idrossicobalamina, gruppo -OH) o le forme dotate di attività biologica (metilcobalamina e 5'-deossiadenosilcobalamina). In figura 8.11 è riportata a titolo di esempio la struttura della cianocobalamina, un artefatto di sintesi (è più stabile delle altre forme) che può essere convertito dall'organismo nelle forme biologicamente utili. Le fonti di vitamina B<sub>12</sub> sono soprattutto di origine animale, in particolare a livello di organi quali il fegato. Gli alimenti di origine vegetale non contengono cobalamina, tranne nel caso in cui abbiano subito una contaminazione microbica.

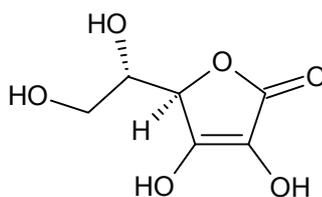


**Figura 8.11** Struttura della cianocobalamina

La vitamina B<sub>12</sub> viene sintetizzata in natura solo da alcune specie di batteri ed in alcune alghe.

### 8.1.9 Acido ascorbico (vitamina C)

L'acido ascorbico presenta nella sua struttura chimica un gruppo endiolico che coinvolge il C<sub>2</sub> e il C<sub>3</sub>. La presenza di tale gruppo rende la vitamina C un forte riducente. Essa si ossida facilmente in presenza di ossigeno e metalli, per dare acido deidroascorbico, l'altra forma biologicamente attiva. Esistono due diverse forme enantiomeriche di cui solo una possiede attività biologica, l'enantiomero (5R)-5-[(1S)-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossifurano-2 (5H)-one.



**Figura 8.12** Struttura dell'acido ascorbico

La vitamina C è sintetizzata dalla maggior parte di piante e animali a partire dal glucosio. L'uomo la deve invece introdurre nel proprio organismo attraverso l'alimentazione, poiché non possiede l'enzima (L-gulonolattoneossidasi) che catalizza l'ultima tappa della via metabolica che dal glucosio porta all'acido ascorbico.

Le sue fonti alimentari di maggior rilievo sono le verdure fresche e la frutta (agrumi, kiwi), mentre si trova in minor quantità in alimenti di origine animale quali il fegato e il latte.

L'acido ascorbico si trova nel plasma in forma libera o legato ad un'albumina; si ritrova in maggiore concentrazione nel fegato, nei reni, nel cuore e nel cervello.

Esso ha azione disintossicante e favorisce la degradazione delle sostanze esogene e dei farmaci; svolge un ruolo di protezione contro il cancro allo stomaco e all'esofago, inibendo la formazione di nitrosammine a partire dai nitriti che si introducono con la dieta; rafforza le difese immunitarie e la sua azione antiossidante previene la degradazione di altre vitamine (A, E, B<sub>1</sub> e B<sub>9</sub>).

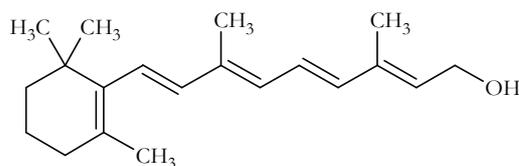
La vitamina C contenuta negli alimenti può essere persa in grandi quantità, se questi vengono sottoposti a cottura prolungata, se esposti all'aria o conservati in contenitori metallici.

### **8.1.10 Vitamine liposolubili**

La struttura delle quattro vitamine liposolubili (A, D, E e K) è costituita da anelli a base idrocarburica e lunghe catene laterali alifatiche. Tutte queste vitamine sono quindi tendenzialmente idrofobe, sebbene ciascuna di esse possieda almeno un gruppo polare (solitamente alcolico). Si possono accumulare nel fegato e nei lipidi di deposito per poter essere utilizzate nel momento in cui l'organismo ne ha bisogno; proprio per la capacità di quest'ultimo di accumulare le vitamine liposolubili, esse possono dar luogo a fenomeni di

ipervitaminosi ove venga superata una certa soglia di concentrazione nell'individuo. Si trovano principalmente nel fegato, nel latte, nel burro e nelle uova.

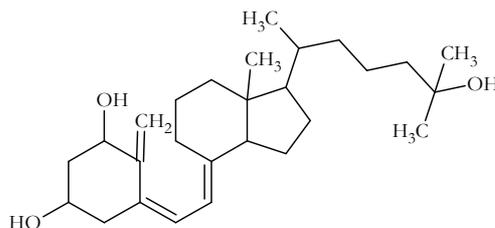
Nota anche come retinolo, la vitamina A è una molecola lipidica costituita da 15 atomi di carbonio (Fig. 8.13) ottenuta dagli alimenti per scissione ossidativa del  $\beta$ -carotene, una sostanza giallo-arancio che si trova nella frutta e nella verdura.



**Figura 8.13** Struttura del retinolo

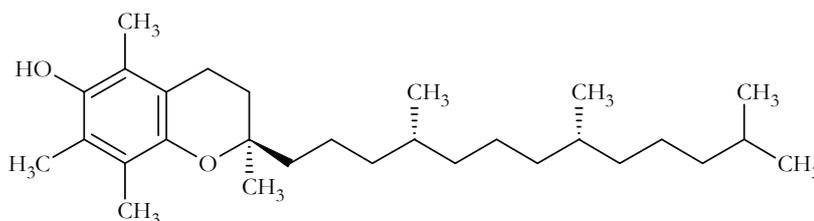
Si conoscono tre forme di vitamina A, distinte in base allo stato di ossidazione del gruppo funzionale terminale: retinolo (alcol), retinale (aldeide) e acido retinico. Retinolo e acido retinoico sono coinvolti nell'espressione genica durante il differenziamento cellulare. Il retinale è gruppo prostetico della rodopsina, una proteina fondamentale per la funzione visiva.

Il termine vitamina D è riferito a un gruppo di lipidi fra loro correlati e necessari per la formazione delle ossa. Questa vitamina regola infatti, il metabolismo del calcio aiutando lo scheletro a formarsi correttamente. Per tale ragione, la sua carenza provoca rachitismo nei bambini e osteomalacia nell'adulto. La forma attiva della vitamina D è l'1,25-diidrossicolecalciferolo (Fig. 8.14), che ha la funzione di regolare l'utilizzo del  $\text{Ca}^{2+}$  nell'uomo.



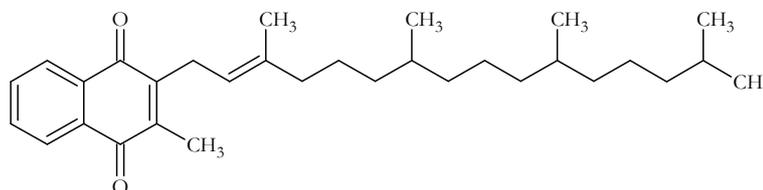
**Figura 8.14** Struttura dell'1,25-diidrossicolecalciferolo

Il termine vitamina E comprende una serie di composti isoprenoidi costituiti da un nucleo idrossicromico collegato ad una catena carboniosa satura. Essi differiscono per il numero di sostituenti metilici sul nucleo. La forma più comune e attiva è l' $\alpha$ -tocoferolo (Fig. 8.15).



**Figura 8.15** Struttura dell'  $\alpha$ -tocoferolo

Per quanto riguarda infine la vitamina K, dal punto di vista strutturale essa presenta un anello naftochinonico legato ad una catena alifatica di tipo isoprenoide (Fig. 8.16).



**Figura 8.16** Struttura della vitamina K

E' molto diffusa negli alimenti di origine vegetale, viene assorbita nell'intestino in

presenza di bile e immessa nei vasi linfatici; viene eliminata per via urinaria sotto forma ossidata. La sua principale funzione è legata alla coagulazione del sangue, e la sua carenza provoca emorragie.

## 8.2 DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI VITAMINE IDROSOLUBILI NEGLI ALIMENTI

Il punto critico dei metodi analitici volti alla determinazione contemporanea delle vitamine idrosolubili nei prodotti alimentari è dato dall'estrazione. E' necessario infatti adottare le condizioni ottimali per la contemporanea liberazione di analiti molto diversi fra loro, dalla medesima matrice.

La precipitazione delle proteine può essere eseguita tramite trattamento con acetato e fosfotungstato di zinco<sup>112</sup>, acido perclorico<sup>113</sup> o acido tricloroacetico<sup>114</sup>, seguito da centrifugazione o filtrazione. Il trattamento è ottimo per bevande fortificate ma insoddisfacente per alimenti come i cereali, dove quasi tutte le vitamine sono in forma non libera.

Esiste un metodo che prevede idrolisi acida (HCl 0.1 N) e trattamento con taka-diastrasi per l'estrazione delle vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>6</sub> (piridossina e piridossale), nicotinammide e acido folico dai cereali<sup>115</sup>. Per l'estrazione delle vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>6</sub> si può ricorrere, in luogo dell'idrolisi acida, all'azione di tre enzimi<sup>116</sup>:  $\alpha$ -amilasi, papaina e fosfatasi.

