



UNIVERSITÀ DI PISA



Agenzia nazionale per le nuove tecnologie,
l'energia e lo sviluppo economico sostenibile

TESI DI DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE

**GLI ALLERGENI NELLA PROPOLI:
CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E
PROCESSI DI RIMOZIONE**

Andrea ALIBONI

Relatori
Prof. Maria Perla COLOMBINI
Dr. Armando D'ANDREA

Controrelatore
Dr. Paolo MASSANISSO

RIASSUNTO

La propoli è un prodotto dell'alveare molto popolare nella medicina naturale, ma il cui utilizzo presenta rischi di sensibilizzazione e reazioni allergiche. La presente tesi di dottorato presenta un lavoro di ricerca mirato a far avanzare la conoscenza su alcuni argomenti di interesse analitico e di processo riguardanti la sicurezza nell'utilizzo della propoli. L'obiettivo della sperimentazione era la messa a punto di metodi per l'analisi quantitativa di specie allergeniche poco polari, presenti nella propoli in concentrazioni significativamente più basse delle componenti principali, ed inoltre l'esplorazione di alcuni metodi di trattamento della propoli per la rimozione degli allergeni.

Per lo studio, sono stati raccolti diversi campioni di propoli grezza da diverse località dell'Italia Centrale, in Toscana, Romagna, Lazio, Umbria ed Abruzzo.

Il lavoro sperimentale è stato diviso in tre parti. La determinazione dello spettro UV-VIS e del profilo di composizione delle specie più comuni nei campioni raccolti; la messa a punto di un metodo analitico mirato alla determinazione quantitativa di benzil salicilato e benzil cinnamato nella propoli, due esteri allergenici contenuti nella propoli; la messa a punto di processi per l'allontanamento degli allergeni e la caratterizzazione della propoli trattata. Un primo processo è basato sull'estrazione della propoli solida con fluido supercritico, un secondo sul trattamento degli estratti etanolic di propoli con una fase a base di olio di semi di mais.

Il confronto degli spettri UV e di composizione con quelli riportati in letteratura ha permesso di accertare che tutti i campioni di propoli raccolti erano di pioppo. Il lavoro sperimentale ha permesso di evidenziare come un metodo basato sull'estrazione con esano degli estratti etanolic di propoli e successiva analisi GC/MS risulti particolarmente efficace per l'analisi dei due esteri benzil salicilato e benzil cinnamato, mentre l'analisi HPLC richiede una più laboriosa preparazione del campione, che rende i risultati non riproducibili. La caratterizzazione dei campioni propoli trattati con olio ha mostrato come il processo risulti efficace nel rimuovere gli allergeni, anche se dovrà essere ulteriormente caratterizzato e migliorato.

Parole chiave: propoli, benzil salicilato, benzil cinnamato, allergeni, caffeati

SUMMARY

Propolis is a beehive product that is very popular in natural medicine, but its usage may cause allergic reactions. This Ph.D. dissertation presents research aimed at advancing the current knowledge of analytical and process chemistry regarding the safety of propolis. The goal of the experimental work is to devise a method for the quantitative analysis of low polarity allergenic species occurring in propolis. These species occur in concentrations that are significantly lower than the primary components. It also explores a variety of treatment processes designed to remove allergenic species.

The raw propolis specimens used during the experimental work were collected in the following locations in Central Italy: Toscana, Romagna, Lazio, Umbria and Abruzzo.

The experimental work described in this thesis has been organized in this way:~

1. The registration of UV-VIS spectra and composition profiles of common species in the collected specimens.
2. The devising of a quantitative analytical method for the determination, in propolis specimens, of benzyl salicylate and benzyl cinnamate - two allergenic esters that are present in propolis.
3. The devising and testing of two processes to remove allergens, followed by the characterization of treated propolis. The first process is based on the supercritical extraction of solid raw propolis; the second on the treatment of propolis ethanolic extracts with a phase based on corn oil.

This thesis' comparison of the UV spectral data and composition profiles of the collected propolis specimens, with those reported in the literature, clearly show that all of the collected specimens were poplar propolis. The experimental work has shown that an analytical method based on extraction with hexane of the propolis ethanolic extracts followed by GC/MS is very efficient for the analysis of benzyl salicylate and benzyl cinnamate. The HPLC analysis, on the contrary, requires a more complex specimen preparation that makes results irreproducible. The characterization of propolis specimens, following treatment with oily phase, showed that the process efficiently and effectively removes allergenic species, though it needs further characterization and refinement.

Keywords: propolis, benzyl salicylate, benzyl cinnamate, allergens, caffeates

Indice

Introduzione	1
Capitolo 1 - Stato dell'arte	7
1. Composizione chimica della propoli	7
2. Solubilizzazione e frazionamento	19
2.1 Solubilizzazione	19
2.2 Frazionamento	20
3. Analisi strumentale	23
3.1 Spettrofotometria UV-VIS	23
3.2 Analisi cromatografica	23
3.3 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare	27
3.4 Spettroscopia di massa	29
3.5 Analisi spettrofotometrica per la determinazione del contenuto di classi di composti	30
Capitolo 2 - Parte sperimentale	34
1. Materiali	34
1.1 Reagenti e solventi	34
1.2 Esteri standard	35
1.3 Altri standard	36
1.4 Solventi e colonne per HPLC	37
1.5 Materiale per GC/MS	38
1.6 Altri prodotti	39
1.7 Sintesi e caratterizzazione dell'esil cinnamato	39
1.7.1 Procedure di sintesi	39
1.7.2 Caratterizzazione del prodotto	40
2. Preparazione e conservazione delle soluzioni	44
2.1 Soluzioni di esteri	44
2.2 Soluzioni di acidi organici e CAPE	45
2.3 Soluzioni di flavonoidi	46
2.4 Soluzioni di alcoli aromatici	46
2.5 Soluzioni di controllo per HPLC	47
2.6 Altre soluzioni	47
3. Altre preparazioni	48
3.1 Preparazione di cera additivata di esteri	48

3.2 Preparazione del gel di silice per SPE	48
3.3 Preparazione della miscela olio-cera per il trattamento della propoli	49
4. Campioni di propoli	49
4.1 Soluzioni etanoliche di propoli	49
4.2 Determinazione delle frazioni ponderali dei campioni di propoli	52
4.3 Preparazione della propoli additivata di esteri	52
5. Strumentazione	52
5.1 Spettrofotometria UV-VIS	52
5.2 Apparat per la cromatografia liquida	52
5.3 Cromatografo GC/MS	55
5.4 Estrattore a fluidi supercritici	56
5.5 Altre apparecchiature	56
6. Caratterizzazione dei campioni di propoli	58
6.1 Determinazioni spettrofotometriche	58
6.1.1 Spettri UV degli EEP	58
6.1.2 Determinazioni spettrofotometriche del contenuto di classi di composti	58
6.1.3 Determinazione spettrofotometrica del potere antiossidante	60
6.2 Caratterizzazione cromatografica di campioni di propoli	63
6.2.1 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'inverno 2006	63
6.2.1.1 Determinazione di acidi organici e CAPE	64
6.2.1.2 Determinazione dell'acido salicilico	65
6.2.1.3 Determinazione di esteri cinnamici e salicilici	67
6.2.2 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'autunno 2007	69
6.2.2.1 Determinazione di acidi organici, CAPE e flavonoidi	70
6.2.2.2 Determinazione di esteri cinnamici e salicilici	71
6.2.2.2.1 Estrazione con esano	71
6.2.2.2.2 Analisi GC-MS	72
6.2.2.2.3 Analisi HPLC	75
7. Trattamenti della propoli	75
7.1 Trattamenti con biossido di carbonio supercritico	75
7.1.1 Estrazione di standard di esteri	76
7.1.2 Estrazione di campioni di propoli	77
7.1.3 Misure di estrazione di propoli solida in funzione del tempo	78
7.2 Trattamento con fase oleosa	78

Capitolo 3 - Risultati	82
1. Caratterizzazione chimico-fisica dei campioni di propoli	82
1.1 Determinazione delle percentuali di massa di campioni di propoli secondo le proprietà di solubilità	82
1.2 Spettro UV-VIS degli estratti etanoliche	83
1.3 Caratterizzazione ponderale e spettrofotometrica delle soluzioni esaniche ottenute dall'estrazione da acquosa acida degli EEP per la preparazione dei campioni analitici	87
2. Caratterizzazione chimica di campioni di propoli	91
2.1 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'inverno 2006	91
2.1.1 Determinazione di esteri cinnamici e salicilici	92
2.1.1.1 Messa a punto del metodo con soluzioni standard	92
2.1.1.2 Analisi quantitativa degli esteri BSAL, BCINN, FESAL, FECINN in campioni di propoli raccolti nell'inverno 2006	95
2.1.2 Determinazione di acidi cinnamici e CAPE	98
2.1.3 Determinazione di acido salicilico	101
2.2 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'autunno 2007	103
2.2.1 Messa a punto del metodo analitico GC-MS per BSAL e BCINN	104
2.2.2 Messa a punto dell'analisi mediante HPLC in fase inversa per la determinazione di BSAL e BCINN	107
2.2.3 Analisi GC-MS e HPLC di campioni di propoli	110
2.2.4 Determinazione per HPLC di flavonoidi e acidi cinnamici	111
2.3 Caratterizzazione per contenuto di classi di composti e potere antiossidante dei campioni reali di propoli raccolti nell'autunno 2007	117
3. Trattamento della propoli con biossido di carbonio supercritico	120
3.1 Trattamento di esteri standard	120
3.2 Trattamento di campioni di propoli a ciclo singolo	121
3.3 Misure di estrazione di propoli solida in funzione del tempo	126
4. Trattamento con fase oleosa	135
Capitolo 4 - Discussione dei risultati	145
Bibliografia	151
Abbreviazioni	156
Appendice 1 - Coefficienti di estinzione UV	157
1. Coefficienti di estinzione	157
1.1 Acidi benzoici	157

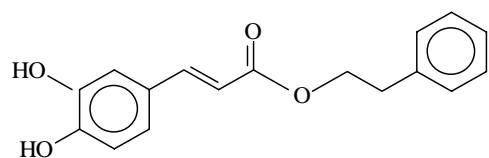
1.2 Acidi cinnamici	158
1.3 Esteri salicilici	160
1.4 Esteri cinnamici	162
1.5 Flavonoidi	163
1.6 Vari	165
2. Rapporti di banda	167
2.1 Acidi benzoici	167
2.2 Acidi cinnamici	168
2.3 Esteri salicilici	169
2.4 Esteri cinnamici	171
2.5 Flavonoidi	173
2.6 Vari	175
3. Formule numeriche di calcolo per la concentrazione in ppm	176
3.1 Formule numeriche per il calcolo di concentrazione di specie singole	176
3.2 Formule numeriche per il calcolo di concentrazione di due specie in miscela	179
Appendice 2 - Analisi degli spettri di massa di esteri salicilici e cinnamici	181
1. Analisi degli spettri di massa di BSAL, BCINN ed HSAL per l'analisi GC/MS	181
2. Analisi dello spettro di massa di HCINN	183
Appendice 3 - Metodo delle aggiunte ed analisi mediante HPLC in fase normale per la determinazione di BSAL e BCINN in propoli A1	187
Appendice 4 - Conferma dell'assegnazione dei picchi nella caratterizzazione HPLC dei campioni di propoli raccolti in autunno 2007	192
Appendice 5 - Determinazione di pinocembrina e CAPE in campioni di propoli raccolti nell'inverno 2007	204
Ringraziamenti	208
Presentazioni e corsi	209

INTRODUZIONE

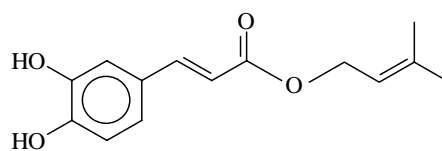
La propoli è un prodotto dell'alveare noto dall'antichità, citata già da Aristotele e Plinio [1]. In alcune aree, per esempio in Europa Orientale, è sempre stata un rimedio popolare per molte affezioni [2,3]. Si è quindi diffusa, a partire dagli anni ottanta, godendo di una crescente popolarità, come parte di una tendenza di "ritorno alla natura". In base a tale filosofia di vita, i prodotti naturali sono considerati completamente innocui in contrasto con i prodotti e le miscele chimiche di sintesi [3,4]. La propoli è offerta al consumo in un gran numero di prodotti salutistici e cosmetici: soluzioni idroalcoliche per il trattamento del cavo orale, creme per applicazioni dermatologiche, spray per la gola. E' anche usata come integratore in diversi prodotti alimentari, per esempio il miele, cui conferisce le sue peculiari proprietà [5]. La popolarità della propoli dipende dalle notevoli proprietà terapeutiche di cui è accreditata, e che sono ampiamente documentate nella letteratura medica e biologica [6-8]. Tali proprietà comprendono capacità antibatterica, antifungina, antivirale, antiprotozoica, citotossica, antinfiammatoria, anestetica, epatoprotettiva, antitumorale. E' capace di svolgere un'azione antiossidante e di cattura dei radicali liberi.

Nonostante le proprietà benefiche, è stata raccomandata cautela nell'uso di prodotti basati sulla propoli, perché possono scatenarsi reazioni allergiche in soggetti sensibili, e moltissimi casi sono stati riportati in letteratura [3, 4, 9-17]. Sono responsabili di queste reazioni alcuni esteri dell'acido caffeico, soprattutto prenil caffeato e fenil etil caffeato [3, 4, 13, 14, 17], ma anche altri esteri tra cui il benzil salicilato ed il benzil cinnamato (Figura **I1**) contribuiscono alla sensibilizzazione.

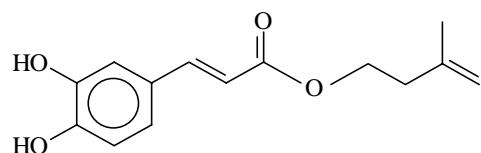
Altre specie sono state anche indicate come possibili responsabili o corresponsabili delle reazioni allergiche. Alcune delle specie volatili riportate nella lista compilata dalla SCCNPF [18], coinvolte nelle allergie da contatto in prodotti cosmetici, possono essere presenti anche nella propoli: benzil salicilato, benzil cinnamato, alcol benzilico, benzoato di benzile, eugenolo, geraniolo, cumarina, limonene (Figura **I2**).



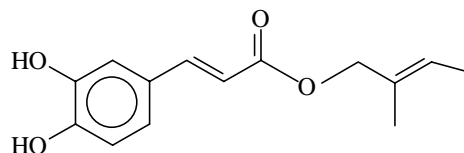
(1)



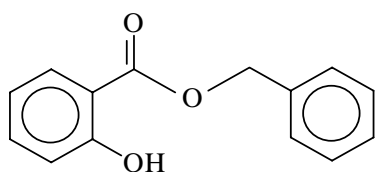
(2a)



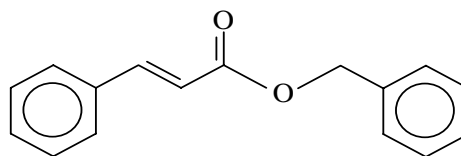
(2b)



(2c)



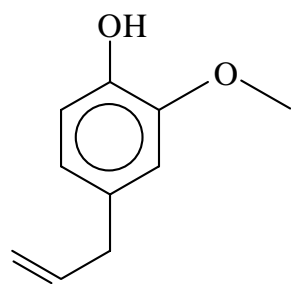
(3)



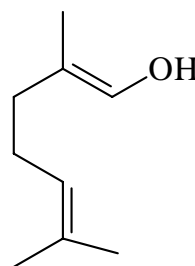
(4)

Figura II. Esteri responsabili di reazioni allergiche (1) Feniletil caffeato (2a, b, c) I tre isomeri del prenile caffeato presenti nella propoli (3) benzil salicilato (4) benzil cinnamato

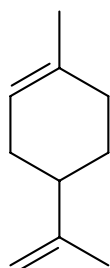
Possono essere coinvolte nel processo di sensibilizzazione anche alcune specie presenti nel cosiddetto “Balsamo del Perù”, una miscela naturale ottenuta dal *Myroxylon balsamum* nella quale prevalgono specie derivate dall’acido cinnamico (vedi Figura **I3**) [6, 14]. Infatti, molti soggetti sensibili alla propoli mostrano reazione positiva anche a questa miscela. Lo scatenarsi di una reazione allergica a seguito del contatto con la propoli è quindi un processo complesso, che coinvolge molte specie ed effetti sinergici tra di esse, anche se i caffeati sono i principali responsabili della sensibilizzazione.



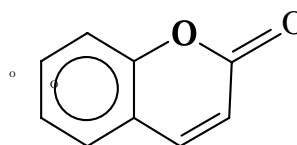
(1)



(2)



(3)



(4)

Figura I2. Alcune specie volatili, riportate nella lista compilata dalla SCCNPF, presenti in prodotti cosmetici e potenzialmente responsabili di allergie da contatto, e diffuse anche in campioni di propoli (1) eugenolo (2) geraniolo (3) limonene (4) cumarina

Chimicamente, la propoli è una miscela molto complessa, che può contenere anche centinaia di specie diverse [8], e la cui composizione da campione a campione è molto variabile in funzione di diversi parametri, il più importante l'origine botanica della materia prima utilizzata dalle api per la sua manifattura. I flavonoidi, gli acidi cinnamici e i fenoli sono le molecole più caratteristiche della propoli di pioppo, la più diffusa nelle aree temperate. Queste molecole sono le principali responsabili delle proprietà benefiche non solo della propoli, ma anche di molti estratti vegetali, e per questo sono state diffusamente caratterizzate nella letteratura scientifica [19]. Vari metodi analitici quantitativi sono stati messi a punto per la determinazione qualitativa e quantitativa della componente flavonoidica e fenolica nella propoli [20], basati sia su tecniche cromatografiche [21- 26], sia sull'uso della spettrometria di massa [24, 27].

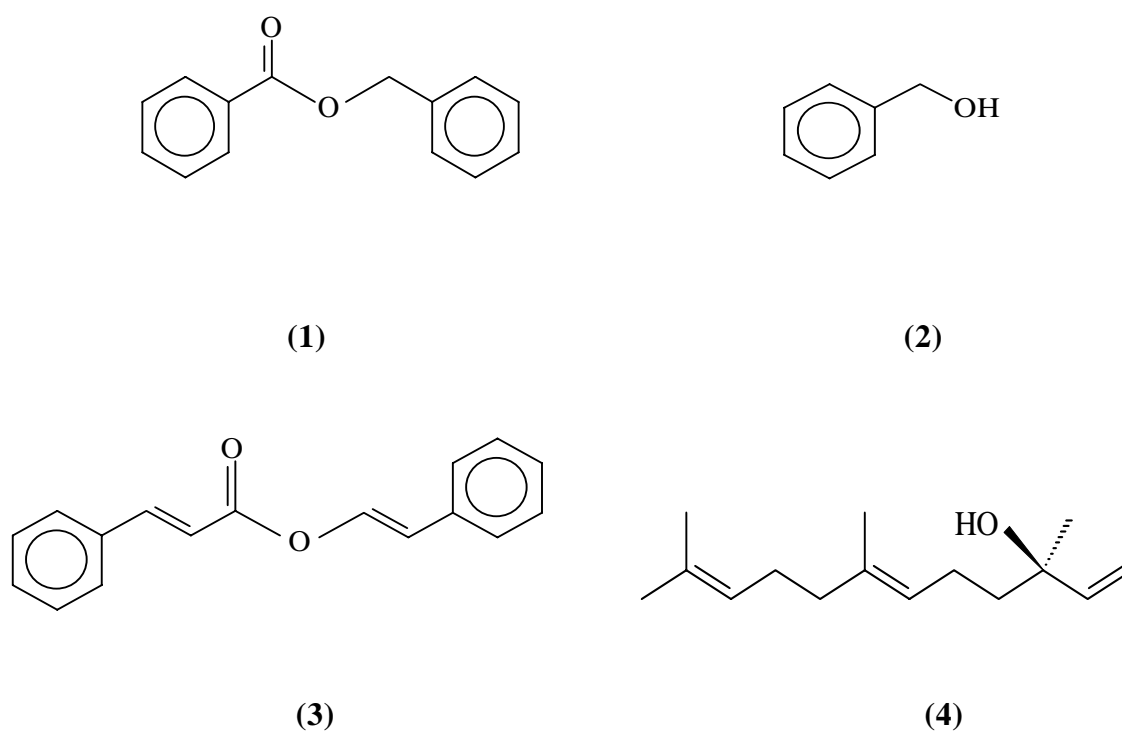


Figura 13. Alcune delle specie presenti nel Balsamo del Perù che possono trovarsi anche alla propoli e potenzialmente allergenici (1) Benzoato di benzile (2) alcol benzilico (3) cinnamil cinnamato (4) *trans* nerolidolo

Nonostante la buona conoscenza della frazione flavonoidica e fenolica, la propoli contiene molte altre classi di composti, tra cui terpeni e terpenoidi, esteri, acidi alifatici, chetoni, aldeidi. Alcune specie appartenenti a queste classi possono essere presenti in concentrazioni anche molto inferiori rispetto alle componenti più abbondanti. E' possibile analizzare lo spazio di testa di propoli o i suoi estratti derivatizzati mediante GC-MS, ottenendo cromatogrammi che mettono in rilievo la presenza di un gran numero di composti [28-30]. Non sono però riportati in letteratura, per quanto è a conoscenza dell'autore, protocolli specifici per la determinazione quantitativa delle specie minoritarie presenti nella propoli. Alcuni di questi composti sono responsabili di reazioni allergiche (tra loro il benzil cinnamato ed il benzil salicilato), e potrebbe non essere mai stata riportata la presenza di molte altre specie, che potrebbero avere effetti impreveduti ed anche nocivi. D'altra parte, non è possibile usare protocolli non specifici, come quello messo a punto per la determinazione mediante GC/MS di allergeni in cosmetici [31]. La sicurezza nell'utilizzo dei prodotti a base di propoli dipende, quindi, dalla possibilità di superare i problemi analitici ancora non risolti e di

risolvere la complessità della composizione. Allo stato attuale, l'assunzione di propoli può comportare l'esposizione a sostanze sconosciute [30].