---

<sup>112</sup> Zafra-Gomez A, Garballo A, Morales J.C., Garcia-Ayuso L.E., J Agric Food Chem 54, 4531-4536, (2006)

<sup>113</sup> Chase G. W. Jr., Landen W.O., Eitenmiller R.R., Soliman A.G.M., J AOAC Int 75, 561-565, (1992)

<sup>114</sup> Albala-Hurtado S., Veciana-Noigues M.T., Izquierdo-Pulido M., Marinè-Font A., J Chromatogr A, 778, 247-253, (1997)

<sup>115</sup> Vinas P., Lopez-Erroz C., Balsalobre N., Hernandez-Cordoba M., J Chromatogr A, 1007, 77-84, (2003)

<sup>116</sup> Ndaw S., Bergaentzle D., Aoudè-Werner D., Hasselman C., Food Chem 71, 129-138, (2000)

Studi recenti<sup>117</sup> hanno dimostrato che esiste la possibilità di separare le vitamine idrosolubili su colonne a scambio ionico. Come eluente per la separazione di niacina, piridossina e riboflavina è stato usato il sodio dioctilsolfosuccinato.

### 8.3 VITAMINE IDROSOLUBILI NEL MIELE

#### 8.3.1 Stato dell'arte e obiettivi

L'obiettivo del presente lavoro consiste nello sviluppo di una metodica RP-HPLC finalizzata alla determinazione delle vitamine idrosolubili presenti in forma libera nel miele. Dai pochi dati attualmente disponibili in letteratura si evince infatti che esse siano le uniche presenti, ancorché in concentrazioni non certo elevate, in tale matrice. La loro origine pare essere di natura pollinica. Infatti le vitamine riscontrabili nel miele sono le stesse che, in concentrazioni ben più elevate, sono riscontrabili anche nei granuli pollinici. A testimonianza di ciò, alcuni studi hanno dimostrato che operazioni di filtrazione del miele determinano un corrispondente decremento del contenuto vitaminico<sup>118</sup>. Per quanto riguarda la determinazione analitica delle vitamine nel miele la letteratura scientifica offre realmente pochissimi spunti. In particolare possiamo affermare che a oggi le vitamine sono state determinate in tale alimento attraverso metodi microbiologici<sup>119</sup>, titrimetrici (per il solo acido ascorbico<sup>120</sup>), e cromatografici (per l'acido ascorbico<sup>121,122</sup> e

---

<sup>117</sup> Woolard D.C., Indyk H.E., J AOAC Int 85, 945-951, (2002)

<sup>118</sup> Haydak M.H., Palmer L.S., Tanquary C., Vivino E., Journal of Nutrition, 319-320, (1943)

<sup>119</sup> Kitzes G., Schuette A., Elvehjem A., Journal of Nutrition, 241-250, (1943)

<sup>120</sup> Matei N., Birghila S., Dobrinas S., Capota P., Acta Chim. Slov., 51, 169-175, (2004)

<sup>121</sup> Castro R.N., Azeredo L. C., Azeredo M.A.A., de Sampaio C.S.T., J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 24 (7), 1015-1020, (2001)

per la riboflavina<sup>123</sup>). Non è al momento disponibile alcun contributo scientifico relativo alla determinazione simultanea delle vitamine in questa matrice. Il metodo proposto permette la quantificazione di sei diverse vitamine idrosolubili: acido ascorbico, tiamina, riboflavina, acido nicotinico, acido pantotenico e acido folico<sup>124</sup>.

### 8.3.2 Campioni

Per lo studio da noi svolto, sono stati presi in esame 28 campioni di miele di diverse origini botaniche e geografiche. I campioni sardi sono stati ottenuti direttamente da apicoltori e sempre conservati, subito dopo l'invasettamento, in assenza di luce e ad una temperatura costante di 4°C; analogo destino hanno subito dopo l'acquisto, anche alcuni campioni commerciali (miele di acacia) reperiti in negozi della zona. Prima di ciascuna determinazione analitica, tutti i campioni sono stati sottoposti ad omogeneizzazione mediante mixer Ultra-turrax T18. Le soluzioni sottoposte ad analisi cromatografica sono state preparate secondo la seguente procedura:

- si pesano accuratamente 10 g di miele e si solubilizzano in 5 mL di acqua ultrapura;
- si aggiungono 1 mL di NaOH 2 M e 12.5 mL di tampone fosfato 1 M;
- si porta a volume a 25 mL con acqua ultrapura e si conserva al buio in un bagno acqua/ghiaccio.

---

<sup>122</sup> Gheldof N., Wang X., Engeseth N. J., J. Agric. Food Chem., 50, 5870-5877, (2002)

<sup>123</sup> J Vinas P., Balsalobre N., Lopez-Erroz C., Hernandez-Cordoba M., J. Agric. Food Chem., 52, 1789-1794, (2004)

<sup>124</sup> Solinas S., Tesi di laurea specialistica in Chimica, Dipartimento di Chimica, Università degli studi di Sassari (A.A. 2008-2009)

### 8.3.3 Analisi RP-HPLC

Stante la pressoché totale assenza in letteratura di metodi analitici per la determinazione simultanea di vitamine libere in mieli, è stato inizialmente preso in considerazione un metodo cromatografico proposto per la determinazione di vitamine idrosolubili in integratori<sup>125</sup>. Si tratta di un metodo diretto, a fase inversa, con rivelazione UV che fa uso di una colonna C<sub>18</sub>. Il metodo prevede l'impiego di diverse lunghezze d'onda per ottimizzare la risposta del detector in funzione delle diverse caratteristiche chimiche degli analiti. E' stata quindi verificata l'applicabilità delle condizioni riportate dal lavoro di Heudi agli standard scelti per il nostro studio utilizzando la strumentazione da noi in possesso. Nelle condizioni operative suggerite in tale lavoro è stata constatata la separazione dei sei analiti da noi prescelti a livello della linea di base. La successiva procedura di ottimizzazione del metodo ha riguardato: a) la scelta delle lunghezze d'onda (254 nm per acido ascorbico, acido nicotinico e tiamina; 210 nm per acido pantotenico, acido folico e riboflavina), b) il flusso e c) la durata totale della corsa.

La seconda fase del lavoro ha riguardato il trasferimento del metodo a campioni reali di miele. Sono stati quindi acquisiti i cromatogrammi delle soluzioni di miele ottenute eseguendo iniezioni di soluzioni di miele ottenute con la procedura descritta nel paragrafo precedente, attraverso opportuni filtri in PVDF, e si è proceduto con l'identificazione delle sei vitamine tramite aggiunte di aliquote di soluzioni a concentrazione nota di standard. Il programma di eluizione è stato ottimizzato al fine di ottenere per ciascuna delle vitamine un picco perfettamente risolto a livello della linea di base. Le condizioni operative finali sono riportate in Tabella 8.1.

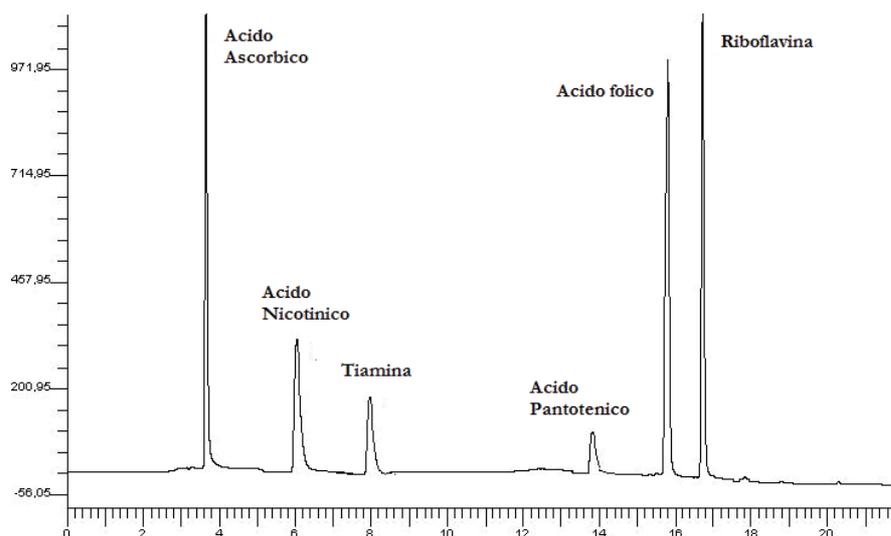
---

<sup>125</sup> Heudi O., Kilinc T., Fontannaz P., J Chromatogr A, 1070, 1-2, 49-56 (2005)

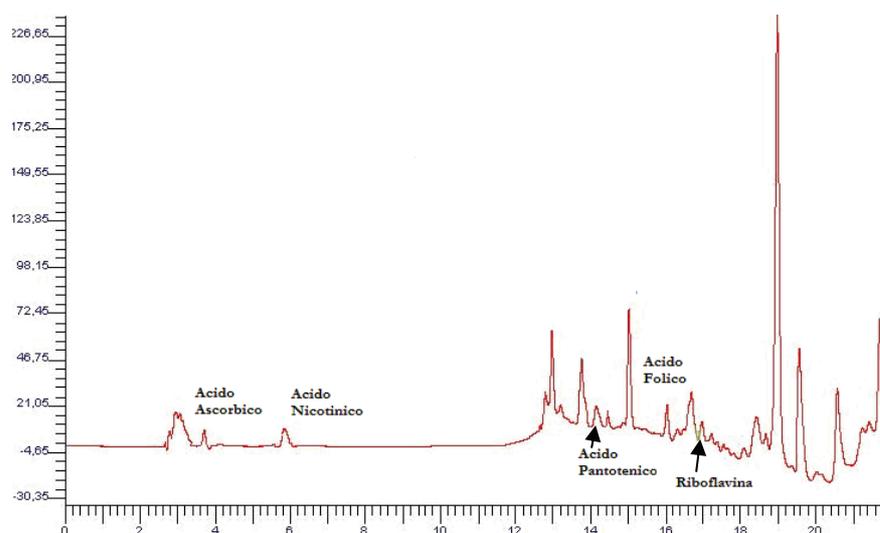
**Tabella 8.1** Condizioni operative finali