Il lavoro svolto nell'ambito della presente tesi di dottorato ha esplorato due diverse ma complementari linee di ricerca relative alla sicurezza nell'uso della propoli. La prima ha come obiettivo quello di mettere a punto protocolli e procedure analitiche per la determinazione di specie a bassa polarità presenti a bassa concentrazione nella propoli; la seconda quello di mettere a punto uno o più processi dedicati al trattamento della propoli, per la realizzazione di una propoli priva di allergeni. Il lavoro è stato condotto nell'ambito dei ruoli istituzionali di ricerca della sezione BIOTEC-AGRO dell'ENEA, che lavora per lo sviluppo e la sicurezza dei processi dell'industria agro-alimentare.

In particolare, il lavoro di ricerca ha riguardato:

- messa a punto di una procedura complessa di preparazione della propoli per l'analisi cromatografica dei due esteri allergenici, benzil salicilato e benzil cinnamato, presenti in concentrazioni anche tre ordini di grandezza inferiori rispetto alle specie preponderanti nella propoli, e non rilevabili analiticamente senza un adeguato pretrattamento. Tale procedura comporta un primo passaggio di clean-up mediante estrazione con esano degli estratti etanolici sospesi in soluzione acquosa acida con standard esterni. Gli estratti esanici possono essere analizzati tal quali in GC/MS, previa concentrazione, oppure essere ulteriormente purificati su gel di silice (SPE), e le soluzioni analizzate con HPLC in fase inversa. L'applicazione di questa procedura di preparazione ha permesso di ottenere profili cromatografici innovativi sia in HPLC sia in GC/MS, nei quali gli esteri ricercati sono molto al di sopra del limite di rivelazione. Solo l'analisi GC/MS, però, si è rivelata adatta all'analisi quantitativa dei due esteri;

- messa a punto di processi di trattamento della propoli per la rimozione dei composti allergenici. La propoli è un prodotto caratterizzato dal suo essere completamente naturale, per cui ogni processo che riguardi il suo trattamento deve essere condotto con mezzi che non lascino residui chimici potenzialmente pericolosi. La presenza di tali residui nel prodotto trattato rischierebbe di alterare questa "naturalità", così importante nella commercializzazione della propoli. Nella produzione di una propoli anallergica devono essere allontanate delle specie a bassa o media polarità, tra cui esteri dell'acido caffeico, salicilico e cinnamico, mentre le specie di maggiore interesse per le proprietà della propoli hanno una maggiore polarità. Sono stati perciò individuati due mezzi lipofili da usare

come estraenti degli allergeni: il biossido di carbonio supercritico e l'olio di mais. Il biossido di carbonio supercritico è un mezzo molto usato nel campo della cosmetica, per la preparazione di oli essenziali, per l'estrazione di specie ad alto valore aggiunto da matrici vegetali e nel campo alimentare. E' particolarmente apprezzato perché non lascia residui di alcun tipo sulla matrice trattata [32]. Il trattamento di soluzioni con olio è già stato proposto, per esempio per l'isolamento di alcuni antibiotici dal brodo di coltura usato per la produzione, perché è completamente atossico e non lascia residui negli estratti [33]. I due tipi di trattamento sono stati messi a confronto valutando la loro applicabilità. Il metodo basato sul biossido di carbonio si è rivelato molto selettivo, e riesce a rimuovere molto efficacemente alcuni esteri poco polari, come il benzil salicilato ed il benzil cinnamato, ma non riesce ad estrarre gli esteri più allergenici, i caffeati. Il metodo basato sulla fase oleosa è più efficace nel rimuovere tutti gli allergeni, ma modifica in maniera sensibile la composizione e le proprietà della propoli.

Capitolo 1 Stato dell'arte

La propoli è un prodotto dell'alveare che le api utilizzano per diversi scopi: rifinire le pareti delle celle dell'alveare, regolare gli accessi, chiudere i fori e le crepe della struttura e proteggerla da infiltrazioni di acqua. Grazie alle sue proprietà antisettiche ed antifungine, la propoli mantiene sano l'ambiente dell'alveare, limitando lo sviluppo di batteri ed altri microrganismi. Le api la usano anche per coprire le carcasse di eventuali invasori, per evitare che si decompongano e costituiscano quindi un pericolo per la vita e l'igiene dell'alveare [2, 8]. Le api raccolgono comunemente il materiale vegetale necessario alla manifattura della propoli all'inizio della stagione calda. L'apicoltore recupera invece la propoli in inverno, quando giunge a perfetta maturazione, e deve avere un aspetto lucente, quasi metallizzato, ed essere compatta e non plastica. Si conserva al fresco, in recipienti ben chiusi ed al riparo dalla luce. Le sue naturali proprietà antibatteriche ed antiossidanti ne garantiscono la conservazione anche per lunghi periodi [34] (www.apicoltura2000.it). Si chiama grezza la propoli che viene raccolta raschiando dalle pareti dell'alveare il materiale naturalmente prodotto dalle api. La produzione è stimabile in 50-100 g di materiale per alveare per anno. E' possibile aumentare artificialmente la produzione di propoli, ponendo opportune griglie all'interno dell'alveare. Le api percepiscono gli spazi della griglia come fori che mettono in pericolo la struttura dell'alveare, e sono quindi indotte a raccogliere più propoli del normale, per poterli coprire. Si raccoglie congelando la rete e scuotendo via il prodotto che si chiama a scaglie, per la sua forma caratteristica. Questo secondo tipo di propoli è priva di quei contaminanti materiali (insetti, legno), che sono presenti invece nel prodotto grezzo. Se la propoli grezza è quindi un prodotto naturale dell'alveare, che si otterrebbe comunque durante la pulizia annuale, quella a scaglie è invece un vero e proprio surplus, che può portare la produzione fino a 400 g per alveare per anno (www.apicoltura2000.it).

1. Composizione chimica della propoli

La propoli si presenta come un materiale giallo bruno, resinoso, che si ammorbidisce quando la temperatura sale oltre i 40 °C [2, 8]. Ad un superficiale esame visivo, è possibile notare striature che indicano una chiara inomogeneità di composizione, e impurezze che possono essere legno, resti di insetti, polline [2, 8]. La propoli può essere frazionata per trattamento con diversi solventi. In letteratura è riportato il seguente schema di composizione [35]:

- 50 % balsamo o resina;

- 30 % cera;
- 10 % olio essenziale
- 5 % polline;
- 5 % di detriti e insolubile.

La composizione chimica della propoli è molto variabile, soprattutto in funzione dell'origine botanica del materiale raccolto dalle api che è usato nella sua manifattura. In tabella **S1** sono riportate le principali classi di composti e le specie più comunemente riscontrate in campioni di propoli [8]. Altri elenchi, meno esaurienti di quello riprodotto in Tabella **S1**, sono stati riportati da Walker e Greenaway [29, 36]. Nessun elenco, comunque, può considerarsi esauriente, né deve intendersi che ogni campione di propoli contenga tutti e/o soltanto i composti elencati.

I flavonoidi sono sostanze ubiquitarie nel mondo naturale, caratterizzati da un nucleo benzo γ -pironico e più funzionalità fenoliche o eteree sui due anelli aromatici (Figura **S1**). I flavonoidi sono poi ulteriormente classificati in funzione del legame tra i carboni 2-3 e della presenza o meno di una funzionalità ossidrilica in posizione 3 (Figura **S1**). Nei sistemi biologici, questi composti svolgono ruoli assai importanti, tra cui la protezione dell'organismo dall'eccesso di specie tossiche, come i radicali liberi o i metalli pesanti. L'azione dei flavonoidi è possibile grazie al loro basso potenziale di riduzione, che trae origine dall'esteso sistema di coniugazione, e che permette di delocalizzare elettroni o cariche libere. L'azione di riduzione o ripulitura di radicali liberi si esplica con l'apertura dell'anello alla posizione 1 della funzione eterea, dove è presente l'ossigeno etereo, e la formazione di specie caratterizzate da un solo anello aromatico, derivati dell'acido benzoico (Figura **S2**) [19].

<i>Basic structure</i>	<i>Compound *</i>
Alcohols	Benzene methanol ^{rt} ; cinnamyl alcohol ^{rt} ; glycerol ^w ; α -glycero phosphate ^{rt} ; hydroquinone ^{rt} ; isobutenol ^t ; phenethyl alcohol ^{rt} ; prenyl alcohol ^t
Aldehydes	Benzaldehyde ^t ; caproic aldehyde ^t ; <i>p</i> -hydroxybenzaldehyde ^t ; isovanillin ^{ghit} ; protocatechualdehyde ^{rt} ; vanillin ^{ghirt}
Aliphatic acids and aliphatic esters	Acetic acid ^t ; angelic acid ^t ; butyric acid ^t ; crotonic acid ^t ; fumaric acid ^t ; isobutyric acid ^t ; methylbutyric acid ^t ; isobutyl acetate ^t ; isopentyl acetate ^t ; isopentenyl acetate ^t
Amino acids	Alanine ^{opz} ; β -alanine ^o ; α -amino butyric acid ^o ; δ -amino butyric acid ^o ; arginine ^{opz} ; asparagine ^p ; aspartic acid ^{opz} ; cystine ^{op} ; cysteine ^z ; glutamic acid ^{opz} ; glycine ^{opz} ; histidine ^{opz} ; hydroxyproline ^o ; isoleucine ^{opz} ; leucine ^{opz} ; lysine ^{opz} ; methionine ^{opz} ; ornithine ^o ; phenylalanine ^{opz} ; proline ^{opz} ; pyroglutamic acid ^{ot} ; sarcosine ^o ; serine ^{oz} ; threonine ^{opz} ; tryptophan ^{op} ; tyrosine ^{opz} ; valine ^{opz}
Aromatic acids	<i>p</i> -Anisic acid ^{lrt} ; benzoic acid ^{ghilrtvwx} ; caffeic acid ^{oghirtv} ; cinnamic ^{ghirt} ; coumaric(- <i>o</i> ,- <i>m</i> ,- <i>p</i>) acid ^{ghirtv} ; 3,4-dimethoxycinnamic acid ^{rtvwx} ; ferulic acid ^{dghilrtvwx} ; gallic acid ^{ghil} ; gentisic acid ^{ghi} ; hydroxycinnamic acid ^{rt} ; <i>p</i> -hydroxy benzoic acid ^{ghilrt} ; isoferulic acid ^{ghirtvwx} ; 4-methoxy cinnamic acid ^{rtv} ; protocatechuic acid ^{ghilt} ; salicylic acid ^{ghi} ; vanillic acid ^{rtvwx} ; veratric acid ^{rt}
Aromatic esters	Benzyl acetate ^t ; benzyl benzoate ^{rt} ; benzyl caffeate ^{rtvwx} ; benzyl coumarate ^{lrt} ; benzyl-3,4-dimethoxycinnamate ^{rt} ; benzyl ferulate ^{rtv} ; benzyl isoferulate ^{rt} ; benzyl salicylate ^{rt} ; butenyl caffeate ^{rtv} ; butyl caffeate ^t ; cinnamyl benzoate ^t ; cinnamyl caffeate ^{rtv} ; butyl caffeate ^{rtvwx} ; cinnamyl coumarate ^{rt} ; cinnamyl isoferulate ^{rt} ; ethyl benzoate ^t ; ethyl caffeate ^v ; methyl benzoate ^t ; 2-methyl-2-butenyl caffeate ^{rt} ; 3-methyl-2-butenylcaffeate ^{wx} ; 3-methyl-3-butenyl caffeate ^{tvwx} ; 3-methyl-3-butenyl coumarate ^t ; 3-methyl-2-butenylferulate ^{tvwx} ; 3-methyl-3-butenyl ferulate ^{twx} ; 2-methyl-2-butenyl isoferulate ^{twx} ; 3-methyl-3-butenylisoferulate ^{twx} ; methyl salicylate ^{twx} ; phenyl ethyl caffeate ^{twx} ; phenyl ethylcoumarate ^{rtvwx} ; phenylethylisoferulate ^{rtvwx} ; pentyl caffeate ^v ; pentenyl caffeate ^{rtv} ; pentenyl ferulate ^v ; prenylcaffeate ^t ; prenyl coumarate ^t ; prenyl ferulate ^t ; prenyl isoferulate ^t
Chalcones and dihydrochalcones	Alpinetin chalcone ^{tw} ; naringenin chalcone ^t ; pinobanksin chalcone ^{rtw} ; pinobanksin-3-acetate chalcone ^{rt} ; pinocembrin chalcone ^{rtw} ; pinostrobin chalcone ^{rtvwx} ; sakuranetin chalcone ^t ; 2',6',a-trihydroxy-4'-methoxy chalcone ^{rt} ; 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydro chalcone ^{tw} ; 2',4',6'-trihydroxydihydro chalcone ^{tw}

Tabella S1. Elenco delle classi dei composti e delle specie più comunemente riscontrate in campioni di propoli, riprodotto da Marcucci [8]

<i>Basic structure</i>	<i>Compound *</i>
Flavanones	Naringenin [†] ; pinobanksin ^{Intw} ; pinobanksin-3-acetate ^{mntw} ; pinobanksin-3-butyrate [†] ; pinobanksin-3-hexanoate [†] ; pinobanksin-3-methyl ether ^{tw} ; pinobanksin-3-pentanoate ^{tw} ; pinobanksin-3-pentenoate [†] ; pinobanksin-3-propanoate ^{tw} ; pinocembrin ^{bgklrtvw} ; pinostrobin ^{fgltvw} ; sakuranetin ^{fgltw} ; 3,7-dihydroxy-5-methoxyflavanone ^v ; 2,5-dihydroxy-7-methoxyflavanone ^v
Flavones and flavonols	Acaceting ^{ghiklm} ; apigenin ^{ghiklmt} ; apigenin-7-methyl ether ^t ; chrysin ^{ghiklm} ; fisetin [†] ; galangin ^{aghiklmrtw} ; galangin-3-methyl ether ^{mrtw} ; izalpinin ^{gmnrw} ; isorhamnetin ^{gklmn} ; kaempferide ^{ghilnt} ; kaempferol ^{ghiklmnt} ; kaempferol-3-methyl ether ^t ; kaempferol-7-methyl ether ^t ; kaempferol-7,4'-dimethyl ether ^t ; pectolarigenin ^{glm} ; quercetin ^{ghikit} ; quercetin-3,7-dimethyl ether ^{nt} ; ramnetin ^{gklmt} ; ramnocitrin ^{lm} ; tectocrisin ^{ghiklnt}
Hydrocarbons esters ethers, hydroxy and keto waxes	Heneicosane ^{rswy} ; hentriacontane ^{rswy} ; heptacosane ^{rswy} ; hexacosane ^w ; nonacosane ^{rswy} ; pentacosane ^{rswy} ; tricosane ^{rswy} ; tripentacontane ^y ; tritriacontane ^{rswy} ; dotriacontylhexadecanoate ^u ; dotriacontyl-[(Z)-octadec-9-enoate] ^u ; hexacosylhexadecanoate ^u ; hexacosyl-[(Z)-octadec-9-enoate] ^u ; octacosylhexadecanoate ^u ; octacosyl-[(Z)-octadec-9-enoate] ^u ; tetracosylhexadecanoate ^u ; tetracosyl-[(Z)-octadec-9-enoate] ^u ; tetratriacontylhexadecanoate ^u ; tetratriacontyl-[(Z)-octadec-9-enoate] ^u ; triacontylhexadecanoate ^u ; triacontyl-[(Z)-octadec-9-enoate] ^u
Waxy acids	Arachid acid ^u ; behenic acid ^{ru} ; cerotic acid ^{ru} ; lauric acid ^u ; linoleic acid ^f ; lignoceric acid ^{ruw} ; montanic acid ^{rw} ; myristic acid ^{ruv} ; oleic acid ^{ru} ; palmitic acids ^{ruv} ; stearic acid ^{ruv}
Ketones	Acetophenone ^{rtv} ; <i>p</i> -acetophenolacetophenone ^{rt} ; dihydroxyacetophenone ^v ; methylacetophenone ^v ; hept-5-en-2-one ^t ; 6-methylketone ^t
Terpenoids and other compounds	α -Acetoxibetulenol ^{ehl} ; β -bisabolol ^{ehl} ; 1,8-cineole ^{rt} ; α -copaene ^{rt} ; cymene ^{rt} ; limonene ^{rt} ; pterostilbene ^{lr} ; styrene ^{rt} ; xanthoreol ^l ; xylitol ^x ; naphthalene ^{rt} ; 4-hexanolactone ^{rt} ; sesquiterpene alcohol ^{rtw} ; sesquiterpene alcohol ^{rtw} ; sesquiterpene diol ^{rtw}
Steroids	Calinasterol acetate ^l ; β -dihydrofucosterol acetate ^l ; uosterol acetate ^l ; stigmasterol acetate ^l
Sugars	Fructofuranose-1 ^{rwx} ; fructofuranose-2 ^{rwx} ; α -D-glucopyranose ^{wx} ; β -D-glucopyranose ^{wx}

* Common name. ^a Villanueva *et al*, 1964; ^b Villanueva *et al*, 1970; ^c Cizmárik and Matel, 1970; ^d Cizmárik and Matel, 1973; ^e Ghisalberti, 1979; ^f Ghisalberti *et al*, 1978; ^g Vanhaelen and Vanhaelen, 1979a; ^h Vanhaelen and Vanhaelen, 1979b; ⁱ Vanhaelen and Vanhaelen, 1980; ^j Maciejewicz *et al*, 1982; ^k Bankova *et al*, 1983; ^l Debuyser, 1983; ^m Nagy *et al*, 1985; ⁿ Pápay *et al*, 1985a; ^o Gabrys *et al*, 1986; ^p Moreira, 1986; ^q Bankova *et al*, 1987; ^r Greenaway *et al*, 1987; ^s Seifert and Hasslinger, 1989; ^t Greenaway *et al*, 1990; ^u Seifert and Hasslinger, 1991; ^v Bankova *et al*, 1992b; ^w García-Viguera *et al*, 1992; ^x García-Viguera *et al*, 1993; ^y Marcucci *et al*, 1993; ^z Marcucci *et al*, 1994a.

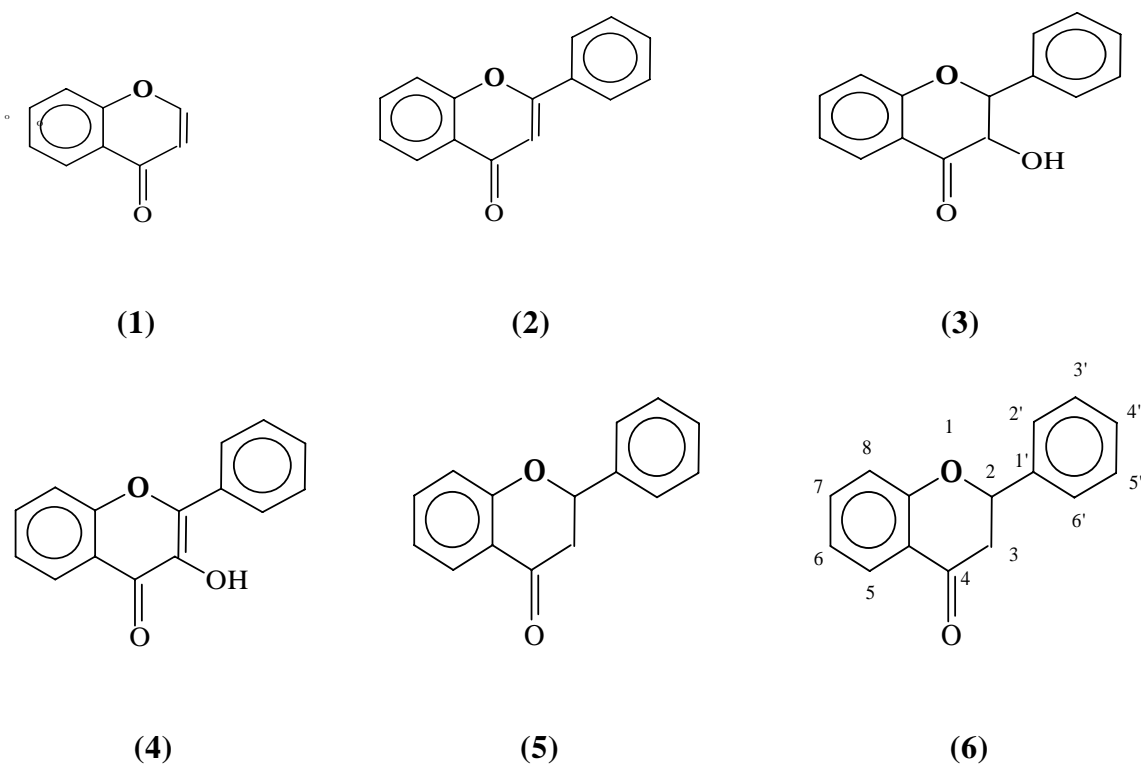


Figura S1. Strutture di base dei flavonoidi: (1) nucleo benzo γ -pironico comune a tutti i flavonoidi (2) flavoni (3) diidroflavonoli (4) flavonoli (5) flavanoni (6) numerazione anelli per la posizione dei sostituenti

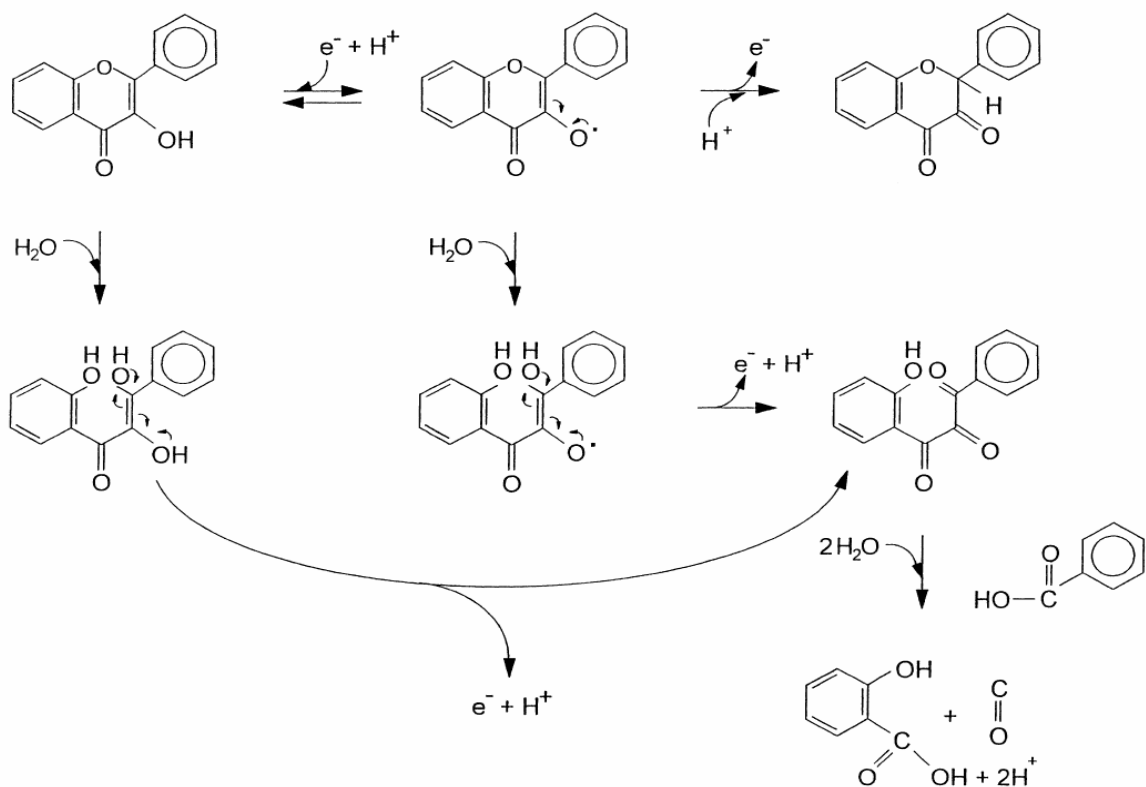
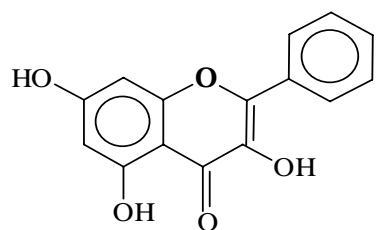
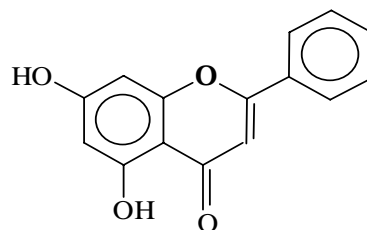


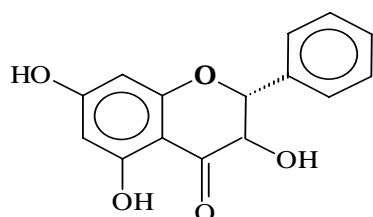
Figura S2. Reazioni di ossido-riduzione tipiche dei flavonoli, riprodotto da Havsteen [19]



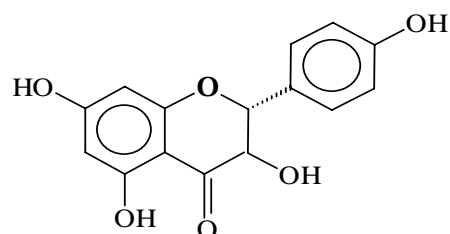
(1)



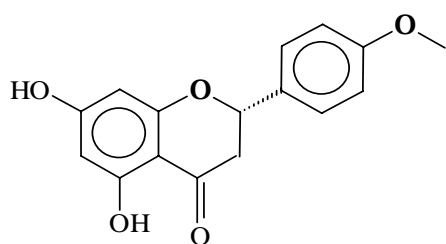
(2)



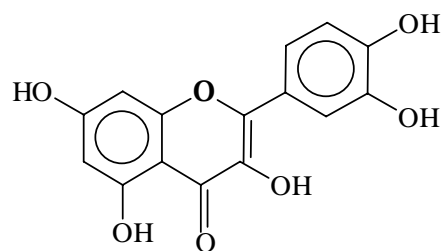
(3)



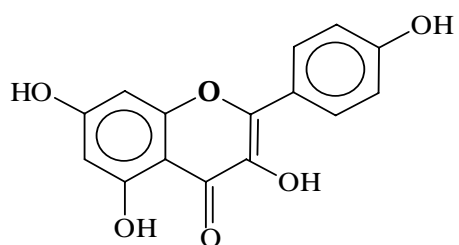
(4)



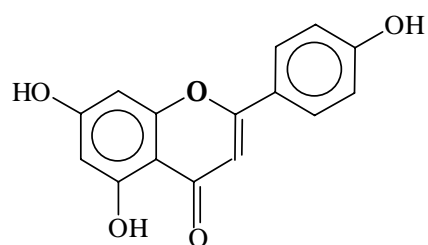
(5)



(6)



(7)



(8)

Figura S3. Alcuni flavonoidi tipici della propoli di pioppo (1) galangina (2) crisina (3) pinocebrina (4) naringenina (5) isosakuranetina (6) quercetina (7) kaempferolo (8) apigenina

I flavonoidi sono i composti più caratteristici della propoli di pioppo (figura **S3**). Il contenuto di flavonoidi totali nella propoli di pioppo, misurati mediante spettrofotometria, è piuttosto variabile. Bankova ha dichiarato che una propoli di pioppo tipica ideale dovrebbe contenere 8 ± 4 % di flavoni/flavonoli, 6 ± 2 % di flavanoni/diidroflavonoli e 28 ± 9 % di fenoli totali. I valori di flavonoidi sembrano in linea con quelli determinati per campioni di propoli europea [37, 38]. Tuttavia i valori di letteratura indicano una deviazione per eccesso da tali valori: molti autori infatti hanno riscontrato che il contenuto di flavonoidi totali è leggermente inferiore, ma comunque molto prossimo a quello dei fenoli totali. Questo dato indica che nella propoli di pioppo i flavonoidi sono i fenoli principali [38, 39].

Anche i fenoli non flavonoidici, come per esempio gli acidi cinnamici, sono ampiamente rappresentati nella propoli di pioppo (Tabella **S1**, Figura **S4**). Anche queste specie hanno una capacità antiossidante e di eliminazione di radicali liberi [40].

Il contenuto dei fenoli totali nella propoli determinati mediante spettrofotometria (Stato dell'arte, **3.5**) varia dal 5 al 43 % della massa della frazione balsamica, e quindi la variabilità è molto forte [5, 38, 39, 41]. Il contenuto totale di fenoli è stato correlato con diverse proprietà misurabili della propoli: capacità antibatterica, potere antiossidante, capacità di catturare i radicali liberi [5, 8, 42-49].

Componenti minori della propoli di pioppo sono, tra le altre, terpeni, alcoli, terpenoidi, aldeidi, steroli (vedi Tabella **S1**) [29, 30, 38, 50].

Campioni di propoli brasiliana, provenienti da parti diverse di questo paese, hanno mostrato di avere un'origine botanica diversa, e sono caratterizzabili dalla presenza di composti specifici. In alcuni campioni provenienti dalla regione di San Paolo, è stata trovata una bassa concentrazione di flavonoidi ed è stata registrata la presenza di acidi cinnamici prenilati (Figura **S5**), caratteristici della specie *Baccharis dracunculifolia* [51-53]; altri campioni, sempre dalla regione di San Paolo, sono caratterizzati dalla presenza di acetofenoni prenilati, tipici invece della specie *Fluorensia heterolepis* [51]; in campioni dal Brasile meridionale sono stati trovati alcuni diterpeni derivati dal labdano come per esempio l'acido isocupressico (Figura **S5**), caratteristici dell'*Araucaria heterophylla*; un altro campione mostrava un profilo assai povero di frazione balsamica, caratterizzato quasi soltanto da idrocarburi e acidi grassi [54], di cui non è stato possibile

determinare un'origine botanica, ma che potrebbe essere composto quasi esclusivamente di cera d'api.

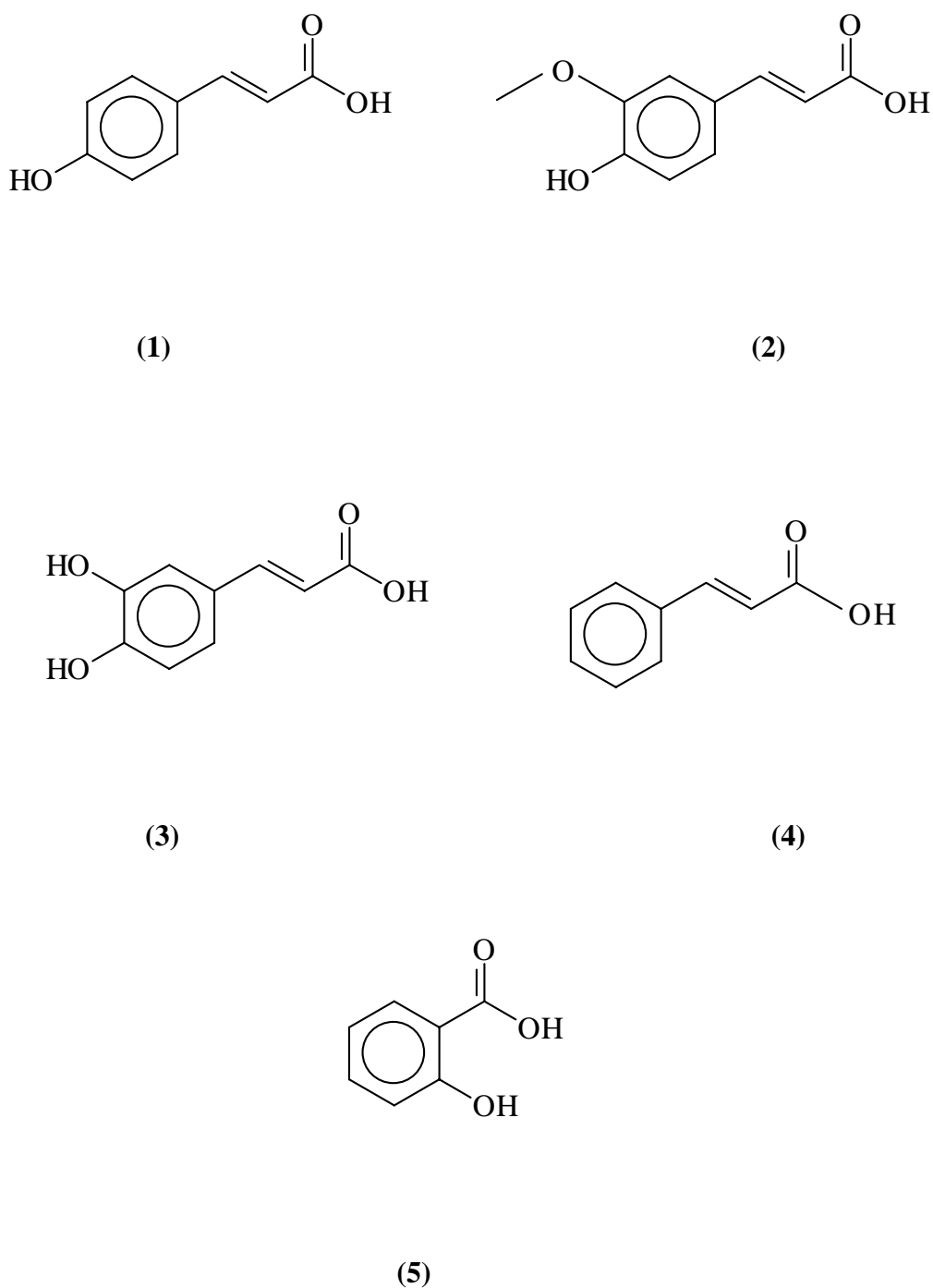
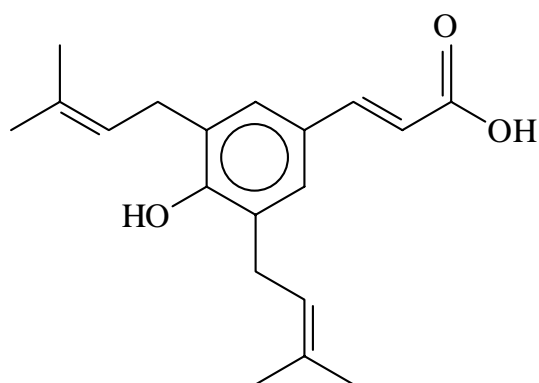
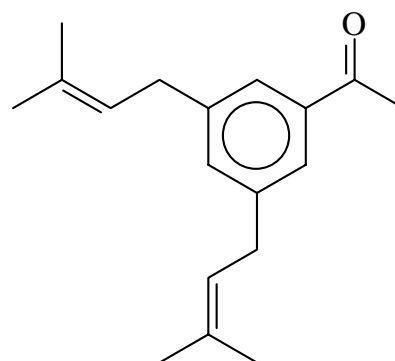


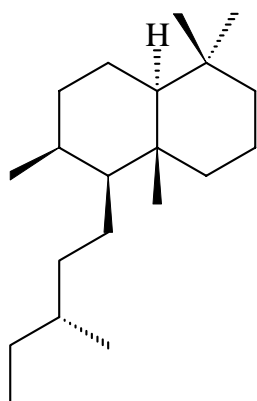
Figura S4. Acidi cinnamici e benzoici tipici della propoli di pioppo (1) acido p-cumarico (2) acido ferulico (3) acido caffeico (4) acido t-cinnamico (5) acido salicilico



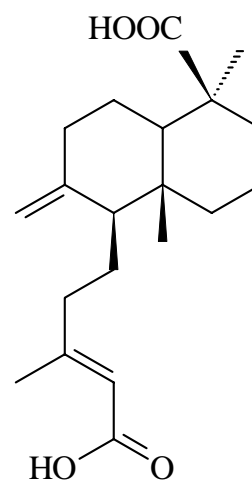
(1)



(2)



(3)



(4)

Figura S5. Alcuni composti caratteristici della propoli brasiliana (1) acido 3,5 diprenil p-cumarico (2) diprenil acetofenone (3) labdano (4) acido isocupressico

Altri lavori sono disponibili in letteratura, che descrivono composizione, specie caratteristiche e origine botanica di propoli provenienti da diverse parti del mondo. La propoli giapponese è generalmente assimilabile a quella delle regioni temperate di pioppo, ma nello stesso lavoro [43] gli autori riportano che, tra tutti i campioni esaminati, quello proveniente da Okinawa, l'isola più meridionale del Giappone, a clima praticamente tropicale, ha un profilo HPLC completamente diverso da tutti gli altri, e non contiene nessuno dei flavonoidi tipici della propoli di pioppo. E'

emerso che i componenti principali e più caratteristici della propoli di Okinawa sono flavonoidi prenilati (Figura S6) [45]. Tali specie sono state rilevate anche in campioni di propoli provenienti da Taiwan (Figura S7) [55-57].

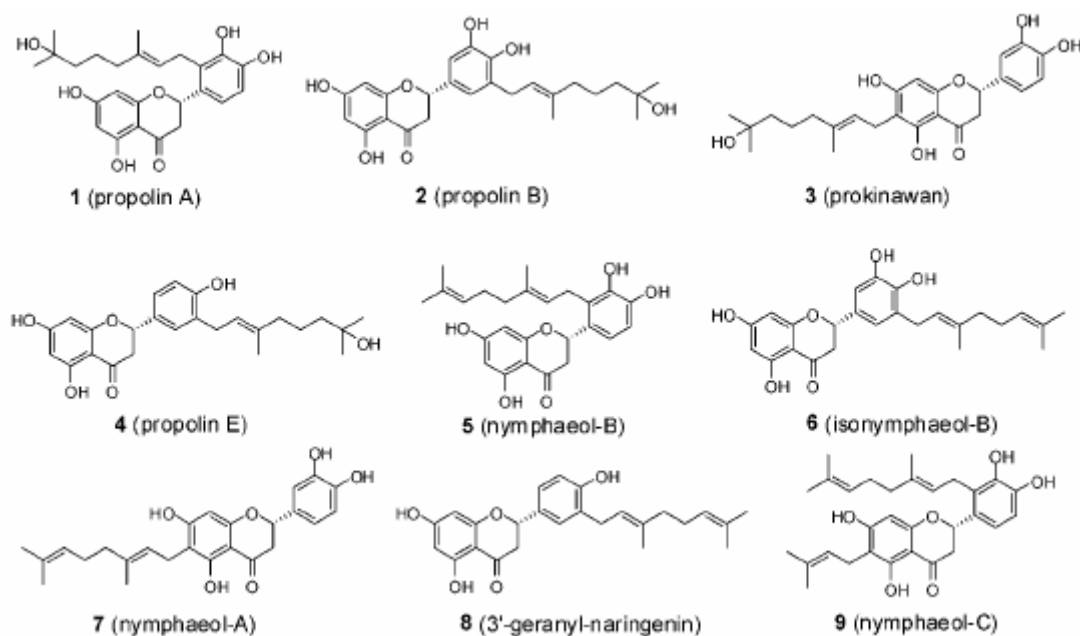


Figura S6. Flavonoidi prenilati isolati da campioni di propoli proveniente dall'isola di Okinawa (Giappone meridionale). Riprodotto da Kumazawa [45]. Sono stati isolati in campioni di propoli taiwanese la (1) propolina A e la (2) propolina B

La propoli venezuelana contiene benzofenoni prenilati (Figura S8); tali specie sono caratteristiche di due piante tropicali, *Clusia minor* e *Clusia major*, e questo risultato ha permesso di concludere che in Venezuela le api raccolgono il balsamo di propoli da queste piante [58]. Composti provenienti dalla stessa classe sono stati rivelati in alcuni campioni di propoli cubana [59], chiamata "marrone" (vedi anche Stato dell'arte, 3.3). Gli autori hanno perciò concludere che, come anche per la propoli venezuelana, la materia prima usata per la frazione balsamica di questi campioni fossero specie di *Clusia*. L'analisi di altri campioni di propoli cubana, chiamata "rossa", ha invece evidenziato la presenza di isoflavonoidi e pterocarpani (figura S8), fino ad allora mai riscontrati in nessun altro campione di propoli conosciuto. Tali specie sono caratteristiche quasi esclusivamente di alcune leguminose [60]. E' stato caratterizzato anche un terzo tipo di propoli cubana, detta "gialla", che dovrebbe essere composta quasi solo di terpeni, terpenoidi e specie idrocarburiche, e non è stato possibile risalire all'origine botanica. Alcuni campioni di propoli cubana contengono solo un tipo di propoli, ma altri sono misti di propoli gialla-marrone o gialla rossa [61].