<b>RP-HPLC</b>	
<b>Strumento</b>	Perkin Elmer Series 200 Pump
<b>Loop di Campionamento</b>	20 $\mu$ L
<b>Colonna C<sub>18</sub></b>	Alltima C <sub>18</sub> 5 $\mu$ m (4.6 mm x 20 mm)
<b>Precolonna</b>	Alltima C <sub>18</sub> (4.6 mm x 20 mm)
<b>Rivelatore UV-Vis</b>	Perkin-Elmer Series 200 UV-Vis $\lambda = 254$ nm da 0 a 11 min $\lambda = 210$ nm da 11 a 22 min
<b>Eluenti</b>	A = Acido trifluoroacetico, TFA, 0.025% (v/v) in Acqua B = Acetonitrile
<b>Sistema di eluizione in gradiente</b>	A/B = 100/0 per 5 min A/B = 75/25 in 6 min A/B = 55/45 in 8 min A/B = 60/40 per 1 min A/B = 100/0 in 2 min
<b>Durata totale</b>	22 min
<b>Flusso</b>	1 mL min <sup>-1</sup>

Le condizioni relative al metodo finale riportato in tabella, hanno permesso di ottenere picchi completamente risolti per tutte le vitamine da noi prese in considerazione e che è stato possibile quantificare. In figura 8.17 è riportato il cromatogramma di una miscela di standard a 50 ppm mentre in figura 8.18, è riportato il cromatogramma di un campione di miele di eucalipto analizzato con le condizioni del metodo finale.



**Figura 8.17** Cromatogramma di un mix di standard a 50 ppm



**Figura 8.18** Cromatogramma di un campione di miele di eucalipto

Il cromatogramma riportato in figura 8.18 evidenzia l'assenza del picco relativo alla tiamina: tale situazione è peraltro comune a tutti i campioni da noi analizzati nello studio.

### 8.3.4 Analisi quantitativa

Per l'analisi quantitativa è stato adottato il metodo della calibrazione esterna.

Giornalmente è stato preparato uno standard a 100 ppm degli analiti e da questo sono

state ottenute per diluizione, le soluzioni a concentrazione nota utilizzate per la costruzione di una retta di calibrazione. In Tabella 8.2 sono riportati i dati relativi alla concentrazione di vitamine idrosolubili nel miele.

**Tabella 8.2** Concentrazione delle vitamine idrosolubili nei campioni di miele (mg/kg)

Campione	Origine Botanica	RIB	NIA	PAN	FOL	ASC
1	Eucalipto	<0.25	<0.75	<1.75	6.6±0.3	5.8±0.5
2	Eucalipto	1.49±0.03	2.2±0.7	<1.75	5.4±0.2	2.0±0.3
3	Eucalipto	<0.75	2.86±0.06	5.8±0.7	4.32±0.08	3.0±0.4
4	Eucalipto	2.90±0.08	2.1±0.3	4.4±0.4	4.54±0.02	2.85±0.04
5	Eucalipto	1.9±0.02	3.4±0.3	4.73±0.02	6.92±0.01	2.3±0.1
6	Sulla	<0.25	4.9±0.6	4.73±0.09	<0.50	1.5±0.4
7	Sulla	<0.25	5.8±0.8	6.5±0.4	<0.15	0.84±0.09
8	Sulla	<0.75	3.8±0.2	4.4±0.6	<0.50	1.5±0.7
9	Agrumi	2.0±0.1	27±2	7±1	<0.50	2.0±0.4
10	Agrumi	2.6±0.2	27.80±0.04	8.09±0.07	<0.50	1.6±0.4
11	Agrumi	1.86±0.05	22±1	<1.75	<0.15	3±2
12	Acacia	<0.25	6±1	<1.75	<0.50	1.015±0.005
13	Acacia	<0.25	4.29±0.02	<1.75	<0.15	1.3±0.2
14	Asfodelo	4.8±0.2	6.91±0.02	18±1	3±1	4±2
15	Asfodelo	4.6±0.2	6.71±0.05	12±1	<0.15	2±1
16	Asfodelo	1.7±0.2	3.7±0.1	19±6	<0.15	1.0±0.1
17	Cardo	3.03±0.01	6.6±0.7	<1.75	1.54±0.08	1.4±0.2
18	Cardo	9.2±0.2	6.8±0.3	<1.75	2.3±0.2	1.9±0.1
19	Cardo	<0.25	12.3±0.2	<1.75	<0.50	3.5±0.2
20	Corbezzolo	2.1±0.6	12.4±0.6	<1.75	0.52±0.03	3.08±0.02
21	Corbezzolo	<0.25	<0.75	28±6	<0.50	4.4±0.8
22	Corbezzolo	<0.25	<0.75	<0.58	<0.15	4±1
23	Lavanda	1.92±0.01	<0.75	<0.58	<0.15	2.2±0.3
24	Lavanda	6±1	5.5±0.7	<0.58	3±2	2.3±0.2
25	Erica	<0.25	5.92±0.01	<0.58	<0.50	2.7±0.9
26	Rosmarino	<0.25	<0.75	<0.58	1.7±0.2	1.5±0.2
27	Tiglio	<0.25	7.0±0.3	<0.58	1.28±0.05	<0.10
28	Millefiori	1.1±0.5	8±1	<0.58	1.8±0.3	<0.10

In Tabella 8.3 è indicato invece, per ciascuna origine botanica, il contenuto medio di ogni analita determinato.

**Tabella 8.3** Contenuto medio delle vitamine idrosolubili per ogni origine botanica  
(mg/kg)

Origine Botanica	RIB	NIA	PAN	FOL	ASC	Σ
Eucalipto (n=5)	<1.458	<2.262	<3.686	5.6±0.4	3.2±0.7	<16.2
Sulla (n=3)	<0.417	5±1	5.2±0.7	<0.383	1.3±0.8	<12
Agrumi (n=3)	2.2±0.2	26±2	<5.613	<0.383	2±2	<36
Asfodelo (n=3)	3.7±0.3	5.8±0.1	16±6	<1.1	2±2	<28
Acacia (n=2)	<0.25	5±1	<1.75	<0.325	1.2±0.2	<8.5
Lavanda (n=2)	4±1	<3.125	<0.58	<1.575	2.2±0.4	<11.5
Cardo (n=3)	<4.16	8.6±0.8	<1.75	<1.447	2.3±0.3	<18.3
Corbezzolo (n=3)	<0.87	<4.633	<10.11	<0.39	4±1	<20
Erica (n=1)	<0.25	5.92±0.01	<0.58	<0.50	2.7±0.9	<10.0
Rosmarino (n=1)	<0.25	<0.75	<0.58	1.7±0.2	1.5±0.2	<4.8
Tiglio (n=1)	<0.25	7.0±0.3	<0.58	1.28±0.05	<0.10	<9.2
Millefiori (n=1)	1.1±0.5	8±1	<0.58	1.8±0.3	<0.10	<11.6

I dati da noi ottenuti confermano che il miele non è un alimento ricco in vitamine idrosolubili: il valore più elevato relativo alla sommatoria della concentrazioni delle vitamine determinato è inferiore ai 36 mg/kg (osservato per i mieli di agrumi), e il quantitativo totale osservato nel caso del miele di rosmarino è addirittura inferiore a 4.8 mg/kg.

Per ciò che concerne l'abbondanza di ciascun analita, la vitamina C è stata quantificata in quasi tutti i campioni; solo in due mieli (tiglio e millefiori) la sua concentrazione è risultata

essere inferiore all'LoD. L'acido ascorbico pare non essere particolarmente abbondante nel miele: la più alta concentrazione osservata nel nostro studio è pari a  $5.8 \pm 0.5$  mg /kg (campione 1), e il contenuto medio per origine botanica varia da  $1.3 \pm 0.8$  mg/ kg per i mieli di sulla a  $3.2 \pm 0.7$  mg/kg per i mieli di eucalipto.

La presenza della vitamina B<sub>3</sub> è stata rilevata in tutti i campioni oggetto di indagine, anche se in cinque di essi (due di corbezzolo, e uno di eucalipto, lavanda e rosmarino, rispettivamente) la concentrazione è inferiore al limite di quantificazione. Il contenuto di acido nicotinico appare tendenzialmente maggiore rispetto a quello della vitamina C. In particolare, il range di concentrazione osservato per la vitamina B<sub>3</sub> varia da  $2.1 \pm 0.3$  mg/kg a  $27.80 \pm 0.04$  mg /kg, valori riscontrati rispettivamente in un miele di agrumi e un miele di eucalipto. Dai dati ottenuti emerge la possibilità che l'origine botanica possa avere una forte influenza sulla concentrazione di questa vitamina.

L'acido pantotenico è stato quantificato in dodici campioni, ma è stato identificato anche in altri nove mieli. In alcuni casi sono state osservate concentrazioni particolarmente elevate per questa vitamina. Nello specifico, ciò è stato rilevato nel caso dei tre mieli di asfodelo (concentrazione media,  $16 \pm 6$  mg kg).