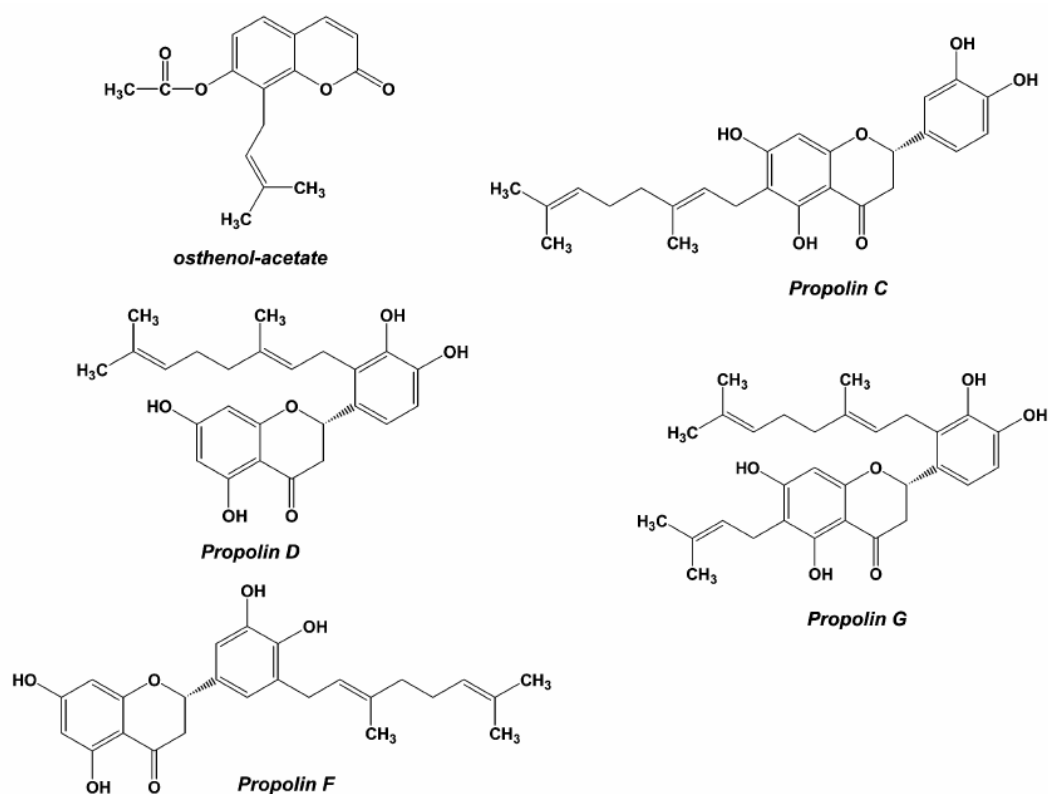


Figura S7. Flavonoidi prenilati da campioni di propoli dall'isola di Taiwan. Riprodotto da Lin [57]

La presenza di pterostilbene in alcuni campioni di propoli australiana indica che in quel continente la materia prima usata dalle api per la manifattura della frazione balsamica della propoli provenga anche da specie di *Xanthorrhoea* [62]. La propoli proveniente dal deserto dell'Arizona può essere di pioppo, ma alcuni campioni hanno un'origine completamente diversa. Alcuni di questi sono ricchi di flavonoidi altamente metossilati, tipici dell'*Ambrosia deltoidea*; altri da specie basati su benzopirani e benzofurani, tipici di un'altra specie, *Encelia farinosa*. Altri campioni, infine, sono misti, contenendo specie provenienti da entrambe queste specie indicate [63].

I componenti più importanti di alcuni campioni di cera da propoli brasiliana sono idrocarburi a catena lunga, quasi tutti a numero dispari di atomi di carbonio, e monoesteri di alcoli primari con acidi grassi saturi o monoinsaturi da acido oleico: gli autori sottolineano che i componenti sono quelli tipici della cera d'api, e che ci sono invece differenze sostanziali con le cere vegetali [64]. In un altro lavoro è stata messa in evidenza la similarità di composizione della frazione idrocarburica e dei prodotti di idrolisi dei monoesteri delle cere da propoli e da alveare rispettivamente [65]. Gli autori hanno concluso che la frazione cerosa delle propoli esaminate fosse cera d'api, e non avesse un'origine vegetale, a differenza di quello che succede con la frazione balsamica.

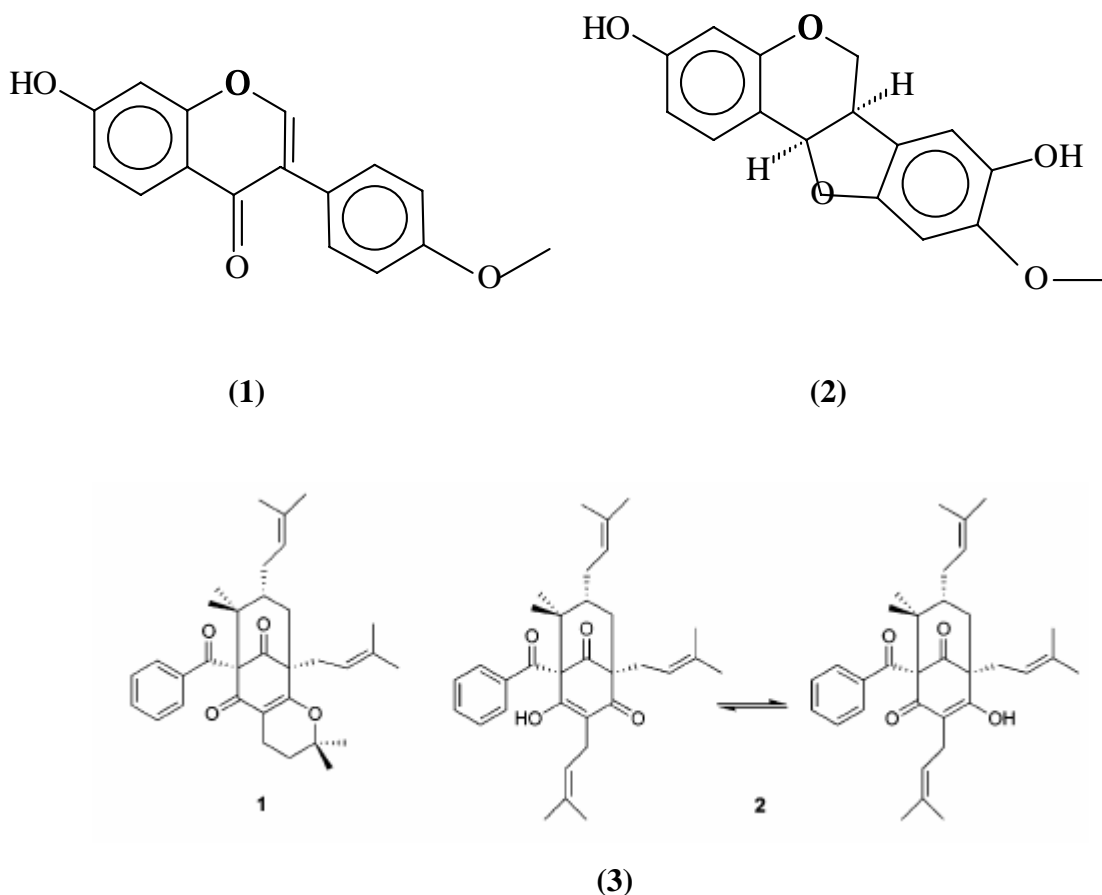


Figura S8. Specie caratteristiche di campioni di propoli cubana (1) un isoflavonoide (2) un pterocarpano, entrambi caratteristici della propoli rossa, riprodotto da Rastrelli [60]; (3) alcuni dei benzofenoni prenilati caratteristici della propoli marrone, riprodotto da Rastrelli [59], rispettivamente propolone A e nemorosone

Un recente lavoro, in cui i dati di analitici di composizione di cere di propoli e di alveare raccolti sono rielaborati mediante le analisi chemiometriche HCA e PCA, ha permesso anche di evidenziare differenze tra due gruppi di campioni di cera provenienti da due diverse località geografiche [66], con differenze strutturali basate sull'abbondanza relativa sia degli idrocarburi sia dei prodotti di idrolisi dei monoesteri. Nonostante la differenza geografica, poiché i componenti delle cere provengono dal metabolismo primario, gli autori escludono che le differenze possano essere determinate dall'origine botanica, ma trarrebbero piuttosto origine dalla differenza genetica di api presenti in luoghi geograficamente diversi. È importante notare come la cera analizzata in campioni brasiliani sembra avere una composizione molto diversa rispetto a quella prodotta dalle *Apis mellifera* in zone temperate. Quest'ultima è infatti ricca anche di diesteri e triesteri, idrossi monoesteri e idrossi poliesteri [67], mentre le cere brasiliane analizzate sono sostituite principalmente da idrocarburi e monoesteri, e non vi è traccia di diesteri, triesteri o dioli nell'idrolizzato. Non è riportato in letteratura alcuna informazione su frazioni cerose da propoli di

regioni temperate, e i composti riportati in tabella **S1** non sembrano indicare la presenza di dioli [8].

2 Solubilizzazione e frazionamento

2.1 Solubilizzazione

La dissoluzione in etanolo assoluto o in idroalcolica è il metodo più diffuso, anche se non l'unico, per studiare la frazione balsamica [8]. Il trattamento della propoli grezza con etanolo assoluto porta alla dissoluzione non solo delle frazioni balsamiche e di olio essenziale, ma anche di una parte delle cere, che devono poi essere eventualmente precipitate per raffreddamento e allontanate per filtrazione [27]; al contrario, il trattamento con idroetanoliche produce soluzioni nelle quali la frazione cerosa non dovrebbe disciogliersi [20]. L'utilizzo di idroetanoliche al 70 % porta a soluzioni più concentrate in polifenoli rispetto a quelle ottenute con l'utilizzo di etanolo assoluto (T ambiente, tempi diversi) [68]. Uno studio è stato condotto per valutare un numero di parametri caratteristici in funzione della composizione dell'idroalcolica usata per la dissoluzione [69]. Tale studio indica che il massimo del coefficiente di estinzione UV-VIS si ha per gli estratti ottenuti con la idroalcolica 80/20 EtOH/H₂O. L'analisi HPLC mostra comunque come diversi flavonoidi raggiungano picchi di concentrazione a diverse composizioni dell'idroetanolica. I valori riportati da Park [70] per la frazione balsamica di oltre cinquecento campioni di propoli brasiliana vanno dal 40 % al 65 %, con alcuni gruppi di propoli dal Nord-est del Brasile che hanno un contenuto molto inferiore, intorno al 25 %. Anche i risultati ottenuti su alcuni campioni di propoli nordamericana mostrano una enorme variabilità [71]. In questo caso l'estrazione della componente balsamica è stata condotta con MeOH/H₂O 80/20; usando questa miscela, la frazione solubile nell'idrometanolica in campioni provenienti dall'Ohio era di oltre il 70 %, mentre in campioni dalla Georgia del Nord e del Sud 55 % e 22 % rispettivamente. L'estrazione con idroalcoliche al 70 % di propoli cinesi ed uruguayane conduce a valori tra 65 e 82 % [5], e a valori analoghi, tra 73,4 e 80,3 %, in un secondo lavoro [39]. Questi dati indicano come i valori di frazioni ponderali, più volte riportati in letteratura come specifici della propoli [35] (Stato dell'arte, **1**), debbano considerarsi del tutto indicativi, poiché la provenienza geografica e altri fattori possono influenzare in maniera sostanziale i rapporti tra le varie frazioni ponderali.

Per lo studio della frazione cerosa sono stati proposti diversi metodi di isolamento. Il trattamento del prodotto grezzo in un apparato Soxhlet è il più comune, ed è stato condotto con etere di petrolio

[5], con etanolo e successiva riprecipitazione [68], con cloroformio [65]. Le cere possono essere anche riprecipitate da soluzione cloroformica per trattamento con metanolo bollente [64]. La determinazione della frazione ponderale della cera è importante perché la propoli grezza può essere adulterata per aggiunta di cera, alterando i rapporti di massa e riducendo la percentuale di frazione balsamica [64]. Gli studi sperimentali sulle cere da propoli, condotti su campioni di origine brasiliana, indicano contenuti percentuali di cere pari a 4-8 % [68], 2-17 % [64], 5-20 % [65], tendenzialmente inferiori a quelli normalmente misurati nei campioni di origine temperata. I valori ottenuti da quindici campioni di propoli uruguayana e cinese mostrano valori molto variabili, compresi tra 19 e 31 %, con l'eccezione di tre campioni che hanno valori molto inferiori e compresi tra 2 e 8 % [5]; gli stessi autori hanno esaminato altre quindici propoli di eguale origine, trovando valori tra 12,3 e 19,4 % [39]. L'estrazione con CO₂ supercritica di campioni di propoli solida (di origine non specificata) consente di separare la frazione cerosa, il cui ammontare era 20-27 % della massa totale [72]. L'estrazione con idrometanolica di propoli statunitense [71] lasciava residui insolubili di 25 % circa per campioni dell'Ohio, 55 % per campioni della Georgia del Nord e 76 % per campioni della Georgia del Sud. Gli autori dichiarano che il residuo insolubile è costituito principalmente di cera, sebbene manchi una indicazione della quantità di detriti ed insolubile presenti. Come anche per la frazione balsamica, quindi, anche l'esame della frazione di massa delle cere contenute nella propoli mette in rilievo una notevole variabilità individuale dei singoli campioni.

La determinazione ponderale della frazione volatile è importante perché è un indicatore della freschezza del prodotto. La misura della massa di olio essenziale da propoli brasiliana indica percentuali di massa dell'ordine di 0,5 % [64]. Tale valore risulta congruente con quelli registrati in due diversi lavori su diversi campioni di propoli cinesi ed uruguayane, dove l'olio essenziale risulta essere nel range 0,58-1,30 % e 0,57-1,17 % rispettivamente [5, 39]. Tali valori risultano davvero molto bassi rispetto al 10 % usualmente riportato in letteratura [35] (Stato dell'arte, 1).

2.2 Frazionamento

Sono stati proposti processi per la produzione di frazioni della propoli, nel tentativo di ottenere miscele più attive rispetto agli estratti tal quali. E' stata misurata l'attività, contro batteri del cavo orale, di frazioni ottenute per successive ripartizioni liquido-liquido degli estratti idroalcolici (Figura S9), rispetto a quella della propoli tal quale. Nessuna frazione ha mostrato un'attività superiore a quella dell'estratto tal quale; questo risultato mette in rilievo la

difficoltà di individuare ed isolare una specifica specie singolarmente responsabile dell'attività in esame [73]. Un altro trattamento basato sulla ripartizione multipla di solventi è stata proposta, finalizzata a verificarne l'efficacia nella lotta contro la camola del miele (*Galleria melonella*, una falena le cui larve infestano gli alveari nutrendosi di cera e polline). Gli estratti idrometanolici sono stati concentrati ed estratti con etere di petrolio, quindi con acetato di etile, e quest'ultima fase di nuovo ripartita con etere di petrolio. La frazione residua in acetato di etile è quindi frazionata su resina Sephadex con un gradiente H₂O-MeOH, ottenendo quattro frazioni. Nei test biologici, però, nessuna frazione ha mostrata un'efficacia superiore rispetto a quella mostrata dalla propoli tal quale [71].

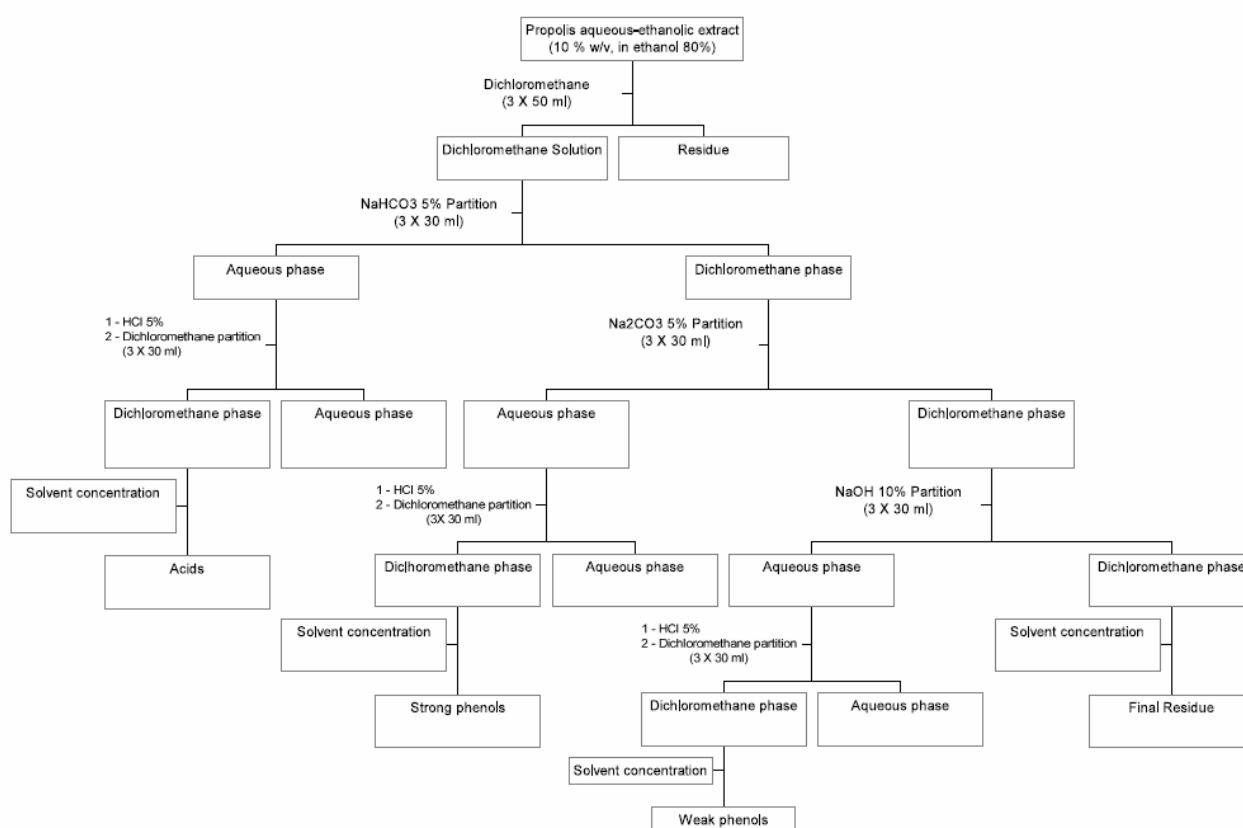


Figura S9. Schema di frazionamento di estratti idroalcolici di propoli mediante successive ripartizioni tra diclorometano e fasi acquose a pH variabile. Le frazioni non sono state caratterizzate chimicamente, ma testate per la loro capacità antibatterica. Riprodotto da Moreira [73]

Sono stati proposti processi basati sul trattamento di estratti etanolic di propoli con biossido di carbonio supercritico. In uno di questi processi, gli EEP sono miscelati con CO₂ supercritico a 60 °C e 20 MPa, e il sistema è stato sottoposto a precipitazioni successive in tre separatori con pressioni pari a 15, 10 e 5 MPa [74]. Si ottenevano perciò tre diverse frazioni F1, F2 ed F3, ed

un residuo R: quest'ultimo aveva un contenuto di flavonoidi totali maggiore sia dell'estratto tal quale sia di ciascuna delle sue frazioni. Sono state misurate diverse proprietà di questi estratti: capacità chelante nei confronti di metalli, capacità di bloccare la perossidazione dei lipidi negli omogeneizzati di fegato di topo, potere riducente, ripulitura del radicale DPPH[•] anione superossido e radicali ossidrilici. La valutazione di queste proprietà ha mostrato che la frazione R era più efficace degli estratti EEP non trattati nella ripulitura del radicale DPPH[•] (Stato dell'arte, **3.5**) e nel potere riducente. Le frazioni ottenute per precipitazione successiva nei separatori erano generalmente meno efficaci, ma F1 risultava comunque superiore agli EEP tal quali per quanto riguarda il potere riducente e la capacità di raccogliere il radicale anione superossido. E' stato proposto un altro processo per produrre frazioni arricchite in flavonoidi, basato sul potere antisolvente del CO₂ supercritico sugli EEP [75]. Il processo riesce effettivamente a produrre frazioni in cui i flavonoidi sono concentrati, ma non sono stati eseguiti test per verificarne le proprietà.

Sono state riportate diverse correlazioni tra classi di composti (fenoli e/o flavonoidi) e diverse proprietà della propoli, e spesso queste correlazioni sono risultate molto convincenti (Stato dell'arte, **1**); in tal senso, la correlazione tra l'aumento di alcune proprietà e l'arricchimento nel contenuto di flavonoidi [74] conferma il ruolo primario di queste specie nell'attività della propoli. Gli altri risultati provenienti dai frazionamenti proposti indicano però come sia difficile ottenere frazioni o composti puri che abbiano proprietà superiori a quelle della propoli. La correlazione biunivoca proprietà –composizione è perciò difficile, soprattutto quando si va a prendere in considerazione un prodotto come la propoli, che mostra una grande variabilità di composizione, e dove gli effetti sinergici con componenti minoritarie possono essere importanti [48]. Tale attività sinergica è stata ribadita da diversi autori. Sono state misurate le attività antibatterica, antivirale ed antifungina di campioni di propoli provenienti da diverse località geografiche. Gli autori rimarcano che a notevoli attività di tutte le propoli esaminate non corrisponde affatto una omogeneità di composizione, dal che ne conseguirebbe che la forza della propoli non sta nella presenza di un qualche specifico composto, ma piuttosto nell'azione sinergica di una miscela piuttosto complessa [76]. L'elevata potenza batteriostatica di alcuni campioni di propoli originarie della Cina e dell'Uruguay è stata attribuita alla sinergia di tutti i flavonoidi e i polifenoli presenti, e nessun singolo componente ha invece mostrato una simile capacità [5].