Infine, l'acido folico e la riboflavina sono stati quantificati in circa metà dei mieli analizzati. Per entrambi la più alta concentrazione osservata è sempre al di sotto dei 10 mg/kg. Ciononostante, la vitamina B<sub>9</sub> è la più abbondante per il miele di eucalipto (concentrazione media  $5.6 \pm 0.4$  mg/kg) e concentrazioni significative di riboflavina sono state determinate nei mieli di asfodelo e di agrumi.

La tiamina, come già accennato in precedenza è risultata assente in tutti i campioni.

### 8.3.5 Validazione

I limiti di rivelabilità e di quantificazione sono stati determinati in accordo con il modello noto come Upper Limit Approach (ULA1)<sup>126</sup>, le cui caratteristiche sono state già ampiamente delineate nei capitoli precedenti. Come mostrato dalla Tabella 8.4, i valori di LoD determinati variano da 0.04 mg/L (vitamina C) a 0.23 mg/L (acido pantotenico), mentre i valori di LoQ variano in un range che va da 0.12 mg/L (vitamina C) a 0.70 mg/L (acido pantotenico).

Per quanto riguarda la linearità, i range di concentrazione esplorati coprono da tre a quattro ordini di grandezza. In tutti i casi, sono stati ricavati valori di coefficienti di correlazione lineare piuttosto buoni che vanno da 0.9929 per la vitamina B<sub>3</sub> ad 1 per la vitamina B<sub>2</sub>.

La precisione è anche stavolta stata valutata in termini di ripetibilità e di riproducibilità. Nel primo caso, sono state eseguite cinque analisi consecutive dello stesso campione di miele. I coefficienti di variazione percentuale per la ripetibilità variano da 2.6% (riboflavina) a 7.6% (acido pantotenico). Nel secondo caso, lo stesso campione di miele è stato analizzato in cinque giorni diversi, nell'arco di un mese. I CV% di riproducibilità ottenuti variano da 3.3% (acido ascorbico) a 18% (acido nicotinico). L'accettabilità dei risultati relativi alla precisione è stata come sempre valutata nei termini del modello proposto da Horwitz<sup>127</sup>.

Infine, attraverso l'esecuzione di prove di recupero è stata eseguita la valutazione dell'esattezza. Tutti i dati relativi alla validazione sono mostrati in Tabella 8.4.

---

<sup>126</sup> Mocak J., Bond A.M., Mitchell S., Schollary G., Pure & Appl Chem 69, 297-328, IUPAC recommendation, document 550/35/87

<sup>127</sup> Horwitz W., Anal Chem 54, 67A-76A (1982)

Tabella 8.4 Validazione

Vitamine	Sensibilità		Linearità		Ripetibilità		Riproducibilità		Bias Recuperi (%±DS)
	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	Range dinamico lineare (mg /L)	R <sup>2</sup>	CV% <sub>exp,r</sub>	HorRat <sub>r</sub>	CV% <sub>exp,R</sub>	HorRat <sub>exp,R</sub>	
TIA	0.46	1.4	0.5-500	0.9999	-	-	-	-	-
RIB	0.10	0.30	0.01-100	1	2.6	0.32	19.8	0.98	100±10
NIA	0.10	0.30	0.05-500	0.9929	6.9	0.76	18	1.06	99±7
PAN	0.23	0.70	0.5-1000	0.9993	7.6	0.91	7.6	0.55	103±7
FOL	0.06	0.20	0.05-100	0.9999	2.9	0.37	12.8	1.00	98±8
ASC	0.04	0.12	0.05-500	0.9989	7.3	0.76	3.3	0.20	104±3

## 8.4 VITAMINE IDROSOLUBILI NELLA GELATINA REALE

### 8.4.1 Stato dell'arte ed obiettivi

La letteratura scientifica fornisce pochi esempi relativi alla determinazione delle vitamine idrosolubili nella gelatina reale. Per molti anni, ed in stretta analogia a quanto riscontrato per il miele, l'unico strumento utilizzato per la determinazione delle vitamine idrosolubili in questa matrice è stato rappresentato dai metodi microbiologici<sup>128</sup>. Nell'ambito dei metodi strumentali citiamo invece un protocollo sviluppato di recente per la determinazione della biotina nella gelatina reale e in altri alimenti mediante cromatografia di affinità. L'estrazione dell'analita avviene mediante trattamento con acido solforico; l'estratto viene poi sottoposto a neutralizzazione con NaOH, filtrazione e successiva diluizione per poi essere sottoposto ad analisi cromatografica<sup>129</sup>.

<sup>128</sup> Vecchi M., Sabatini A., Grazia L., Tini V., Zambonelli C., *Apicoltura*, 4, 139-146 (1988)

<sup>129</sup> Hayakawa K., Katsumata N., Hirano M., Yoshikawa K., Ogata T., Tanaka T., Nagamine T. *J Chromatogr B*, 869, 93-100 (2008)

Recentemente è stato inoltre messo a punto un metodo HPLC per la determinazione simultanea nella gelatina reale delle vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>6</sub>. Tale metodica prevede uno step di pretrattamento del campione volto all'eliminazione della frazione proteica tramite aggiunta di acido tricloroacetico in soluzione acquosa e la successiva separazione cromatografica dei tre analiti su una colonna a fase inversa<sup>130</sup>.

Per il presente lavoro si è scelto inizialmente di focalizzare l'attenzione su sette diverse vitamine idrosolubili: acido ascorbico (C), tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>), acido nicotinico (B<sub>3</sub>), acido pantotenico (B<sub>5</sub>), piridossina (B<sub>6</sub>) e acido folico (B<sub>9</sub>).

#### 8.4.2 Campioni

Sono stati presi in considerazione 9 campioni freschi e 3 campioni liofilizzati contenenti gelatina reale provenienti da origini geografiche diverse. Nel caso dei campioni liofilizzati la gelatina reale si trova miscelata ad altri eccipienti quali amido di riso, zucchero di canna e glicocolle. Tutti i campioni sono stati conservati al buio e ad una temperatura di 4°C immediatamente dopo l'acquisto.

A causa dell'elevata concentrazione di proteine che caratterizza questo alimento, si è reso necessario mettere a punto un protocollo di estrazione degli analiti che permettesse di eliminare la frazione proteica e di idrolizzare il legame fra le vitamine e le proteine.

Prendendo ispirazione da contributi di letteratura<sup>20</sup> si è deciso di trattare il campione come segue:

- si pesa accuratamente 1 g di gelatina reale;
- si aggiungono 4 mL di acido tricloroacetico (TCA) all'8% in acqua;
- si agita la soluzione per 10 min;

---

<sup>130</sup> Presoto A., Rios M., Almeida-Muradian L., J Braz. Chem Soc, 15, 1, 136-139 (2004)

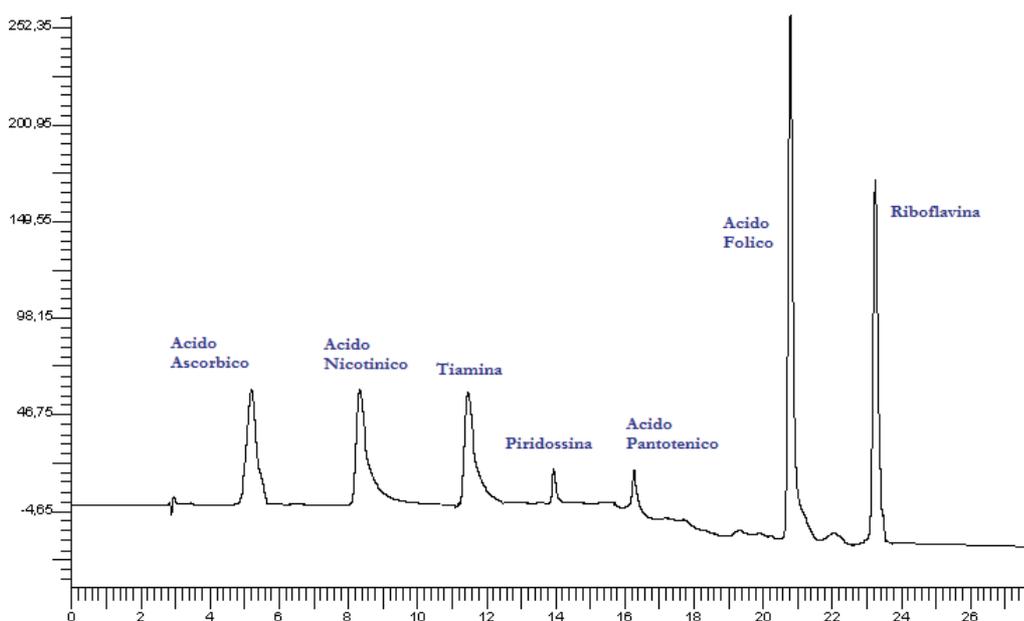
- si sottopone a centrifugazione alla velocità di 2000 rpm per 5 min;
- si prelevano 3 mL di soluzione surnatante e si porta a volume con la soluzione di bianco.