3 Analisi strumentale

3.1 Spettrofotometria UV-VIS

La spettrofotometria UV-VIS è poco diffusa per la caratterizzazione della propoli, ed i risultati ottenuti con questa tecnica sono normalmente usati insieme ad altri dati. Oltre cinquecento campioni di propoli da diverse parti del Brasile sono stati caratterizzati mediante spettrofotometria UV-VIS, cromatografia su strato sottile, HPLC-PAD, test di attività antimicrobica e antinfiammatoria [70]. In base a tali dati, è stato possibile dividere i campioni di propoli raccolti in dodici gruppi diversi (G1-G12): cinque dal Brasile Meridionale, sei dalla regione del Nord-Est, uno dalla regione del Sud-Est. Gli spettri dei dodici gruppi, registrati nell'intervallo 200-400 nm, mostrano profili piuttosto variabili: alcuni sono caratterizzati da un massimo molto pronunciato intorno ai 290-300 nm e un minimo intorno ai 250 nm. Altri sono più indistinti, senza un massimo chiaramente definibile, ed alcuni non hanno uno spettro registrabile. Lo stesso tipo di variabilità è stata riscontrata in campioni provenienti dall'Argentina meridionale. I campioni con un massimo a 290 nm e un minimo a 250 nm circa sono stati attribuiti allo stesso gruppo G3 delle propoli brasiliane [70], ed è stata associata con l'origine botanica da pioppo [47].

Sono stati misurati i coefficienti di estinzione di alcuni campioni di propoli giapponesi di pioppo, e sono stati correlati con il contenuto di polifenoli totali ($R = 0,69$) e di flavonoidi ($R = 0,83$) [43]; allo stesso modo, sono stati misurati i coefficienti di estinzione di alcuni campioni di propoli coreane e brasiliane sempre di pioppo, ed ancora è molto buona la correlazione con il contenuto di polifenoli totali ($R = 0,95$) e di flavonoidi ($R = 0,78$) [49]. Questi dati indicano che in questo tipo di propoli le specie responsabili dell'assorbimento UV sono i fenoli e soprattutto i flavonoidi. Il valore medio (media \pm SD) dei coefficienti di estinzione delle tredici propoli giapponesi è $0,0143 \pm 0,0073 \text{ ppm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [43], per una propoli brasiliana e quattro coreane $0,0353 \pm 0,0126 \text{ ppm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [49].

3.2 Analisi cromatografica

Le tecniche cromatografiche sono tra le più diffuse per la caratterizzazione di campioni di propoli. Molti lavori descrivono metodi specifici per l'analisi di flavonoidi e fenoli nella propoli [20], basati su diverse tecnologie separative e di rivelazione: sulla elettroforesi [21, 25], HPLC-PAD [24], HPLC-ESI [26] anche con la trappola ionica e analisi MS-MS [23], GC-FID di specie derivatizzate [77], GC-MS ad alta risoluzione ed alta temperatura [22]. Le tecniche cromatografiche si sono

inoltre rivelate molto efficaci nel registrare i profili qualitativi di composizione dei campioni di propoli, per poterli confrontare con quello delle resine, cioè del materiale vegetale che le api raccolgono per la manifattura della propoli. Queste analisi hanno permesso di determinare l'origine botanica dei campioni di propoli provenienti da diverse parti del mondo.

L'ampio lavoro analitico comparativo dei profili di composizione di campioni di resine di pioppo e campioni di propoli ha prodotto risultati che hanno permesso di dimostrare che nelle regioni temperate le api raccolgono la materia prima per la manifattura della propoli dai pioppi [50]. L'analisi GC-MS su campioni di propoli britannica e resine di pioppo ha permesso di mettere in evidenza una chiara correlazione nei profili di composizione dei due materiali [1, 29]. Gli autori hanno anche potuto stabilire che i profili di composizione dei campioni di propoli esaminati sono comparabili solo con quelli di alcune specifiche specie di pioppo, quelle della sezione *Aigeiros*. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dall'analisi GC dello spazio di testa di propoli britannica [78]. Lo stesso tipo di lavoro comparativo è stato condotto anche da altri autori. L'analisi GC-MS su campioni di propoli e resine di pioppo originari della Bulgaria e della Mongolia [79] ha evidenziato che la materia prima per la manifattura dei campioni di propoli bulgara è la specie *Populus nigra*, dei campioni di propoli mongola la specie *Populus Suaveolens*. I profili TLC e GC-MS di campioni di propoli provenienti da alveari del Deserto dell'Arizona sono stati confrontati con quelli e di estratti di resine di *Ambrosia deltoidea*, i cui estratti delle parti aeree mostrano un profilo flavonoidico singolare, ed *Encelia farinosa*, i cui estratti delle parti aeree sono invece caratterizzati dall'assenza di flavonoidi e la presenza di specie basate su benzofurani e benzopirani. Il confronto ha mostrato che entrambe sono effettivamente la fonte della materia prima; alcune propoli presentano estratti provenienti da una sola specie, altre sono miste [63]. Lo studio dei profili GC-MS e HPLC-PAD degli essudati di foglie e gemme da una parte e i di campioni di propoli [80, 81] ha permesso di concludere che alcuni campioni di propoli del gruppo G3, della regione Meridionale è stata quindi correlata con il pioppo, la propoli del gruppo G6 della regione Nord-Est con gli essudati di foglie e gemme di *Hyptis divaricata*, la propoli G12 del Sud-Est con gli essudati di foglie e gemme di *Baccharis dracunculifolia* (Stato dell'arte, **3.1**) (Figura **S10** e **S11**).

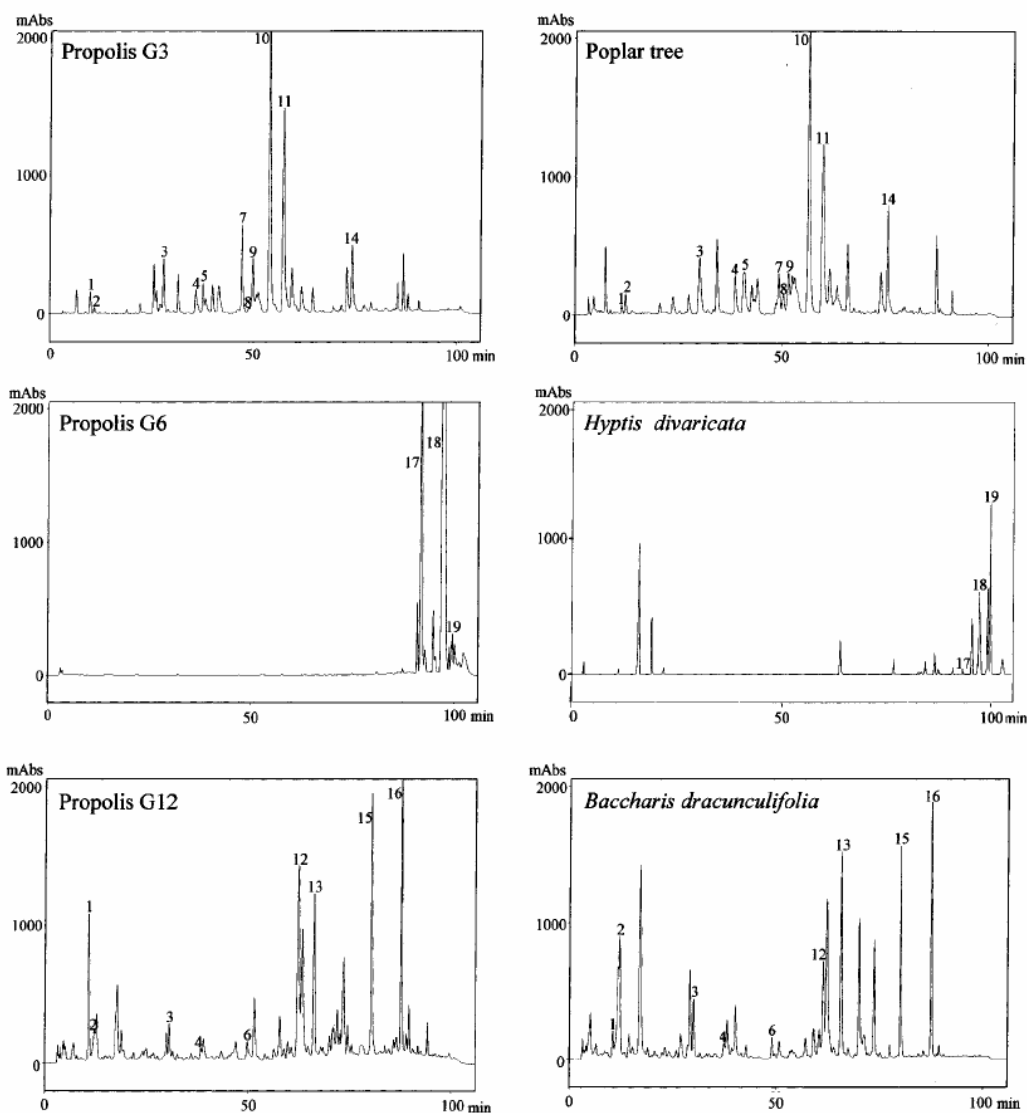


Figure 2. HPLC chromatograms of the ethanolic extracts of propolis and plant resins. 1, Coumaric acid; 2, ferulic acid; 3, pinobanksin; 4, kaempferol; 5, apigenin; 6, isosakuranetin; 7, pinocembrin; 8, dimethylallyl caffeic acid; 9, pinobanksin 3-acetate; 10, chrysin; 11, galangin; 12, kaempferide; 13, UV λ 268 nm; Rt = 66.15 min; 14, tectochrysin; 15, UV λ 231 nm; Rt = 80.25 min; 16, UV λ 223, 276 nm; Rt = 87.67 min; 17, UV λ 246 nm; Rt = 91.73 min; 18, UV λ 241, 274 nm; Rt = 97.26 min; 19, UV λ 247 nm; Rt = 99.58 min.

Figura S10. Comparazione tra cromatogrammi HPLC di resine vegetali e di propoli di origine brasiliana, $\lambda_{riv} = 268$ nm, che ha permesso di assegnare l'origine botanica, dei campioni in esame, riprodotto da Park [80]

Altri autori hanno esaminato i profili di composizione HPLC di campioni di propoli, ma non hanno svolto direttamente l'analisi comparativa con resine vegetali. Piuttosto, ne hanno assegnato l'origine botanica dalle resine di pioppo attraverso il confronto con i profili di composizione già riportati in letteratura: così per campioni dalla Corea del Sud [44], dalla Nuova Zelanda [82], dall'Argentina [47, 83], dall'Uruguay [83, 84], dal Giappone [43], dal Brasile Meridionale [83]. Molti autori si limitano ad assegnare l'origine botanica al pioppo in generale, oppure definiscono la propoli come di tipo "europeo", contrapposta ad un tipo "brasiliano".

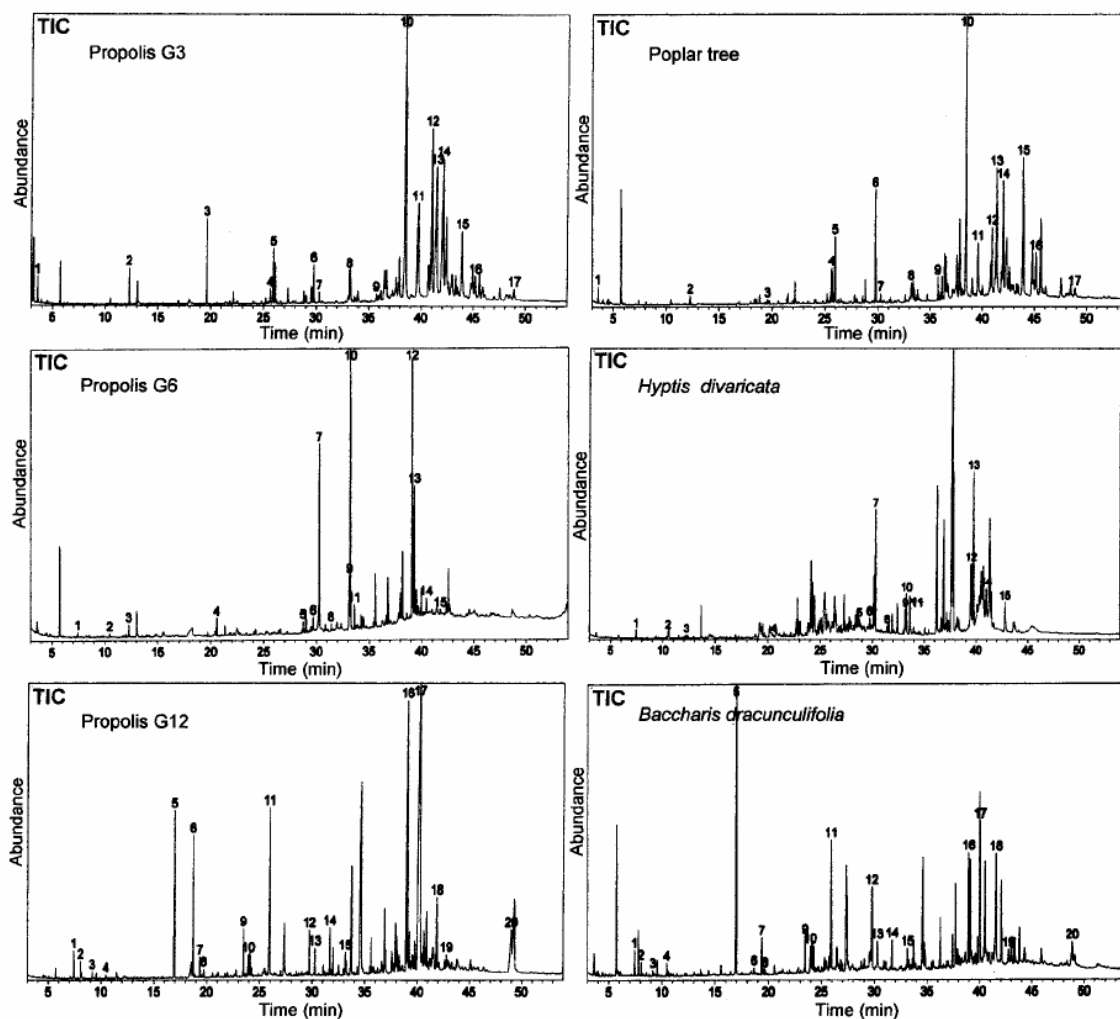


Figure 3. GC-MS profiles of ethanolic extracts of propolis and plant resins. Each line represents the total ion chromatogram (TIC) of one type of propolis (left) and its botanical origin (right). In each line the numbers of peaks represent the same compounds.

Figura S11. Comparazione tra cromatogrammi GC-MS di resine vegetali e di propoli di origine brasiliana, $\lambda_{riv} = 268$ nm, che ha permesso di assegnarne l'origine botanica, riprodotto da Park [80]

L'analisi GC-MS è in grado di evidenziare le differenze nei profili di composizione di propoli la cui origine è da pioppi di specie diversa. Abbiamo già riportato che è stato possibile distinguere le specie specifiche di origine di alcuni campioni di propoli mongole e bulgare: le prime, da *Populus Suaveolens*, è caratterizzata dal fatto di contenere soltanto un acido cinnamico e derivati, l'acido caffeico, le seconde sono invece caratterizzate per contenere una notevole varietà di questi composti [79]. L'analisi dei profili GC-MS dello spazio di testa e del balsamo di un campione di propoli britannica ha evidenziato composti appartenenti a classi non comunemente presenti nella propoli di pioppo: calconi ed idrocalconi (Figura S12). Queste classi di composti sono caratteristiche di pioppi della sezione *Tacamahaca* e/o di alcuni ibridi tra pioppi delle due sezioni *Aigeiros* e *Tacamahaca* [28, 30]. Questi dati confermano che la nozione di propoli di pioppo è una generalizzazione che si riferisce a campioni forse simili, ma certamente non coincidenti, provenienti dalle zone temperate.

Per altro, è noto dalla letteratura che non è solo il pioppo ad essere usato come fonte di materia prima per la manifattura della frazione balsamica di propoli nelle zone temperate, perché altre specie arboree sono a volte sfruttate come alternativa o complemento: salice, betulla, quercia, ontano, nocciolo in Europa, pino nel Nord America, betulla in Russia [50, 85].

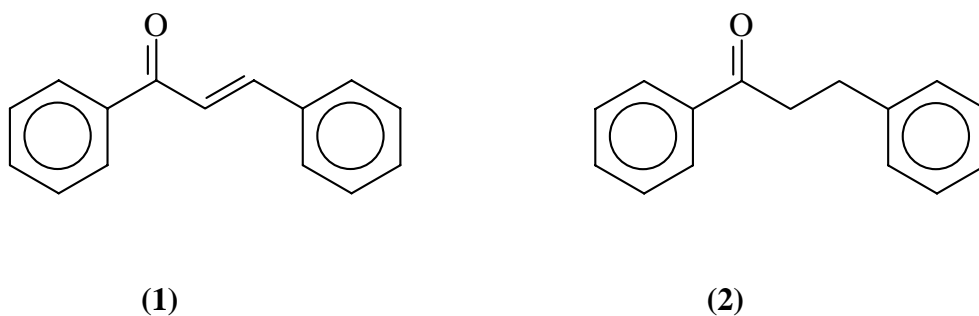


Figura S12. Strutture di base di (1) calconi e (2) idrocalconi, composti tipici della resina di pioppo della sezione Tacamahaca e trovati in alcuni campioni di propoli britannica

3.3 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare

Le tecniche cromatografiche, grazie alla loro capacità di separare i componenti di una miscela anche complessa, sono state ampiamente utilizzate per la caratterizzazione della propoli. Tuttavia, proprio nell'analisi di una miscela così complessa e variabile, si è rivelato molto valido un approccio completamente opposto, in cui si misurino pochi parametri caratteristici del sistema, piuttosto che le concentrazioni dei singoli componenti specifici. Uno di questi approcci è basato sull'utilizzo della spettroscopia NMR degli EEP.

In un lavoro molto interessante, sono stati registrati gli spettri di risonanza magnetica protonica di quarantuno idroetanoliche di campioni di propoli provenienti da diverse parti del mondo (Cina, Europa, Africa, Oceania). Gli spettri così ottenuti sono stati integrati, tra 0 e 9 ppm, in tutti gli intervalli di 0.1 ppm, per un totale di novanta valori di segnale per campione. Questi dati sono stati elaborati con l'analisi PCA, e si è trovato che la massima separazione tra i campioni si realizzava utilizzando come variabili di partenza i soli segnali ottenuti nell'intervallo 3-7 ppm, inoltre, solo trentatré campioni sono stati scelti dei quarantuno originariamente analizzati.

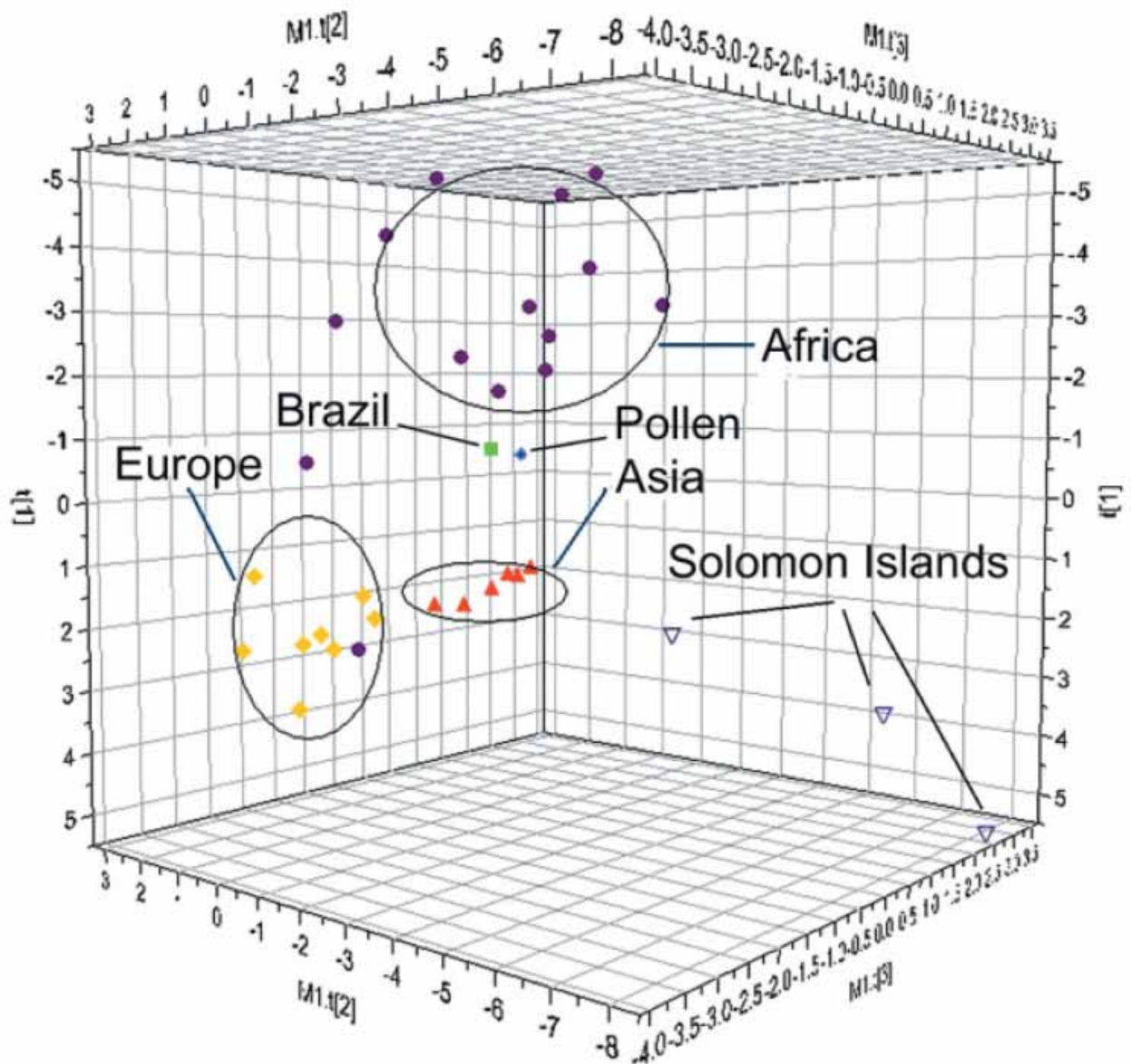


Figura S13. Analisi delle componenti principali da dati di risonanza magnetica nucleare protonica integrati in intervalli di 0,1 ppm tra 3 e 7 ppm di trentuno campioni di propoli di diversa origine botanica. Altri dieci campioni analizzati erano outliers e non sono stati riportati nel grafico. Riprodotto da Watson [86]

Le prime tre componenti principali (che spiegano il 59 % della varianza) sono state diagrammate, mettendo in evidenza che i campioni di propoli tendono a raggrupparsi in base alla loro origine geografica: i campioni europei vicini ma distinti da quelli cinesi, che formavano un secondo gruppo, quelli africani più sparsi, ma comunque separati da tutti quelli originari dei paesi temperati, e quelli provenienti dall'Oceania separati da tutti gli altri, anche se non molto vicini tra loro (Figura S13).

Gli autori hanno poi verificato se la separazione ottenuta con l'analisi PCA potesse spiegare i dati misurati di alcune proprietà tipiche della propoli: capacità antiossidante, capacità di catturare

radicali liberi, contenuto di flavoni e flavonoli. I campioni all'interno dei singoli gruppi avevano un comportamento omogeneo rispetto a ciascuna di tali proprietà, e diverso da quello mostrato negli altri gruppi. Le propoli temperate (Cina ed Europa) mostrano elevate concentrazioni di flavoni e flavanoli, e anche elevate capacità antiossidanti. Al contrario, le propoli africane hanno livelli bassi per tutti questi parametri. La capacità di raccogliere radicali, però, è alta anche in campioni africani, nonostante il basso contenuto di flavoni e flavonoli (vedi punto), e questo fatto indica la presenza di specie attive diverse da quelle comunemente presenti nelle propoli di pioppo [86].

Anche la propoli cubana è stata studiata mediante risonanza magnetica nucleare. Sono stati registrati gli spettri ^1H e ^{13}C NMR di 65 campioni di diversa provenienza, ed in parallelo sono stati registrati anche i profili di composizione mediante HPLC-PAD. Lo studio ha evidenziato la presenza dei tre tipi diversi di propoli, che sono stati chiamati marrone, rossa, gialla. È stato confermato che i campioni di propoli marrone sono caratterizzati da benzofenoni preniliati, in cui prevale il nemorosone (Figura S8). Poiché tale specie è caratteristica della *Clusia rosea*, gli autori hanno concluso che fosse proprio questa specie ad essere l'origine di questa propoli. La presenza di altri benzofenoni polipreniliati, però, lascia immaginare che le api raccolgano anche resine di altre specie di *Clusia*. È stato confermato che i campioni di propoli rossa sono caratterizzati dalla presenza di isoflavonoidi (Figura S8), e sono originari di poche zone costiere, ma non è stato possibile risalire all'origine botanica. La propoli gialla mostra quasi solo segnali NMR di carboni e protoni alifatici, e nel gradiente HPLC su fase inversa tutte le specie sono eluite con alti percento di solvente organico, indice della presenza di specie poco polari. Non è stato possibile assegnare i picchi, né risalire all'origine botanica, ma le specie prevalenti dovrebbero essere terpeni e steroli [61].

3.4 Spettroscopia di massa

Alcuni autori hanno proposto metodi basati sulla spettrometria di massa di estratti tal quali, senza alcuna preventiva separazione cromatografica. Un lavoro ha usato la spettrometria di massa mediante ionizzazione chimica e rivelazione degli ioni negativi. L'uso della ionizzazione chimica accoppiata con la ricerca degli ioni negativi è favorevole per la ricerca dei flavonoidi caratterizzandoli con il peso molecolare, perché le specie ricche di atomi elettronegativi tendono a catturare elettroni senza subire frammentazioni [87]. Questo metodo permette di caratterizzare rapidamente un gran numero di componenti, perché consente di rivelare gli ioni molecolari o pseudomolecolari, che possono poi essere confermati mediante MS/MS. Questo metodo non può

essere però usato per l'analisi quantitativa [24]. Altri autori hanno usato per lo stesso scopo la spettrometria di massa con rivelazione degli ioni negativi, ma con ionizzazione ESI. In ambiente basico i composti acidi (come sono molti di quelli tipici della propoli) formano ioni deprotonati che sono molto stabili, e quindi è facile rivelare gli ioni molecolari. Gli autori hanno analizzato campioni europei e brasiliani di diversa origine. I valori di m/z più caratteristici (due per ogni campione) sono stati utilizzati come variabili di partenza per una analisi PCA. L'analisi chemiometrica separa perfettamente i campioni esaminati in sei gruppi, segregando le propoli europee dalle altre, e le propoli brasiliane secondo la loro specifica origine [27].

3.5 Analisi spettrofotometrica per la determinazione del contenuto di classi di composti

Sono molto diffusi metodi spettrofotometrici mirati alla determinazione del contenuto totale di specifiche classi di composti. Il metodo Folin-Ciocalteu è mirato alla determinazione del contenuto di specie fenoliche totali in soluzione, ed è basato sulla reazione redox in soluzione basica tra i fenoli presenti nella matrice (riducenti) e ioni polimerici ossigenati di tungsteno e molibdeno (ossidanti, reattivo di Folin-Ciocalteu) [88]. I prodotti di riduzione sono intensamente colorati in blu, e l'assorbanza a 760 nm è correlata alla quantità di tali specie formata nella reazione redox. Per poter determinare quantitativamente i fenoli totali in campioni reali, è necessario tarare il metodo con una specie fenolica standard opportuna. La quantità di specie ridotte, e quindi l'assorbanza misurata a 760 nm, può essere allora associata alla quantità nota di quella specie standard, e i fenoli totali sono determinati "come equivalenti di specie standard". Il metodo può essere usato nell'intervallo in cui la taratura risulta lineare. Per l'applicazione del metodo alla propoli, sono stati proposti come standard l'acido gallico [5, 39] e una miscela bilanciata di galangina-pinoembrina 1:2 [38]. La quantità di fenoli determinata con il descritto metodo spettrofotometrico tende ad essere più bassa di quella determinabile per HPLC, tra l'85 ed 95 % circa, e non sembrano esserci significative differenze nella scelta degli standard di riferimento proposti [5, 38, 39].

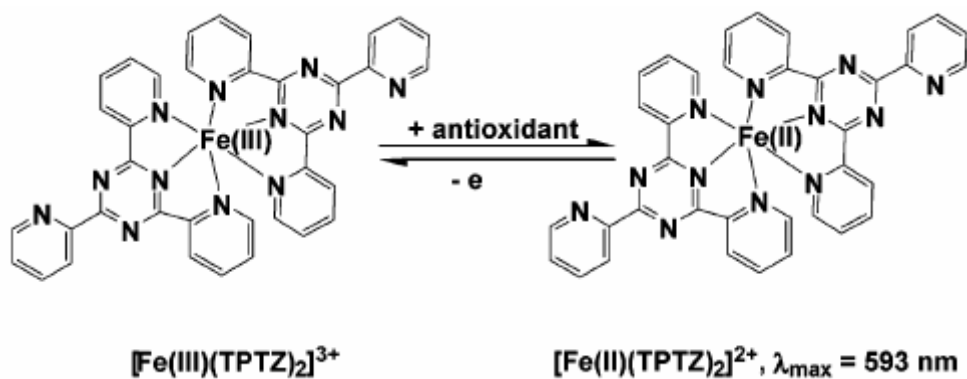
Il metodo per la determinazione di flavoni e flavonoli totali (Figura **S1**) è basato sulla complessazione della funzione carbonilica e della funzione ossidrilica sul carbonio 5 con $AlCl_3$. I complessi che si formano hanno una colorazione caratteristica che ha il suo massimo di assorbimento UV-VIS a 425 nm [38]. Per poter determinare quantitativamente i flavoni ed i flavonoli totali in campioni reali, è necessario tarare il metodo con una specie standard opportuna. L'assorbanza misurata a 425 nm è associata alla quantità di complesso formatosi da quantità note di quella specie standard, e i flavoni e flavonoli totali sono quindi determinati "come equivalenti di

specie standard". Il metodo può essere usato nell'intervallo in cui la taratura risulta lineare. In alcuni lavori, la quantità determinata spettrofotometricamente è davvero inferiore a quella attesa, fino a 80-90 % in meno [5, 68], e non sembra che dipenda dalla specie scelta per la taratura, dato che sono stati usati quercetina [68], galangina e rutina [5], senza che il risultato cambiasse. Questa forte discrepanza di valori dovrebbe dipendere dal fatto che in quei lavori si sia riferito il test a tutti i flavonoidi. E' invece più corretto notare che il test deve essere riferito ai soli flavoni e flavonoli, perché i complessi di $AlCl_3$ con i flavonoli e diidroflavonoli assorbono nel range 310-320 nm, quindi molto lontano dalla lunghezza d'onda usata nella misura [38]. Con questa ipotesi, la quantità determinata di flavoni e flavonoli è 102-109 % di quella attesa [38].

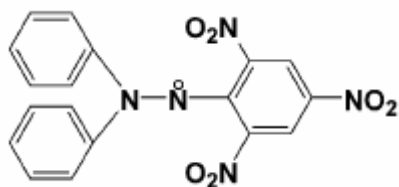
Un metodo mirato alla determinazione di flavanoni e diidroflavonoli totali (figura **S1**) è basato sulla formazione in soluzione acida dei prodotti di addizione con 2,4 dinitrofenil idrazina (2,4 dinitrofenil idrazoni). Gli idrazoni che si formano sono misurabili spettrofotometricamente in soluzione basica a 486 nm [37]. Per poter determinare quantitativamente i flavanoni e diidroflavonoli totali in campioni reali, è necessario tarare il metodo con una specie standard opportuna. L'assorbanza misurata a 486 nm è associata alla quantità di addotto che si forma per reazione con una quantità nota di quella specie standard, e i flavanoni e diidroflavonoli totali sono quindi determinati "come equivalenti di specie standard". Il metodo può essere usato nell'intervallo in cui la taratura risulta lineare. Per la taratura del metodo è stato proposto l'uso di pinocembrina, il diidroflavonolo più diffuso nella propoli di pioppo [37, 38]. Il metodo è stato testato con una miscela di standard che simula la propoli, ed il recupero è molto buono, dell'ordine di 90-113 % della quantità attesa, ed ottimi sono anche i risultati sui campioni reali, che sono stati analizzati per confronto anche per HPLC [38].

Una valutazione importante che emerge dall'analisi per gruppi funzionali è la correlazione tra il contenuto di fenoli totali e di flavonoidi totali. Il paragone tra i valori determinati mediante HPLC su campioni di propoli uruguayane e cinesi mostra che la quantità di flavonoidi è leggermente inferiore, ma molto prossima, a quella dei fenoli totali [5]; lo stesso si riscontra su alcuni campioni di propoli europea, dove i dati ottenuti da misure HPLC da una parte e spettrofotometriche dall'altro sono molto simili [38]. Questi risultati sembrerebbero indicare che, almeno nelle propoli di origine temperata, i flavonoidi siano la frazione preponderante dei fenoli. E' interessante notare che, dove il valore misurato spettrofotometricamente con il test di complessazione con $AlCl_3$ è associato al contenuto di flavonoidi totali, esso risulta invece significativamente e sistematicamente più basso del valore dei fenoli totali [43-46, 49].

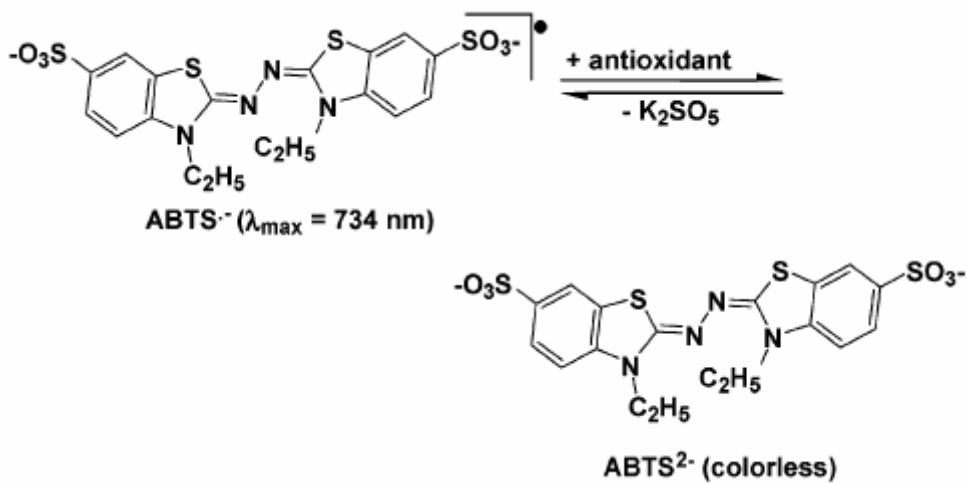
Metodi spettrofotometrici veloci sono stati messi a punto anche per misurare la capacità antiossidante e di ripulire i radicali liberi di campioni di propoli. Per quanto riguarda la capacità antiossidante, un metodo è basato sulla riduzione del Fe (III) in tampone acetico a seguito della aggiunta del campione di propoli (saggio FRAP). Il Fe (II) che si forma viene quindi complessato con un chelante, il TPTZ (Figura S14) che è intensamente colorato in blu e può essere determinato spettrofotometricamente sul massimo di assorbimento, che cade a 593 nm [88]. Il metodo è stato originariamente messo a punto per misurare la capacità antiossidante del plasma [89], ma è stato utilizzato anche per la propoli [86]. Altri autori usano invece un metodo basato sulla misura della velocità di ossidazione in emulsione acquosa del β -carotene da parte dell'acido linoleico [43, 44, 88]. A seguito dell'ossidazione, l'assorbanza dell'emulsione a 470 nm, dovuta alla presenza del β -carotene ($\epsilon_{450} = 137000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) diminuisce. La velocità di scomparsa del β -carotene viene determinata misurando l'assorbanza della soluzione all'inizio (a) e dopo sessanta minuti (b), ed è espressa come $DR = [(\log(a/b))/60]$: DR_C è la velocità di ossidazione nel bianco e DR_S la velocità di ossidazione nel campione sotto osservazione. Il potere antiossidante è espresso come $100 \cdot (DR_C - DR_S) / DR_C$. Il potere antiossidante di propoli di pioppo misurato con questo metodo è variabile tra il 10 ed il 60 %. Il valore del potere antiossidante è correlabile con quello del contenuto di fenoli totali ($R^2 = 0,472$) [43]. Un metodo per misurare la capacità di ripulire dai radicali liberi usa il radicale DPPH \cdot (vedi Figura S14), che è molto stabile, ma può reagire con una specie riducente per formare l'idrazina corrispondente. Il radicale è colorato in violetto ed ha un massimo di assorbimento UV-VIS a 517 nm, mentre l'idrazina è gialla, e ha un'assorbanza vicino a zero alla stessa lunghezza d'onda. Nel test, si miscelano la soluzione etanolica del radicale con il campione. Dopo mezz'ora, si registra l'assorbanza a 517 nm, e la capacità della soluzione di raccogliere i radicali è espressa come percentuale di assorbanza rispetto alla soluzione di controllo. Anche questa grandezza è correlata con la quantità di fenoli totali in soluzione ($R^2 = 0,806$) [43]. In un altro metodo, il radicale catione ABTS $^{+\cdot}$ (Figura S14), fortemente colorato in blu, è generato in soluzione per l'azione di un forte ossidante dalla molecola neutra [88]. L'interazione con una specie riducente causa la scomparsa del radicale catione, e la formazione di ABTS $^{2-}$, che è non colorato nel VIS. Il potere di raccogliere radicali è espresso come equivalenti di Trolox, che è la specie usata per tracciare la retta di taratura: per questo il metodo è chiamato "Trolox equivalent antioxidant capacity" (TEAC). Questo metodo fornisce risultati che non sempre sono correlabili con quelli ottenuti con il metodo basato sul DPPH [44].



(1)



(2)



(3)

Figura S14. Strutture di interesse per i saggi di potere antiossidante e raccolta di radicali (1) riduzione del complesso Fe(III)-TPTZ a Fe(II)-TPTZ (2) struttura del radicale DPPH (3) riduzione del radicale catione $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a ABTS^{2-} . Riprodotti da Huang [88]

Capitolo 2 Parte sperimentale

1. Materiali

1.1 Reagenti e solventi

Acetonitrile, “R CHROMASOLV for liquid chromatography”, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

metanolo, “BAKER analyzed”, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland;

etanolo, assoluto, purissimo per analisi 99,8 %, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

2-propanolo, “CHROMASOLV for HPLC”, $\rho = 0,785 \text{ g/mL}$, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

1-esanolo, puro $\geq 98\%$, $\rho = 0,818 \text{ g/mL}$, P.M. = 102,18 g/mol, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland;

n-esano, pestanal, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

n-ottano, RG ($\geq 98\%$), $\rho_{25^\circ\text{C}} = 0,703 \text{ g/mL}$, Eurobase S.p.A., San Giuliano Milanese (MI), Italia;

etossietano (nel testo, etere etilico), RPE 99,8 %, Carlo Erba Reagenti, Rodano (MI), Italia;

triclorometano (nel testo, cloroformio), purissimo per analisi ($\geq 99\%$), Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

etile acetato, RG, da Clean Consult International, Lodi (MI), Italia;

acido acetico, 99,9 %, P.M. = 60,05 g/mol, $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1,05 \text{ g/mL}$, $\text{pK}_a = 4,76$, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland;

dimetilsolfossido, RG, $\rho = 1,10 \text{ g/mL}$, Ashland Fine Chemicals, San Giuliano Milanese (MI), Italia.

Sodio carbonato anidro, 99,5 % min, P.M. = 105,98 g/mol, Farmitalia Carlo Erba, Milano, Italia;

sodio nitrato, 99,5 % min, P.M. = 84,99 g/mol, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland;

sodio solfato anidro, tecnico, Riedel-de Haën, Germania;

sodio acetato, 99,0 % min, P.M. = 82,03 g/mol, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland;

sodio diidrogenofosfato, monoidrato, P.M. = 137,99 g/mol, Carlo Erba Reagenti, Rodano (MI), Italia;

ferro (II) cloruro tetraidrato, $\geq 98\%$, P.M. = 198,81 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

ferro (III) cloruro esaidrato, 98-102 %, P.M. =270,30 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

alluminio cloruro esaidrato, 99 % min, P.M. =241,44 g/mol, Carlo Erba Reagenti, Milano, Italia;

gel di silice 100, intervallo dimensionale delle particelle 0,2-0,5 mm, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland.

Acido cloridrico azeotropico, 37 %, P.M. =36,46 g/mol, $\rho_{20^{\circ}\text{C}} = 1,19$ g/mL, Ashland Fine Chemicals, San Giuliano Milanese (MI), Italia;

acido solforico concentrato, 95-97 %, P.M. =98,08 g/mol, $\rho_{20^{\circ}\text{C}} = 1,84$ g/mL, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland;

idrossido di potassio, gocce, P.M. =56,11 g/mol, Ashland Fine Chemicals, San Giuliano Milanese (MI), Italia.

Reagente Folin-Ciocalteu, costituito da una miscela di acido fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ed acido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

2,4 dinitrofenil idrazina, $\geq 98\%$, umida, 50 % di acqua, P.M. =198,14 g/mol, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland;

2,4,6- tri(2-piridil)-s-triazina, $\geq 99\%$, P.M. =312,33 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

1.2 Esteri standard

Metil salicilato, ≥ 99 %, P.M. =152,15 g/mol, $\text{pK}_a = 10,19$ (25 °C), Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

etil salicilato, $\geq 99,0$ %, P.M. =166,18 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

esil salicilato, ≥ 99 %, P.M. =222,28 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

benzil salicilato, 98 %, P.M. =228,25 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

feniletil salicilato, 97 %, P.M. =242,28 g/mol, SAFC Supply Solutions, St. Louis, MO, USA.