### 8.4.3 Analisi RP-HPLC

Il punto di partenza per lo sviluppo del metodo è stato rappresentato dalla metodica da noi precedentemente sviluppata e validata per la determinazione delle vitamine idrosolubili nel miele. Al fine di ottenere un metodo vantaggioso anche da un punto di vista economico, le condizioni operative di suddetto metodo sono state modificate con lo scopo di utilizzare metanolo in luogo dell'acetonitrile, solvente ben più costoso e sempre meno disponibile sul mercato rispetto al primo. Questo ha determinato un aumento dei tempi della corsa cromatografica a causa della maggiore polarità del metanolo. E' stato svolto inoltre uno studio sugli effetti della concentrazione di acido trifluoroacetico sull'efficienza della separazione e si è stabilito di aumentare la concentrazione di acido trifluoroacetico sino allo 0.05%. Tale modifica ha permesso di ottenere una migliore risoluzione dei picchi. I cambi di lunghezza d'onda sono stati armonizzati ai nuovi tempi di ritenzione degli analiti. Le condizioni cromatografiche ottimizzate sono riportate in Tabella 8.5. In figura 8.19 riportiamo invece, il cromatogramma di una soluzione dei sette analiti, ottenuto operando con le condizioni riportate in Tabella 8.5.

**Tabella 8.5** Condizioni operative finali

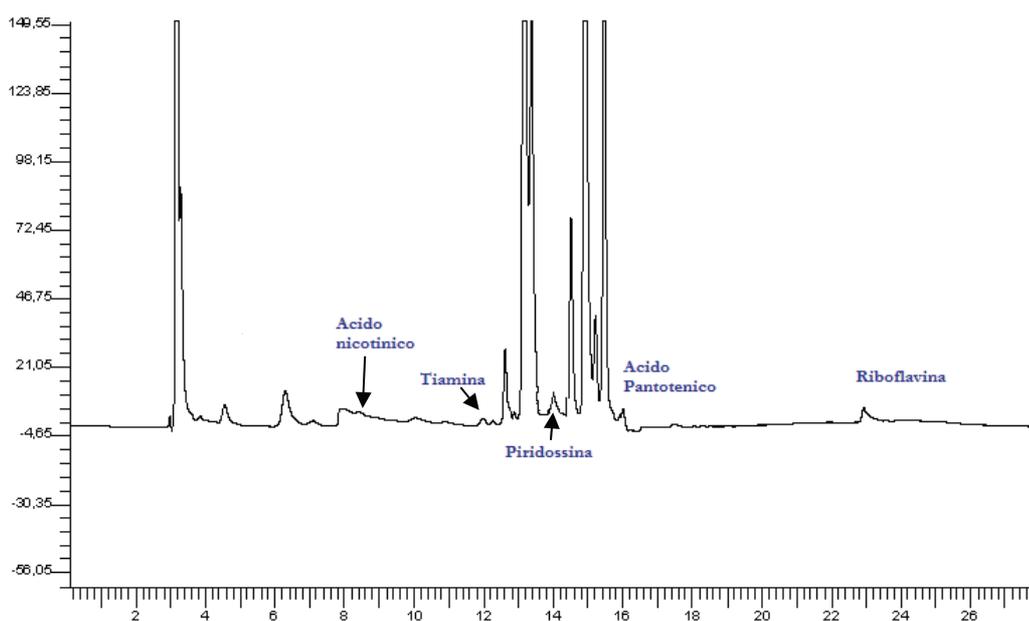
<b>RP-HPLC</b>	
Strumento	Perkin Elmer Series 200 Pump
Loop di Campionamento	20 $\mu$ L
Colonna C <sub>18</sub>	Alltima C <sub>18</sub> 5 $\mu$ m (4.6 mm x 20 mm)
Precolonna	Alltima C <sub>18</sub> (4.6 mm x 20 mm)
Rivelatore UV-Vis	Perkin-Elmer Series 200 UV-Vis $\lambda$ = 254 nm da 0 a 15.7 min $\lambda$ = 210 nm da 15.7 a 18 min $\lambda$ = 275 nm da 18 a 28 min
Eluenti	A = Acido trifluoroacetico, TFA, 0.05% (v/v) in Acqua B = Metanolo
Sistema di eluizione in gradiente	A/B = 100/0 per 5 min A/B = 75/25 in 6 min A/B = 55/45 in 8 min A/B = 60/40 per 1 min A/B = 100/0 in 8 min
Durata totale	28 min
Flusso	1 mL min <sup>-1</sup>



**Figura 8.19** Cromatogramma di un mix di standard a 50 ppm analizzato con le condizioni operative finali

Una volta constatata la perfetta separabilità degli standard a livello della linea di base, sono stati acquisiti i cromatogrammi dei campioni di gelatina reale freschi e liofilizzati, ottenuti mediante la procedura descritta nel paragrafo 8.4.2. Si è proceduto quindi all'identificazione degli analiti mediante aggiunte di aliquote di soluzioni a concentrazione nota di standard.

Eccezion fatta per l'acido nicotinic, per tutti gli altri analiti è stata confermata la presenza di picchi perfettamente risolti a livello della linea di base. Purtroppo nessuna delle prove di modifica sul programma di eluizione o sulla composizione chimica degli eluenti o sulla scelta della fase stazionaria ha permesso di risolvere la vitamina B<sub>3</sub> rispetto ad una serie di interferenti incogniti, e per tale ragione si è deciso di escludere, almeno per il momento, tale analita dallo studio da noi svolto. In figura 8.20 riportiamo l'ingrandimento del cromatogramma di un campione di gelatina reale fresca, nel quale vengono indicati i picchi relativi agli analiti presi in considerazione per questo studio. Come avremo modo di vedere in seguito, il cromatogramma mostra l'assenza dei picchi relativi alle vitamine C e B<sub>9</sub>.



**Figura 8.20** Cromatogramma di un campione di gelatina reale fresca

#### 8.4.4 Analisi quantitativa

Giornalmente è stato preparato uno standard a 100 ppm degli analiti e da questo sono state ottenute, per diluizione, le soluzioni a concentrazione nota utilizzate per la costruzione di una retta di calibrazione. Nella tabelle successive sono indicati i risultati delle analisi quantitative condotte sui campioni freschi e liofilizzati, specificando per ciascuno di essi anche la provenienza. I campioni contrassegnati con la medesima lettera sono stati prodotti dalla stessa azienda. Nel caso dei campioni liofilizzati le concentrazioni sono state calcolate sulla base delle percentuali di gelatina reale indicate in etichetta.

**Tabella 8.6** Contenuto di vitamine idrosolubili nei campioni freschi (mg/kg $\pm$ s, stima della deviazione standard)

CAMPIONE	OR. GEOGR.	ASC	TIA	PIR	PAN	FOL	RIB
A1	San Marino	< LoD	< LoQ	26 $\pm$ 1	90 $\pm$ 20	< LoD	< LoD
A2	San Marino	< LoD	8 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2	160 $\pm$ 10	< LoD	< LoD
B1	Veneto	< LoD	7.3 $\pm$ 0.9	24 $\pm$ 2	65 $\pm$ 4	< LoD	5.9 $\pm$ 0.9
B2	Veneto	< LoD	< LoQ	18 $\pm$ 2	n.d.*	< LoD	< LoQ
C	Lombardia	< LoD	4.7 $\pm$ 0.3	12 $\pm$ 4	24 $\pm$ 4	< LoD	< LoD
D	Toscana	< LoD	< LoD	10 $\pm$ 2	200 $\pm$ 10	< LoD	< LoD
E	Lombardia	< LoD	4.4 $\pm$ 0.4	31.1 $\pm$ 0.2	33 $\pm$ 2	< LoD	< LoD
F	Sardegna	< LoD	< LoQ	48.4 $\pm$ 0.2	58 $\pm$ 2	< LoD	9 $\pm$ 3
G	Sardegna	< LoD	< LoQ	57 $\pm$ 4	120 $\pm$ 20	< LoD	7.5 $\pm$ 0.3
Range di concentrazione		< LoD	< LoD-8	10-57	24-200	<LoD	<LoD-9
Media		< LoD	<3.8	27 $\pm$ 16	94 $\pm$ 62	<LoD	<2.8

**Tabella 8.7** Contenuto di vitamine idrosolubili nei campioni liofilizzati (mg/kg $\pm$ s, stima della deviazione standard)

CAMPIONE	OR. GEOGR.	ASC	TIA	PIR	PAN	FOL	RIB
A3 (30.5%)	San Marino	< LoD	16.1 $\pm$ 0.7	< LoD	103 $\pm$ 3	< LoD	< LoD
H1 (bustine) (8%)	Toscana	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
H2 (pastiglie) (33.3%)	Toscana	< LoD	< LoD	23.6 $\pm$ 0.8	n.d.*	< LoD	< LoD
Range di concentrazione		< LoD	<LoD-16.1	<LoD-23.6	<LoD-103	< LoD	< LoD
Media		< LoD	<5.42	<7.89	<34.49	< LoD	< LoD

\*nd = non determinato a causa dell'esaurimento del campione

I dati da noi raccolti sono stati confrontati con quelli sinora riportati in letteratura, relativi alla concentrazione di vitamine idrosolubili nella gelatina reale fresca (Vecchi e collaboratori<sup>18</sup>, Tab. 8.8). E' opportuno sottolineare che i dati raccolti si riferiscono a determinazioni eseguite con metodi microbiologici. Non è stato invece possibile rinvenire dati riferiti al contenuto di vitamine in campioni di gelatina reale liofilizzata.

I risultati delle analisi da noi condotte mostrano l'assenza, sia nei campioni freschi che in quelli liofilizzati, della vitamina C. Tale risultato viene indirettamente supportato dalla completa mancanza, nella letteratura scientifica pregressa, di dati relativi alla presenza di acido ascorbico in questa matrice.