Metil cinnamato, $\geq 99,0$ %, P.M. =162,19 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

etil cinnamato, 98 %, P.M. =176,22 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

esil cinnamato, non era disponibile commercialmente, ed è stato sintetizzato e caratterizzato durante la sperimentazione (Parte sper., **1.7**);

benzil cinnamato, 98 %, P.M. =238,29 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

feniletil cinnamato, 96 %, P.M. =252,32 g/mol, SAFC Supply Solutions, St. Louis, MO, USA.

Feniletil caffeato, 98 %, P.M. =284,29 g/mol, Biosynth Chemistry and Biology, Switzerland.

1.3 Altri standard

Alcol benzilico, $\geq 99,0$ %, P.M. =108,14 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

alcol cinnamico, $\geq 97,0$ %, P.M. =134,18 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

2-fenil etanolo, $\geq 99,0$ %, P.M. =122,17 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland.

Galangina, P.M. =270,24 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

crisina, 96 %, P.M. =254,24 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

pinocembrina, 95 %, P.M. =256,25 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

naringenina, P.M. =272,26 g/mol, Extrasynthese, Lyon, France;

isosakuranetina, P.M. =286,28 g/mol, Extrasynthese, Lyon, France;

quercetina didirata, P.M. =338,27 g/mol, Extrasynthese, Lyon, France;

kaempferolo, P.M. =286,24 g/mol, Extrasynthese, Lyon, France;

apigenina, P.M. =270,23 g/mol, Extrasynthese, Lyon, France.

Acido clorogenico, 98 % monoidrato, P.M. =363,32 g/mol (354,3 g/mol per la specie anidra), $pK_{a1} = 3,59$ $pK_{a2} = 8,59$ (25 °C), Fluka Chemie, Buchs, Switzerland;

acido t-cinnamico (acido E 3 fenil 2 propenoico), 99 %, P.M. =148,16 g/mol, $pK_a = 3,93$ (25 °C), Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

acido o-cumarico (acido 2-idrossi t-cinnamico), 98 %, P.M. =164,16 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

acido p-cumarico (acido 4-idrossi t-cinnamico), 98 %, P.M. =164,16 g/mol, $pK_{a1} = 4,64$ $pK_{a2} = 9,45$ (25 °C), Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

acido caffeico (acido 3,4-diidrossi t-cinnamico), 95 %, P.M. =180,16 g/mol, $pK_{a1} = 4,62$ $pK_{a2} = 9,07$ (25 °C), Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

acido ferulico (acido 4 idrossi 3 metossi t-cinnamico), 99 %, P.M. =194,19 g/mol, $pK_{a1} = 4,58$ $pK_{a2} = 9,39$ (25 °C), Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

acido sinapico (acido 4 idrossi 3,5 dimetossi t-cinnamico), 98 %, P.M. =224,21 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

acido salicilico (acido 2- idrossi benzoico), 99 %, P.M. =138,12 g/mol, $pK_{a1} = 3,01$ $pK_{a2} = 13,43$ (25 °C), Aldrich Chemie, Steinheim, Germania;

acido acetilsalicilico (acido 2-acetil benzoico), P.M. =180,2 g/mol, $pK_a = 3,38$ (25 °C), acquistato in farmacia;

acido vanillico (acido 4 idrossi 3 metossi benzoico), 97 %, P.M. =168,15 g/mol, Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

acido veratrico (acido 3,4 dimetossi benzoico), P.M. =182,18 g/mol, $pK_a = 4,43$ (25 °C), Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland.

Toluene, ACS reagent, $\geq 99,7$ %, P.M. =92,14 g/mol, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland;

acetofenone, puro ≥ 98 %, P.M. =120,15 g/mol, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland;

naftalene, puro ≥ 98 %, P.M. =128,17 g/mol, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland.

1.4 Solventi e colonne per HPLC

Le colonne usate per le analisi HPLC in fase inversa erano le seguenti:

Supelcosil LC-18, 250 x4,6 mm, particelle da 5 μ m, Supelco, Sigma-Aldrich Group, Buchs, Switzerland;

Pursuit XRs C18, 150 x2,0 mm, particelle da 3 μ m, Varian Inc., Lake Forest, California, USA.

Le eluizioni in fase inversa sono state condotte con miscele binarie, ottenute da una fase acquosa e una organica a base di acetonitrile o metanolo.

Acetonitrile “R CHROMASOLV for liquid chromatography”, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Switzerland;

metanolo, “BAKER HPLC analyzed”, HPLC gradient grade, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland;

acqua per HPLC, è stata preparata usando un apparato Millipore Synergy 185. L'acqua aveva una resistività di 18.2 MΩ/cm ed era filtrata con filtri da 0.22 μm prima dell'uso.

La fase mobile era acidificata, per mantenere protonate le funzionalità acide e fenoliche presenti nei campioni. In alcune prove, si è lavorato acidificando la sola fase acquosa (1% in volume di acido acetico); in altre, invece, sono state acidificate entrambe le fasi aggiungendo agli eluenti 1 % in volume di una soluzione di acido formico al 10 %, per una concentrazione finale di acido di 0.1 % circa in volume in ciascuna fase. Le soluzioni di acido formico al 10 % erano preparate misurando 2,5 mL di acido in un matraccio da 25 mL, quindi portando a volume con il solvente (acqua o ACN).

Acido acetico, 99,9 %, P.M. =60,05 g/mol, $\rho_{20^{\circ}\text{C}}=1,05$ g/mL, $\text{pK}_a=4,76$, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland;

acido formico, 98%, P.M. =46,03 g/mol, $\rho_{20^{\circ}\text{C}}=1,22$ g/mL, $\text{pK}_a=3,75$, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland.

Il pH della fase acquosa additivata con 1 % di acido acetico era 2,8 circa, quello della fase acquosa additivata con 0.1 % di acido formico 2,7 circa. Le colonne usate erano stabili a $\text{pH} \geq 2$.

Per le analisi in fase normale, è stata usata una colonna **Supelcosil LC-Si** (150 x4,6 mm, particelle da 5 μm (Supelco, Sigma-Aldrich Group, Buchs, Switzerland). La fase mobile era esano contenente il 2 % di acetato di etile (vedi Appendice 3).

1.5 Materiale per GC-MS

La colonna utilizzata per le analisi GC-MS era la seguente:

HP-5 MS, (metil 5% fenil silicone), i.d. 0,25 mm, rivestimento 0,25 μm, lunghezza 60 m.

Il gas di trasporto utilizzato era elio ultrapuro per cromatografia:

He, ultrapuro per cromatografia, 99,9999 %, Air Liquide.

1.6 Altri prodotti

Cera d'api grezza, dall'Apicoltura Maria Fiorentini (Testa di Lepre, RM);

paraffina, da candele commerciali. E' stata ripetutamente trattata con gli ultrasuoni in etanolo (50% /50%) e filtrata sottovuoto, sin quando l'assorbanza a 277 nm dell'etanolo usato per il trattamento era pari a quella dell'etanolo puro. E' stata seccata in stufa a 80 °C prima dell'uso;

olio di semi di mais, acquistato al supermercato, di marca COOP.

1.7 Sintesi e caratterizzazione dell'esil cinnamato

1.7.1 Procedure di sintesi

Nel corso della sperimentazione, si è resa necessaria la sintesi dell'esil cinnamato (Figura M1), un prodotto che non era commercialmente disponibile. La procedura di sintesi è stata messa a punto usando come riferimento quella riportata in letteratura per la preparazione del metil cinnamato [90], dove l'acido t-cinnamico è esterificato per catalisi acida (da acido solforico) in metanolo. Le modifiche introdotte sono state rese necessarie dalla differenza di proprietà chimico-fisiche tra il metanolo e l'1-esanolo.

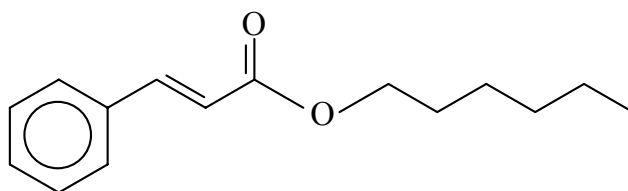


Figura M1. Struttura dell'esil cinnamato

In un pallone da 50 mL, si pesano 1.02 g di acido t-cinnamico (pari a 6,88 mmoli). Si aggiungono 8,50 mL di 1-esanolo (68 mmoli), e 100 µL di acido solforico al 96 % (3,6 meq di protoni). Si scalda un bagno di sabbia, e quando la temperatura arriva a 70 °C, vi si immerge il pallone. Si collega quindi un condensatore raffreddato ad acqua, e si continua a scaldare. La miscela omogenea che si forma comincia a ricadere intorno ai 170 °C. Si mantiene la miscela a ricadere per cinque ore, quindi si lascia raffreddare il pallone. In un imbuto separatore da 100 mL si mettono circa 10 g di ghiaccio tritato e 10 mL di una

soluzione 1 M di carbonato di sodio, quindi si aggiunge la miscela di reazione, aiutandosi con 1-esanolo. Quando il ghiaccio è completamente disciolto, si dibatte, si lascia sedimentare e si allontana la fase acquosa. Si ripete per altre tre volte il trattamento con la soluzione di carbonato di sodio, quindi altre due volte con acqua distillata. Si trasferisce la fase organica in un pallone da 50 mL, e si concentra al rotavapor, sottovuoto e con il bagno riscaldante regolato a 75 °C. Se il liquido risulta ancora torbido, filtrarlo su solfato di sodio anidro. Il prodotto finale è un liquido limpido con sfumature giallo chiaro.

1.7.2 Caratterizzazione del prodotto

Il prodotto ottenuto per reazione tra l'1-esanolo e l'acido t-cinnamico (Parte sper., **1.7.1**) è stato caratterizzato mediante spettroscopia IR e UV-VIS, e cromatografia GC/MS e HPLC con rivelazione UV.

E' stato registrato lo spettro IR del prodotto (vedi figura **M2**). Lo spettro è stato registrato con un Perkin Elmer Spectrum GX nell'intervallo 4000-200 cm^{-1} , acquisendo sedici volte, con una risoluzione di $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$. I numeri d'onda corrispondenti ai massimi di assorbimento sono stati riportati in tabella **M1** insieme a quelli riportati in letteratura per lo spettro dell'etil cinnamato [91].

I massimi di assorbimento del prodotto e del cinnamato di etile sono molto vicini, ed indicano che la reazione di esterificazione è avvenuta. Se la reazione non avesse proceduto, il massimo di assorbimento dello stretching C=O sarebbe stato registrato a 1684 cm^{-1} ; inoltre, il doppio assorbimento nella regione 1300-1160 cm^{-1} è una caratteristica dei soli esteri coniugati con un doppio legame insaturo, e non è presente nell'acido. Il prodotto contiene quindi il cinnamato di esile, e sembra mostrare che l'acido t-cinnamico sia stato completamente consumato nella reazione.

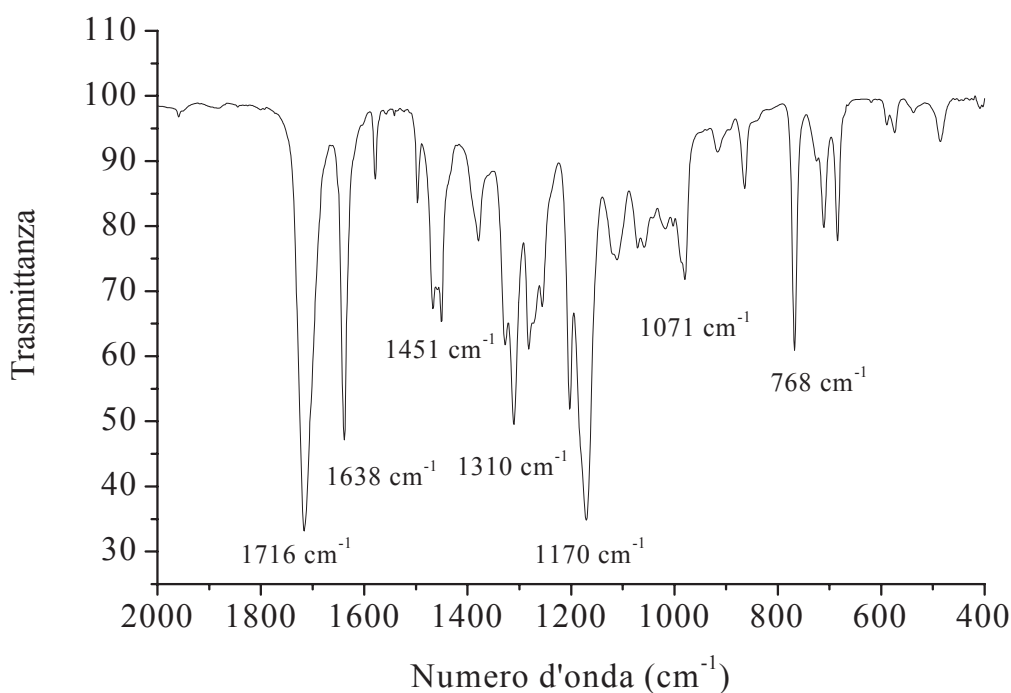


Figura M2. Particolare dell'intervallo 2000-400 cm⁻¹ dello spettro IR del prodotto ottenuto per reazione tra 1-esanolo e acido *t*-cinnamico secondo il processo descritto (Parte sper., 1.7.1). Lo spettro è stato registrato con una goccia di prodotto tra due pastiglie di KBr

Prodotto di reazione	Etil cinnamato	Modo di vibrazione
N. d'onda (cm ⁻¹)	N. d'onda (cm ⁻¹)	
1716	1712	Stretching C=O
1638	1639	Stretching C=C coniugato anello aromatico
1451	1450	Bending asimmetrico CH ₃
1310	1311	Bending nel piano C-H aromatici
1255	1258	Stretching C-(C=O)-O
1170	1176	Stretching C-(C=O)-O
768	768	Bending H aromatici fuori piano

Tabella M1. Numeri d'onda (cm⁻¹) delle posizioni dei massimi registrati nello spettro IR del prodotto di reazione tra 1-esanolo e acido *t*-cinnamico secondo il processo descritto (Parte sper., 1.7.1), e dei massimi riportati in letteratura

Per confermare la presenza del cinnamato di esile, il prodotto è stato disciolto in esano ad una concentrazione di 2 mg/L, ed analizzato mediante GC/MS. Nel cromatogramma registrato mediante TIC sono visibili due picchi. La ricerca negli spettri della libreria dello strumento ha permesso di assegnare il picco a 12,10 minuti all'etere diesilico. L'analisi dello spettro di

massa in figura **M3** del picco con tempo di ritenzione 21,73 minuti mostrava che si trattava del cinnamato di esile (vedi Appendice 2, 2).

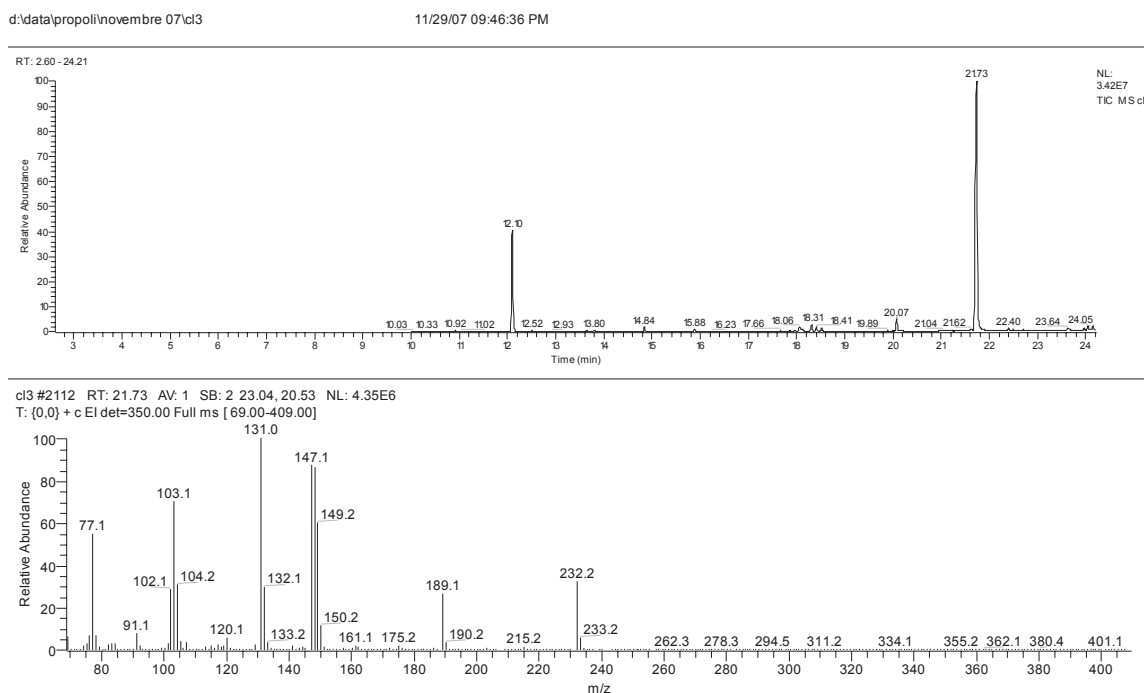


Figura M3. Gas-cromatogramma del prodotto ottenuto per reazione tra 1-esanolo e acido t-cinnamico secondo il processo descritto (Parte sper., 1.7.1), e spettro di massa TIC del picco con tempo di ritenzione pari a 21,73 minuti. Per le condizioni cromatografiche, vedi (Parte sper., 6.6.2.2.2)

Per confermare l'assenza dell'acido t-cinnamico nel prodotto finale, si è proceduto ad una analisi in cromatografia liquida in fase inversa. Il prodotto è stato disciolto in una soluzione 65/35 ACN/H₂O, acidificata con 0,1 % di acido formico, ad una concentrazione di circa 6 ppm. Questa soluzione è stata analizzata con il seguente metodo: colonna, **Pursuit XRs-C18**, 150 x 2.0 mm, particelle da 3 µm, isocratica 65 % ACN, 0.2 mL/min per 35 minuti. Rivelando a 271 nm, sul cromatogramma è visibile un unico picco con tempo di ritenzione 29,89 minuti (Figura **M4**). Alla soluzione è stata quindi aggiunta una quantità di soluzione standard in ACN di acido t-cinnamico in modo da avere una concentrazione di circa 2,5 ppm. Questa soluzione è stata analizzata con lo stesso metodo descritto per la prima, e ha mostrato chiaramente che l'acido t-cinnamico era assente (vedi figura **M5**).

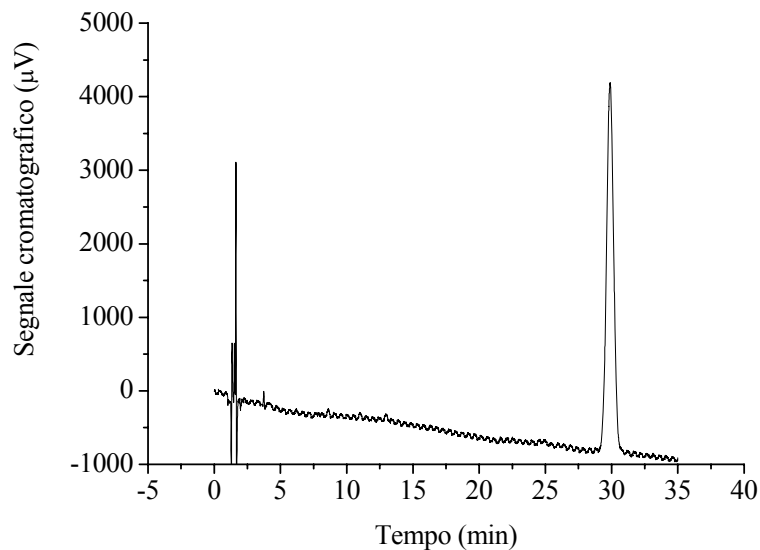


Figura M4. Cromatogramma HPLC del prodotto di reazione tra 1-esanolo e acido *t*-cinnamico disciolto a 6 ppm in fase isotonica con l'eluente di analisi e analizzato con il seguente programma: colonna **Pursuit XRs-C18**, 150 x2.0 mm, particelle da 3 µm, isocratica 65 % ACN, 0.2 mL/min, $\lambda_{riv} = 271$ nm

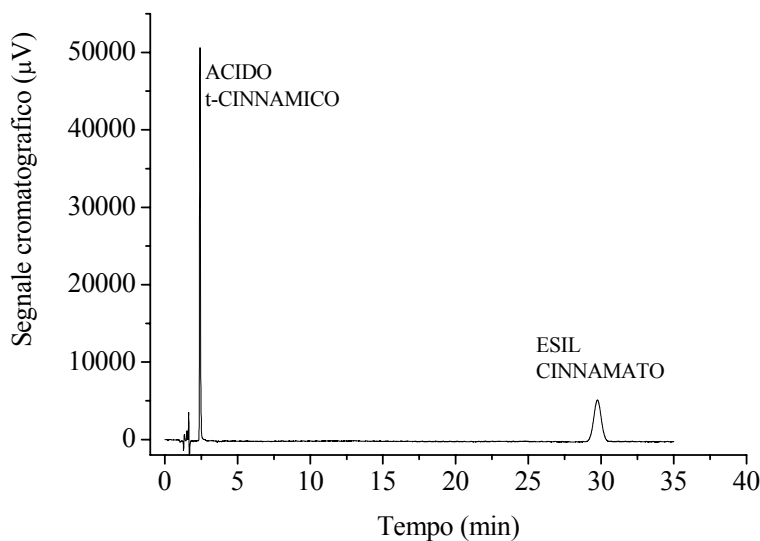


Figura M5. Cromatogramma HPLC del prodotto di reazione tra 1-esanolo e acido *t*-cinnamico disciolto a 6 ppm in fase isotonica con l'eluente di analisi, coiniettato con 2,5 ppm di acido *t*-cinnamico e analizzato con il seguente programma: colonna **Pursuit XRs-C18**, 150 x2.0 mm, particelle da 3 µm, isocratica 65 % ACN, 0.2 mL/min, $\lambda_{riv} = 271$ nm).