La tiamina è stata identificata in tutti i campioni di gelatina reale fresca, ad eccezione del campione D, proveniente dalla Toscana. I campioni per i quali è stata possibile la quantificazione della vitamina B<sub>1</sub> mostrano valori di concentrazione che rientrano all'interno del range previsto dalla letteratura pregressa. Per quanto riguarda i campioni

liofilizzati, la determinazione ha fornito valori superiori al detection limit solo in un caso (campione A3). Singolarmente, è possibile notare che tutti i campioni provenienti dalla Toscana sono gli unici che presentano contenuto di tiamina al di sotto del LoD.

**Tabella 8.8** Contenuti minimi e massimi di vitamine riscontrate nella gelatina reale fresca

VITAMINE	VALORI MINIMI (mg/kg)	VALORI MASSIMI (mg/kg)
TIAMINA	1.2	16.67
RIBOFLAVINA	5.3	16.75
PIRIDOSSINA	2.2	54.65
ACIDO FOLICO	0.1	0.55
ACIDO PANTOTENICO	36	230
NIACINA	47	186.80
BIOTINA	1.6	4.4

Anche per quanto attiene la concentrazione di piridossina nei campioni freschi si nota una sostanziale sovrapposizione dei valori da noi ottenuti a quelli riportati in letteratura. Per contro, nei campioni liofilizzati si nota che solo il campione H2 ha concentrazioni di analita superiori al LoD.

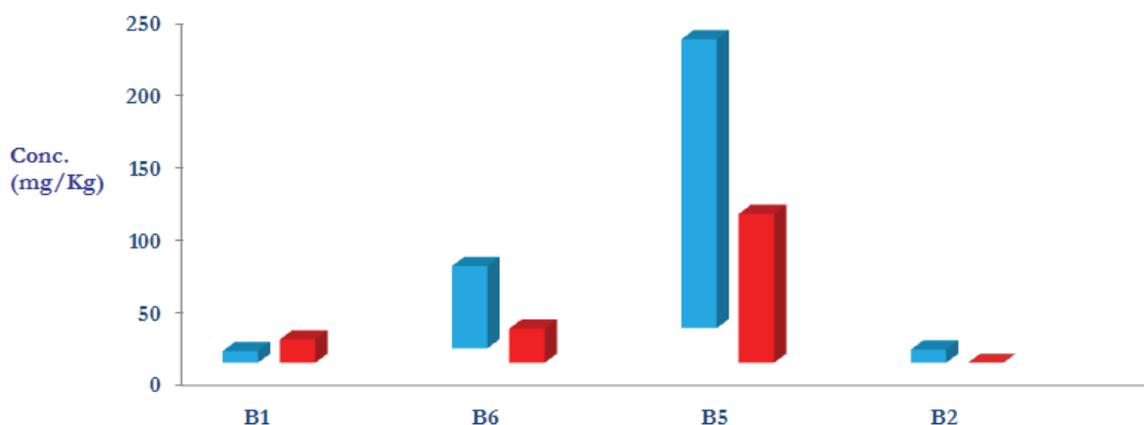
A conferma di quanto riportato in letteratura, l'acido pantotenico è risultato essere, nei campioni freschi, l'analita mediamente più abbondante, con concentrazioni oscillanti da qualche decina a qualche centinaia di ppm. Desta invece qualche sorpresa il fatto che esso, dotato di stabilità relativamente maggiore rispetto ad altre vitamine idrosolubili, abbia fornito valori di concentrazione inferiore al LoD in uno dei campioni liofilizzati (H1).

Analogamente a quanto riscontrato per l'acido ascorbico, anche le concentrazioni di acido folico sono sempre state inferiori al LoD per tutti i campioni, sia freschi che liofilizzati.

Per quanto riguarda la riboflavina, solo nei campioni provenienti dalla Sardegna ed in un campione proveniente dal Veneto sono stati riscontrati valori di concentrazione quantificabili e non lontani dall'estremo inferiore del range riportato in letteratura, e ciò rappresenta una differenza significativa con i risultati ottenuti da determinazioni microbiologiche.

L'esiguo numero di campioni da noi analizzati ci impedisce di poter trarre delle conclusioni che abbiano validità generale. L'analisi di questi primi risultati permette comunque di poter mettere in evidenza alcuni aspetti degni di rilievo.

Innanzitutto pare abbastanza evidente la significativa differenza del contenuto totale in vitamine riscontrabile nei campioni freschi rispetto a quelli sottoposti a procedura di liofilizzazione. I secondi mostrano, rispetto ai primi, un contenuto di vitamine idrosolubili decisamente inferiore. Questo aspetto desta stupore in quanto si presuppone che il processo di liofilizzazione, asportando la quasi totalità dell'acqua, determini un incremento della concentrazione degli altri analiti presenti nella gelatina reale, vitamine incluse. Invece solo il campione A3 ha un contenuto di vitamine confrontabile (mai superiore!) alla media dei campioni freschi, mentre il campione H2 ha un contenuto complessivo di vitamine leggermente inferiore al campione fresco che presenta il minor contenuto vitaminico, ed addirittura il campione H1 evidenzia la pressoché totale assenza di vitamine idrosolubili. In figura 8.21 sono confrontati i range di concentrazione rilevati per le quattro vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>5</sub>, e B<sub>2</sub> nei campioni freschi (colore blu) e liofilizzati (colore rosso).



**Figura 8.21** Range di concentrazione delle vitamine idrosolubili nei campioni freschi (blu) e liofilizzati (rosso)

Altri interessanti aspetti del lavoro (possibilità di utilizzare la concentrazione delle vitamine idrosolubili come strumento di caratterizzazione e/o di georeferenziazione della gelatina reale) potranno esser meglio definiti soltanto incrementando in maniera significativa il numero di campioni da analizzare. Si ritiene inoltre opportuno, a seguito dei deludenti risultati sinora ottenuti sui campioni non freschi, concentrare la futura attenzione solo su campioni freschi di comprovata origine e qualità. E' possibile concludere ponendo l'accento sul fatto che preparazioni alimentari ed integratori a base di gelatina reale possono giocare, almeno dal punto di vista del loro contenuto vitaminico, un ruolo assai modesto nel concorrere al fabbisogno giornaliero<sup>131</sup> di questi preziosi costituenti.

<sup>131</sup><http://www.iom.edu/Global/News%20Announcements/~//media/474B28C39EA34C43A60A6D42CCE07427.ashx>

#### 8.4.5 Validazione

Tutti i dati relativi alla validazione sono riportati in Tabella 8.9. I valori di LoD e LoQ, ottenuti – come in precedenza - attraverso il metodo dell'Upper Limit Approach sembrano essere piuttosto buoni se prendiamo in considerazione le concentrazioni rilevate in sede di analisi quantitativa. Il confronto con altri dati presenti in letteratura è possibile solo per tiamina, piridossina e riboflavina le quali sono state determinate simultaneamente nel lavoro di Presoto<sup>20</sup>. In questo caso, per le vitamine suddette sono stati riportati valori di LoD e LoQ inferiori rispetto a quelli da noi ottenuti. La motivazione è da ricercarsi nel metodo di valutazione del LoD. E' noto infatti che il metodo ULA tende a sovrastimare anche in maniera pesante il detection limit rendendo quindi la metodica apparentemente meno sensibile rispetto ad altri metodi, ma allo stesso tempo garantendo la più alta probabilità di evitare contemporaneamente sia errori di tipo I che di tipo II.

Per tutti gli analiti il range dinamico lineare risulta essere piuttosto ampio e copre almeno due ordini di grandezza. Inoltre, negli intervalli di concentrazione considerati vi è un'ottima linearità come testimoniato dai valori di  $R^2$ .

La precisione è stata determinata in termini di ripetibilità e riproducibilità. L'accettabilità dei dati relativi alla precisione è stata valutata attraverso il modello proposto da Horwitz, e si sono riscontrati valori accettabili per tutti gli analiti.

Infine i test di recupero hanno permesso di oggettivare, per la maggioranza degli analiti, l'assenza di errori sistematici (t-test a due code,  $p = 95\%$ ). L'accettabilità dei recuperi percentuali non quantitativi è stata per contro verificata attraverso confronto con le linee guida dell'AOAC.

Tabella 8.9 Validazione

Vitamine	Sensibilità		Linearità		Ripetibilità		Riproducibilità		Bias Recuperi (%±DS)
	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	Range dinamico lineare (mg /L)	R <sup>2</sup>	CV% <sub>exp,r</sub>	HorRat <sub>r</sub>	CV% <sub>exp,R</sub>	HorRat <sub>exp,R</sub>	
B <sub>1</sub>	0.08	0.26	0.05-100	0.9992	10.00	1.11	12.26	1.05	100±6
B <sub>2</sub>	0.11	0.32	0.05-100	0.9998	7.90	0.84	9.45	0.66	87±5
B <sub>5</sub>	0.24	0.72	0.5-100	0.9967	2.90	0.60	8.98	1.20	99±7
B <sub>6</sub>	0.04	0.12	0.5-100	0.9999	9.08	1.32	10.76	1.02	103±4
B <sub>9</sub>	0.06	0.19	0.05-100	0.9999	-	-	-	-	84.1±0.5
C	0.04	0.11	0.05-100	0.9998	-	-	-	-	101±3

## 8.5 CONCLUSIONI

Nella prima parte del capitolo è stato presentato il primo esempio di analisi contemporanea di sei vitamine idrosolubili nell'alimento miele non pretrattato. La fase di analisi quantitativa ha visto l'impiego di 28 campioni di miele proveniente principalmente da diverse zone della Sardegna e appartenenti a 12 origini botaniche. Durante tale fase si è potuta constatare l'ampia applicabilità della procedura alle varie tipologie di mieli di nettare e i dati ottenuti hanno mostrato che:

- il miele, come peraltro ci attendevamo, è un alimento piuttosto povero in vitamine idrosolubili; esso può concorrere solo in minima parte alle esigenze di tipo nutrizionale dell'organismo umano;
- acido ascorbico e acido nicotinico sono risultati essere presenti in forma libera nella quasi totalità dei campioni a concentrazioni medie dell'ordine di mg/kg, l'acido folico e la riboflavina sono stati determinati in circa il 50% dei campioni a concentrazioni mediamente inferiori rispetto a quelle osservate per acido ascorbico e nicotinico. L'acido pantotenico è presente quasi in tutti i campioni con concentrazioni

tendenzialmente elevate. Infine la presenza della tiamina non è stata mai osservata in alcun campione;

- alcune vitamine paiono essere di potenziale interesse come marker coadiuvanti all'individuazione dell'origine botanica dei mieli; ad esempio l'acido nicotinico, pantotenico e folico mostrano un contenuto particolarmente elevato rispettivamente nei mieli di Agrumi, Asfodelo e Eucalipto.

La procedura analitica messa a punto è stata sottoposta ad un protocollo di validazione in termini di sensibilità, linearità, precisione ed esattezza. L'ampio intervallo di concentrazioni che costituiscono il range dinamico lineare di ciascun analita rappresenta, a nostro avviso, un ottimo presupposto per l'eventuale estensione del metodo a matrici in cui le vitamine idrosolubili siano contenute in maggiori concentrazioni rispetto a quelle finora riscontrate nel miele.

I parametri di sensibilità, non confrontabili con altri presenti in letteratura, e calcolati secondo l'approccio ULA1 risultano soddisfacenti per gli scopi analitici prefigurati.

L'elevata precisione del metodo, valutata sia in termini di ripetibilità che di riproducibilità e la prevalente assenza di bias (esattezza), evidenziata da prove di recupero effettuate su tutti gli analiti, denotano il metodo come accurato. L'accettabilità dei risultati di precisione e di esattezza è stata verificata secondo canoni oggettivi generalmente riconosciuti dalla comunità scientifica internazionale.

I dati sin qui riassunti ci permettono quindi di concludere che il metodo analitico proposto risulta essere del tutto idoneo per la quantificazione del contenuto di vitamine idrosolubili nel miele.

Nella seconda parte del capitolo è stato invece proposto un metodo analitico atto alla determinazione simultanea delle vitamine idrosolubili nella gelatina reale. All'uopo è stato

descritto un protocollo di estrazione basato sulla preliminare precipitazione delle proteine e conseguente liberazione degli analiti. La metodica sviluppata rappresenta il primo esempio di determinazione contemporanea di sei diverse vitamine idrosolubili nella matrice gelatina reale. La metodica è in grado di separare su standard puri a livello della linea di base anche un'altra vitamina, l'acido nicotinico; tale analita soffre purtroppo di pesanti interferenze da composti ignoti presenti nella gelatina reale che al momento ne hanno reso impossibile la determinazione quantitativa in matrice.

Il metodo è stato applicato a 12 campioni reali, dei quali 9 freschi e 3 liofilizzati, provenienti da diverse aree geografiche dell'Italia. Dai dati ottenuti è emerso che:

- alcune caratteristiche del profilo vitaminico sono riscontrabili in tutti i campioni (es., assenza di acido ascorbico e folico);
- i campioni liofilizzati mostrano un contenuto di vitamine pesantemente inferiore rispetto a quello riscontrato per i campioni freschi;
- anche in questo caso alcune vitamine potrebbero essere di potenziale interesse come elementi caratterizzanti per i campioni provenienti dalla stessa azienda e/o nella stessa zona;
- da un punto di vista nutrizionale l'apporto alla dieta potenzialmente conferibile da preparazioni alimentari a base di gelatina reale pare essere non adeguato a definire questi come "integratori vitaminici".

Il ristretto numero di campioni sottoposti ad indagine e l'assenza di informazioni su altri importanti fattori quali condizioni climatiche, morfologia e fisiologia delle api etc., non permette di trarre ancora delle conclusioni definitive. Ciononostante, il profilo qualitativo e quantitativo delle vitamine idrosolubili nella gelatina reale pare essere un promettente strumento che concorre ad effettuare:

- la georeferenziazione dei campioni;
- l'ottenimento di una sorta di impronta digitale del proprio prodotto, eventualmente in concorso all'impiego di altri parametri (caratteristiche chimico-fisiche, profilo amminoacidico, polifenoli etc.);
- azioni di controllo post produzione sulla veridicità delle informazioni relative alla percentuale di gelatina reale presente in prodotti disponibili commercialmente;
- l'individuazione di parametri di qualità per la gelatina reale, la cui freschezza pare essere un requisito indispensabile per la sua attività biologica.

Ricordiamo che al momento non esistono - né a livello nazionale né a livello comunitario - metodiche analitiche ufficiali volte al controllo di qualità e/o dell'origine geografica di questo alimento, che sta acquisendo sempre più un maggiore appeal commerciale anche in considerazione dell'esplosione del mercato dei cosiddetti prodotti nutraceutici.

Il protocollo di validazione al quale è stata sottoposta la metodica, ha mostrato una buona sensibilità, ottima precisione ed una quasi totale assenza di errori sistematici.

## ***Ringraziamenti***

*Desidero ringraziare tutte le persone con le quali ho condiviso il percorso personale e professionale svolto durante questi ultimi anni che, per molte ragioni, ricorderò fra i più intensi della mia vita. In particolare voglio dire grazie a...*

*Prof. Gavino Sanna, supervisore ineguagliabile, per i suoi insegnamenti e per tutta la fiducia che ha sempre riposto in me da quattro anni a questa parte.*

*Nadia, per i suoi preziosi consigli e per avermi offerto il suo aiuto ogni qualvolta ne abbia avuto bisogno.*

*Maria, Severyn, Paola, tutti i dottorandi e i tesisti che hanno fatto parte del gruppo di ricerca di Chimica Analitica, con i quali ho condiviso tanti bei momenti all'insegna dell'allegria.*

*I miei genitori, per i loro sacrifici, per l'avermi lasciato libero di scegliere, per il loro continuo sostegno e per l'essere presenti sempre nei momenti belli e nei momenti brutti.*

*Mio fratello Matteo, per il suo costante incoraggiamento e per le enormi soddisfazioni che mi regala ogni giorno.*

*Mia nonna, Rita, Pietro, Paolo e Andrea per essermi sempre stati vicino come solo una vera famiglia sa fare.*

*Pierluigi e Lisa, per il loro affetto incondizionato e per il loro continuo supporto.*

*Maria, my baby, una persona speciale e un'amica insostituibile, per l'esserci stata sempre, per le risate e per tutte quelle volte in cui agli occhi di tutti siamo sembrati due pazzi. Non basterebbero cento pagine per dirti quanto ti voglio bene.*

*Filo, per tutto ciò che abbiamo condiviso negli ultimi dieci anni. Non si può riassumere in una frase la nostra amicizia, ma desidero ringraziarti per tutte quelle volte che hai avuto la pazienza di sopportarmi e ascoltarmi. Grazie di cuore.*

*Vittorio, un grande amico sin dalle superiori e un esempio da seguire. Grazie per il tuo continuo sostegno.*

*Silvia, molto più di una semplice tesista, ma un'amica che ha rappresentato un punto fermo al quale chiedere aiuto in un periodo difficile. Non dimenticherò mai l'anno trascorso insieme in lab!*

*Sara, per la sua follia ma soprattutto per la sua grande amicizia. E ovviamente, per l'essere stata la principale protagonista dei miei mms. E poi Milli Vanilli, fluoruri e addio abilitazione addio!*

*Claudia, per la pazienza dimostrata di fronte ai miei scherzi...non è da tutti! Grazie anche a te per la tua amicizia e spero avremo modo di rivivere in futuro una bella esperienza come quella di Roma!*

*Daniele, per l'essere stato un ottimo compagno di viaggio ma soprattutto un amico, per le innumerevoli pause pranzo passate a ridere e a parlare della ministra, di Immanuel...potrei continuare ma è meglio fermarsi qui...*

*Daniela, per le tantissime risate, per le chiacchierate e per l'essere mia amica da ormai dieci anni!*

*Javier, probabilmente il più bravo ragazzo che io conosca, per l'avermi dimostrato che anche dall'altra parte dell'oceano i chimici sono pazzi!*

*Zaira, Valentina, Ricciolo, Elisabetta, Roberta F., Lalletta, Jenni, Roberto, Monica, Antonella, Pastello, Irene, Francesca, Laura e tutti i colleghi di Chimica che mi hanno accompagnato in questo viaggio pieno di ricordi. Grazie, grazie, grazie!*

*Grazie a tutte quelle persone che anche se per poco hanno fatto parte della mia vita e che ora percorrono strade diverse, perché ogni esperienza ci fa crescere, maturare e ci rende migliori.*

*...desidero dedicare il mio ultimo ringraziamento a mio nonno, che purtroppo non potrà essere fisicamente testimone di questo traguardo raggiunto, ma che sarà sempre presente nei miei ricordi e nei miei pensieri più belli.*

*Marco*

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 1
<b>CAPITOLO 1</b>	
<b>IL MIELE</b>	
1.1 ORIGINE	pag. 6
1.1.1 Nettare	pag. 7
1.1.2 Melata	pag. 7
1.2 FORMAZIONE DEL MIELE	pag. 8
1.3 COMPOSIZIONE	pag. 9
1.3.1 Acqua	pag. 10
1.3.2 Zuccheri	pag. 11
1.3.3 Acidi organici	pag. 12
1.3.4 Sostanze minerali	pag. 12
1.3.5 Proteine	pag. 13
1.3.6 Vitamine	pag. 14
1.3.7 Costituenti minori	pag. 14
1.4 PROPRIETA' FISICHE	pag. 16
1.4.1 Indice di rifrazione	pag. 16

1.4.2 Densità e peso specifico	pag. 16
1.4.3 Viscosità	pag. 16
1.4.4 Igroscopicità	pag. 17
1.4.5 Calore specifico e conducibilità termica	pag. 17
1.4.6 Conducibilità elettrica	pag. 18
1.4.7 Potere rotatorio	pag. 18
1.4.8 Colore	pag. 18
1.4.9 Cristallizzazione	pag. 19
1.5 PROPRIETA' BIOLOGICHE	pag. 20
1.5.1 Proprietà terapeutiche	pag. 20
1.5.2 Proprietà nutrizionali	pag. 21
1.6 TECNICHE DI PRODUZIONE E LAVORAZIONE	pag. 22
1.6.1 Rimozione dei melari	pag. 22
1.6.2 Stoccaggio dei melari	pag. 23
1.6.3 Deumidificazione	pag. 23
1.6.4 Estrazione	pag. 24
1.6.5 Filtrazione e decantazione	pag. 26
1.6.6 Cristallizzazione semplice	pag. 28
1.6.7 Preparazione del miele per il confezionamento	pag. 28
1.6.8 Confezionamento	pag. 29
1.7 CONSERVAZIONE	pag. 30

## **CAPITOLO 2**

### **MIELE E QUALITA'**

2.1 CONTROLLI UFFICIALI	pag. 31
2.1.1 Determinazione degli zuccheri	pag. 31
2.1.2 Determinazione del contenuto di acqua	pag. 32
2.1.3 Determinazione del contenuto di sostanze insolubili in acqua	pag. 34
2.1.4 Determinazione della conducibilità elettrica	pag. 34
2.1.5 Determinazione di pH, acidità libera, acidità combinata o lattoni e acidità totale	pag. 35
2.1.6 Determinazione dell'attività diastolica	pag. 35
2.1.7 Determinazione dell'idrossimetilfurfurale (HMF)	pag. 36
2.2. CONTROLLO DELLA SALUBRITA'	pag. 37
2.2.1 Contaminanti di origine ambientale	pag. 37
2.2.2 Contaminanti derivanti dall'attività apistica	pag. 38
2.3 CONTROLLO DELLA GENUINITA'	pag. 39
2.4 CONTROLLO DELLA QUALITA'	pag. 41
2.5 CONTROLLO DELL'ORIGINE BOTANICA	pag. 42
2.5.1 Analisi chimico-fisiche	pag. 42
2.5.2 Analisi melissopalinologiche	pag. 44
2.6 CONTROLLO DELL'ORIGINE GEOGRAFICA	pag. 46

## **CAPITOLO 3**

### **CARATTERISTICHE DEI MIELI UNIFLORALI**

3.1 INTRODUZIONE	pag. 48
------------------	---------

3.2 MIELE DI ACACIA	pag. 48
3.3 MIELE DI AGRUMI	pag. 50
3.4 MIELE DI ASFODELO	pag. 51
3.5 MIELE DI CARDO	pag. 51
3.6 MIELE DI CASTAGNO	pag. 52
3.7 MIELE DI CORBEZZOLO	pag. 53
3.8 MIELE DI ERICA	pag. 55
3.9 MIELE DI EUCALIPTO	pag. 56
3.10 MIELE DI LAVANDA	pag. 56
3.11 MIELE DI ROSMARINO	pag. 57
3.12 MIELE DI SULLA	pag. 58
3.13 MIELE DI TIGLIO	pag. 59
3.14 MIELE DI MELATA DI ABETE	pag. 60
3.15 MIELE DI MELATA DI METCALFA	pag. 61

## **CAPITOLO 4**

### **GELATINA REALE**

4.1 INTRODUZIONE	pag. 63
4.2 COMPOSIZIONE CHIMICA	pag. 65
4.3 PROPRIETA' FISICHE	pag. 67
4.4 TECNICHE DI PRODUZIONE	pag. 68
4.5 CONSERVAZIONE	pag. 73
4.6 AUTENTICITA' E FRESCHEZZA	pag. 74

4.7 USI COMMERCIALI DELLA GELATINA REALE	pag. 76
4.7.1 Integratore alimentare	pag. 77
4.7.2 Prodotti alimentari	pag. 78
4.7.3 Prodotti farmaceutici	pag. 78
4.7.4 Prodotti cosmetici	pag. 79
4.7.5 Altri impieghi	pag. 80

## **CAPITOLO 5**

### **PROPRIETA' BIOLOGICHE DELLA GELATINA REALE**

5.1 EFFETTI FISIologici SULLe API	pag. 81
5.2 PROVE CIRCOStANZIALI NON CONFERMATE	pag. 82
5.3 STUDI SCIENTIFICI	pag. 82
5.3.1 Studi clinici su animali	pag. 83
5.3.2 Studi clinici sull'uomo	pag. 85

## **CAPITOLO 6**

### **DETERMINAZIONE RP-HPLC DEGLI AMMINOACIDI LIBERI NEL MIELE DI CORBEZZOLO**

6.1 STATO DELL'ARTE ED OBIETTIVI	pag. 87
6.2 SEZIONE SPERIMENTALE	pag. 90
6.2.1 Campioni	pag. 90
6.2.2 Estrazione	pag. 90

6.2.3 Derivatizzazione	pag. 91
6.2.4 Analisi RP-HPLC	pag. 91
6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 93
6.3.1 Separazione cromatografica	pag. 93
6.3.2 Amminoacidi liberi nel miele di corbezzolo	pag. 94
6.4 VALIDAZIONE	pag. 99
6.4.1 Limite di rivelabilità e di quantificazione	pag. 99
6.4.2 Precisione	pag. 99
6.4.3 Range dinamico lineare	pag. 102
6.4.4 Bias	pag. 102
6.5 CONCLUSIONI	pag. 104

## **CAPITOLO 7**

### **DETERMINAZIONE DI ALDEIDI E ACIDI FURANICI NEL MIELE**

7.1 IMBRUNIMENTI NON ENZIMATICI	pag. 106
7.1.1 Caramellizzazione degli zuccheri	pag. 106
7.1.2 Reazione di Maillard	pag. 108
7.1.3 Degradazione dell'acido ascorbico	pag. 111
7.2 STATO DELL'ARTE ED OBIETTIVI	pag. 111
7.3 SEZIONE SPERIMENTALE	pag. 114
7.3.1 Campioni	pag. 114
7.3.2 Analisi RP-HPLC	pag. 114
7.4 RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 116

7.4.1 Separazione cromatografica	pag. 116
7.4.2 Composti furanici nel miele	pag. 119
7.5 VALIDAZIONE	pag. 123
7.5.1 Limite di rivelabilità e di quantificazione	pag. 123
7.5.2 Precisione	pag. 124
7.5.3 Range dinamico lineare	pag. 125
7.5.4 Bias	pag. 126
7.6 CONCLUSIONI	pag. 127

## **CAPITOLO 8**

### **DETERMINAZIONE DI VITAMINE IDROSOLUBILI NEL MIELE E NELLA GELATINA REALE**

8.1 LE VITAMINE	pag. 128
8.1.1 Tiamina	pag. 129
8.1.2 Riboflavina	pag. 131
8.1.3 Niacina	pag. 132
8.1.4 Acido pantotenico	pag. 133
8.1.5 Piridossina	pag. 134
8.1.6 Biotina	pag. 136
8.1.7 Acido Folico	pag. 137
8.1.8 Cobalamina	pag. 138
8.1.9 Acido Ascorbico	pag. 139
8.1.10 Vitamine liposolubili	pag. 140

8.2 DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI VITAMINE IDROSOLUBILI NEGLI ALIMENTI	pag. 143
8.3 VITAMINE IDROSOLUBILI NEL MIELE	pag. 144
8.3.1 Stato dell'arte ed obiettivi	pag. 144
8.3.2 Campioni	pag. 145
8.3.3. Analisi RP-HPLC	pag. 146
8.3.4 Analisi quantitativa	pag. 148
8.3.5 Validazione	pag. 152
8.4 VITAMINE IDROSOLUBILI NELLA GELATINA REALE	pag. 153
8.4.1 Stato dell'arte ed obiettivi	pag. 153
8.4.2 Campioni	pag. 154
8.4.3 Analisi RP-HPLC	pag. 155
8.4.4 Analisi quantitativa	pag. 158
8.4.5 Validazione	pag. 163
8.5 CONCLUSIONI	pag. 164