L'analisi UV-VIS è stata usata per determinare il grado di purezza dell'estere nel prodotto di reazione. Il massimo di assorbimento in esano è stato misurato con una soluzione di circa 14 ppm, e cadeva a 271 nm, lunghezza d'onda coincidente con quella dei massimi misurati per

altri esteri cinnamici nel corso della presente sperimentazione entro il margine di ± 1 nm (vedi Appendice 1, 1.4). Il coefficiente di estinzione del prodotto è stato determinato misurando l'assorbanza di quattro soluzioni in esano nell'intervallo di concentrazione 7-20 ppm, ed era pari a $11140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. I valori numerici dei coefficienti di estinzione molare UV degli esteri dell'acido t-cinnamico con diversi alcoli sono praticamente coincidenti. E' stato perciò assunto che l'esil cinnamato puro dovesse avere un coefficiente di estinzione molare coincidente con quello, misurato con esattezza, dell'etil cinnamato in esano (Appendice 1 Tabella A119, $21900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La frazione di massa dell'esil cinnamato è stata quindi stimata come il rapporto tra il coefficiente di estinzione del prodotto e dell'etil cinnamato in esano, ed è risultata essere 0.509 ± 0.002 .

La caratterizzazione del prodotto ottenuto per reazione tra 1-esanolo e acido t-cinnamico (Parte sper., 1.7.1) ha permesso di concludere quanto segue:

- la spettroscopia IR ha dimostrato che la reazione di esterificazione è avvenuta;
- l'analisi GC/MS ha confermato che il prodotto contiene esil cinnamato, ma anche etere diesilico, che si forma per disidratazione intermolecolare dell'1-esanolo;
- l'analisi HPLC in fase inversa ha dimostrato che nel prodotto l'acido t-cinnamico non è presente. Questa osservazione ha reso possibile attribuire tutti gli assorbimenti UV-VIS all'estere esilico;
- la comparazione del coefficiente di estinzione del prodotto con quello degli altri esteri dell'acido t-cinnamico (Appendice 1, 1.4) ha permesso di determinare la frazione di massa dell'estere;
- il resto della massa è costituita da 1-esanolo e etere diesilico, anche se non è stato possibile determinare in quale rapporto;
- poiché è stato possibile determinare il contenuto di massa dell'estere ricercato, lo si è potuto usare come standard interno.

2. Preparazione e conservazione delle soluzioni

2.1 Soluzioni di esteri

Le soluzioni madre, in esano, acetonitrile ed etanolo, degli esteri salicilici e cinnamici sono state preparate per pesata in matraccio tarato, nell'intervallo di concentrazione 2000-5000

ppm. Sono state conservate a temperatura ambiente in vial di vetro chiaro con tappo a vite di plastica. Le soluzioni di lavoro sono state preparate per diluizione di quantità note di queste soluzioni.

Sono stati effettuati controlli periodici mediante spettrofotometria, andando a verificare i rapporti di intensità degli assorbimenti UV misurati a diverse lunghezze d'onda (Appendice **1**, **2.3** e **2.4**), per verificare sia il titolo, sia la presenza di eventuali processi degradativi. L'analisi dei rapporti di banda ha evidenziato come, anche conservando a T ambiente, le soluzioni di esteri fossero estremamente stabili anche per più anni, in tutti i solventi utilizzati. L'analisi quantitativa ha anche mostrato che le soluzioni in etanolo od acetonitrile mantenevano il proprio titolo anche per lunghi periodi, mentre quelle esaniche si concentravano in tempi molto brevi, ed andavano standardizzate ad ogni utilizzo, sempre per analisi spettrofotometrica. Questo fenomeno è stato attribuito all'evaporazione dell'esano.

2.2 Soluzioni di acidi organici e CAPE

Le soluzioni madre di acidi benzoici e cinnamici e dell'estere CAPE, in acetonitrile ed etanolo, sono state preparate per pesata in matraccio tarato, nell'intervallo di concentrazione 2000-5000 ppm. La dissoluzione dell'acido caffeico in solvente organico puro è estremamente difficoltosa, per cui gli standard sono stati preparati in solvente organico, con l'aggiunta di 10 % di acqua (volume rispetto al valore finale), prima della portata a volume. L'aggiunta anche di minime quantità di acqua al solvente organico dissolve immediatamente tutto l'acido caffeico presente. Le soluzioni di lavoro sono state preparate per diluizione di quantità note di queste soluzioni.

Sono stati effettuati controlli periodici mediante spettrofotometria, andando a verificare i rapporti di intensità degli assorbimenti UV misurati a diverse lunghezze d'onda (Appendice **1**, **2.1**, **2.2** e **2.4**), per verificare sia il titolo, sia la presenza di eventuali processi degradativi. Le soluzioni di acido caffeico e CAPE si sono rivelate estremamente instabili a temperatura ambiente, e per questo sono state conservate a -18 °C, temperatura a cui sono risultati stabili per lunghi periodi. Le soluzioni diluite di lavoro devono essere usate contestualmente alla loro preparazione, e devono essere scartate alla fine della giornata. Questo dato è congruente con quanto riportato in letteratura, dove la bassa stabilità di questi composti è dovuto alla facilità di ossidazione della funzione ortodifenolica a chinoni [4]. Le soluzioni degli altri acidi

benzoici e cinnamici erano stabili a T ambiente per pochi giorni. Per questo motivo, erano preparate immediatamente prima del loro utilizzo, ed eventualmente rinnovate ogni settimana, secondo le esigenze della sperimentazione.

2.3 Soluzioni di flavonoidi

Le soluzioni madre in etanolo dei flavonoidi sono state preparate per pesata nell'intervallo di concentrazione 400-2000 ppm in matracci da 5 mL. Poiché le quantità disponibili nelle confezioni commerciali era pari a 5 mg, la pesata è stata fatta con una bilancia a 5 cifre (Parte sper., 5.5). Le specie sono risultate però poco solubili in etanolo, e quindi sono state preliminarmente dissolte in 500 µL di DMSO, ottenendo una dissoluzione istantanea. Le soluzioni sono quindi diluite e portate a volume con etanolo, e conservate a -18 °C per la durata della sperimentazione. Le soluzioni di lavoro sono state preparate per diluizione di quantità note di queste soluzioni.

Sono stati effettuati controlli periodici mediante spettrofotometria, andando a verificare i rapporti di intensità degli assorbimenti UV misurati a diverse lunghezze d'onda (Appendice 1, 2.5), per verificare sia il titolo, sia la presenza di eventuali processi degradativi. Con il metodo di conservazione scelto, le soluzioni si sono mantenute stabili per diversi mesi.

2.4 Soluzioni di alcoli aromatici

Le soluzioni standard di alcol benzilico e 2-fenil etanolo in EtOH sono state preparate al 10 % circa per pesata in apposito matraccio. Le soluzioni standard di alcol cinnamico sono state preparate in ACN a 2000 ppm circa, per pesata in apposito matraccio. Le soluzioni di lavoro sono state preparate per diluizione di quantità note di queste soluzioni. Le soluzioni sono state conservate a temperatura ambiente in vial di vetro chiaro con tappo a vite di plastica.

Il controllo spettrofotometrico di stabilità (Appendice 1) ha evidenziato che la soluzione di alcol benzilico (Appendice 1, 2.6) è soggetta a processi degradativi, e deve quindi essere preparata contestualmente alla sperimentazione. Le soluzioni degli altri alcoli sono stabili a T ambiente (Appendice 1, 2.6).

2.5 Soluzioni di controllo per HPLC

Soluzioni di naftalene, toluene e acetofenone sono state preparate per il controllo dell'efficienza delle colonne cromatografiche HPLC. Una soluzione madre era preparata pesando le tre specie in un matraccio, e dissolvendo con acetonitrile o metanolo. Il rapporto di concentrazioni in ppm di acetofenone, toluene e naftalene era 1/10/1 rispettivamente, per ottenere picchi di intensità comparabile, tenuto conto della differenza di sensibilità tra le tre specie alla lunghezza d'onda di rivelazione (254 nm). Le soluzioni di lavoro erano ottenute per diluizione di questa soluzione nella miscela eluente usata per la prova di controllo (Parte sper., 5.1).

2.6 Altre soluzioni

Le soluzioni acquose di acidi minerali sono state preparate per diluizione in opportuno matraccio della quantità necessaria del prodotto azeotropico commerciale. Le soluzioni acquose e metanoliche di sali e basi sono state preparate per pesata in opportuno matraccio.

La soluzione acquosa a pH 5.5, usata nel trattamento della propoli per la determinazione dell'acido salicilico (Parte sper., 6.2.1.2), è stata preparata come segue. In un matraccio da 100 mL, si pesavano 2.78 g di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, e si scioglievano in acqua. Si aggiungevano quindi 17 mL circa di una soluzione 86 mM di KOH. Si portava a volume con acqua. Il pH di questa soluzione è stato misurato con il pHmetro, e a 19 °C era pari a 5.4.

Le soluzioni di TPTZ sono state preparate per pesata in matracci da 25 mL, in modo da avere una concentrazione finale di 10 mM circa. Il chelante è stato disciolto con una soluzione 40 mM di HCl.

Le soluzioni di Fe (II) sono state preparate in matraccio da 25 mL per pesata di ferro (II) cloruro tetraidrato, in modo da avere una concentrazione finale di Fe (II) di circa 10 mM. Le soluzioni di Fe (III) sono state preparate per pesata del ferro (III) cloruro esaidrato, in modo da avere una concentrazione finale in Fe (III) di 20 mM circa. Il sale di Fe (III) è stato disciolto in HCl 40 mM.

Il reattivo del Fe (III) per le prove di potere antiossidante era preparato giornalmente. In un matraccio da 25 mL, si aggiungevano 2.1 mL della soluzione acida di Fe (III) e 2.1 mL della soluzione di TPTZ. Si portava a volume con un tampone acetico (rapporto molare $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH} = 0.084$, $\text{pH} = 3.7$) [89].

Le soluzioni di 2,4 dinitrofenil idrazina sono state preparate come segue. In un matraccio da 25 mL, si pesavano circa 500 mg di idrazina e si sospendevano in circa 20 mL di MeOH. Si aggiungevano poi, goccia a goccia, 500 μL di acido solforico concentrato, e in conseguenza di tale aggiunta l'idrazina si scioglieva completamente. La soluzione era portata a volume con MeOH [38].

3. Altre preparazioni

3.1 Preparazione di cera additivata di esteri

Per aggiungere quantità note di esteri benzilici alla propoli solida usata nelle prove di trattamento con biossido di carbonio supercritico, è stata preparata una miscela solida di BSAL e BCINN in paraffina (Parte sper., **1.6**). 200 μL di una soluzione di BCINN in BSAL (rapporto di massa 1:5 -1:4) erano aggiunti a 2,5 g di paraffina fusa. Si agitava fino ad avvenuta dissoluzione degli esteri, quindi si lasciava freddare la miscela. Si recuperava dal beker, e si conservava sotto forma di scaglie.

Questa preparazione è stata standardizzata nel contenuto in BSAL e BCINN come segue. 25 mg erano pesati in un tubo da centrifuga, quindi si copriva con 1 mL di etanolo. Si sonicava per dieci minuti, quindi si centrifugava a 4000 rpm per dieci minuti. Si prelevavano 500 μL del surnatante, si trasferivano in un matraccio da 5 mL, e si portava a volume con etanolo. La determinazione quantitativa era fatta prendendo letture di assorbanza contro etanolo a 305 e 277 nm, e si determinava il contenuto dei due esteri (Appendice **1, 3.2**), espressi come $\mu\text{g/g}$.

3.2 Preparazione del gel di silice per SPE

Prima dell'uso, il gel di silice era trattato in un apparato Soxhlet con etanolo, concludendo un totale di cinque cicli di estrazione. Si trasferiva quindi in un beker, e si poneva in stufa a 120 °C per sedici ore. Si pesava il gel così trattato, si copriva con esano, e si aggiungeva una

quantità di acqua pari al 5 % in peso del gel, lasciando sotto agitazione per due ore. Il gel di silice è stato conservato coperto con esano.

3.3 Preparazione della miscela olio-cera per il trattamento della propoli

In un beker da 50 mL, si pesavano 0.50 g di cera d'api, quindi 20 g di olio di semi di mais. Si scaldava sotto agitazione magnetica, ottenendo la completa dissoluzione della cera. Si lasciava raffreddare, e la miscela diventava compatta a temperatura ambiente. La percentuale in peso di cera sul totale era di 2,5 %.

4. Campioni di propoli

Nel corso della sperimentazione, sono state realizzate due campagne di raccolta di campioni di propoli originarie dell'Italia Centrale (tab. M2; tab. M3; fig. M6), la prima nell'inverno 2006, la seconda nell'autunno 2007. Tutti i campioni di propoli erano di prodotto grezzo, solido e non trattato.

Codifica	Luogo di Origine	Fornitore
L1	Area del Viterbese (VT), Lazio	Dott.ssa Livia Persano, Centro di Apicoltura (Roma, Italia)
U1	Campello sul Clitumno (PG), Umbria	Apicoltura Morando Montioni
U2	Umbertide (PG), Umbria	Apicoltura Ciampelli
U3	Marsciano (PG), Umbria	Apicoltura Orazi
R	Bagno di Romagna (FC), Emilia Romagna	Apicoltura Facciani
G	Zona della Garfagnana (LU), Toscana	Apicoltura Primitivo

Tabella M2. Campioni di propoli raccolti nell'inverno 2006

4.1 Soluzioni etanoliche di propoli

La propoli grezza è un materiale assai poco omogeneo che, ad un esame anche superficiale, mostra numerose striature che indicano la sovrapposizione di porzioni con caratteristiche diverse, e la presenza di materiali estranei come per esempio pezzi di legno e parti di insetti morti.

Codifica	Luogo di Origine	Fornitore
L2	Testa di Lepre (RM), Lazio	Apicoltura Maria Fiorentini
L3	Arsoli (RM), Lazio	Sig. Romolo Proietti
A1	Opi (AQ), Abruzzo	Azienda Apistica Tommaso de Arcangelis del Forno
A2	Villetta Barrea (AQ), Abruzzo	Apicoltura L'Ape e l'Orso
T1	San Giuliano Terme (PI), Toscana	Da Prof.ssa Colombini (Università di Pisa)
T2	Trassilico (LU), Toscana	Apicoltura Rocchi

Tabella M3. Campioni di propoli raccolti nell'autunno 2007

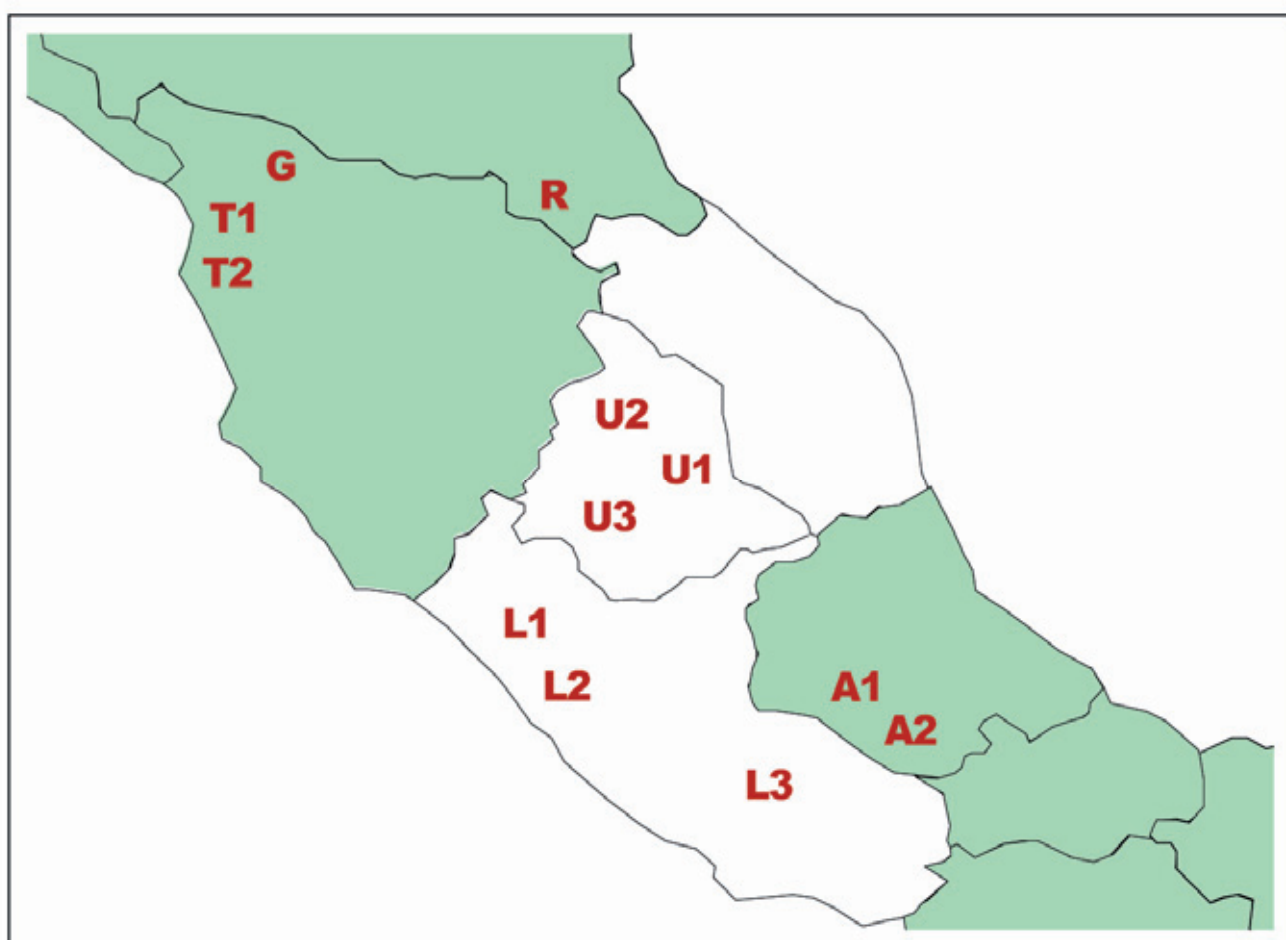


Figura M6. Luoghi di raccolta dei campioni di propoli

Per poter preparare degli EEP rappresentativi del solido in esame è stato quindi necessario, come primo passo, l'omogeneizzazione del solido. Una porzione di propoli, pari a circa tre grammi, era lungamente impastata fino a mostrare una colorazione omogenea, quindi divisa

in quattro parti approssimativamente uguali. Da ciascuna di esse, si prelevava una parte, e le quattro porzioni erano riunite e nuovamente impastate. Da questa porzione di propoli, si ricavano alla fine quattro parti separate. In un tubo da centrifuga tarato si pesavano quindi quattro pezzi distinti di propoli, uno da ciascuna porzione di quelle ottenute nel descritto processo di omogeneizzazione. La quantità di propoli pesata era dell'ordine di 125 mg. La propoli era quindi coperta con 4 mL di etanolo, e trattata in bagno ad ultrasuoni per dieci minuti alla massima potenza. La sospensione risultante era centrifugata per cinque minuti a 4000 rpm, e il surnatante decantato in un matraccio da 25 mL. Si ripeteva il processo sul residuo di estrazione per altre tre volte, sempre con la stessa metodologia. Gli estratti etanoliche erano riuniti nello stesso matraccio, e si portava a volume con etanolo, ottenendo soluzioni circa 5000 ppm. Questa soluzione non era limpida, ed era filtrata con una siringa con filtri Millex 25 mm da 0.22 μm in una vial di vetro chiaro con tappo. Le soluzioni di propoli sono state conservate al buio ed a temperatura ambiente. Altri EEP a diversa concentrazione sono stati preparati con la stessa procedura, pesando la quantità opportuna di propoli.

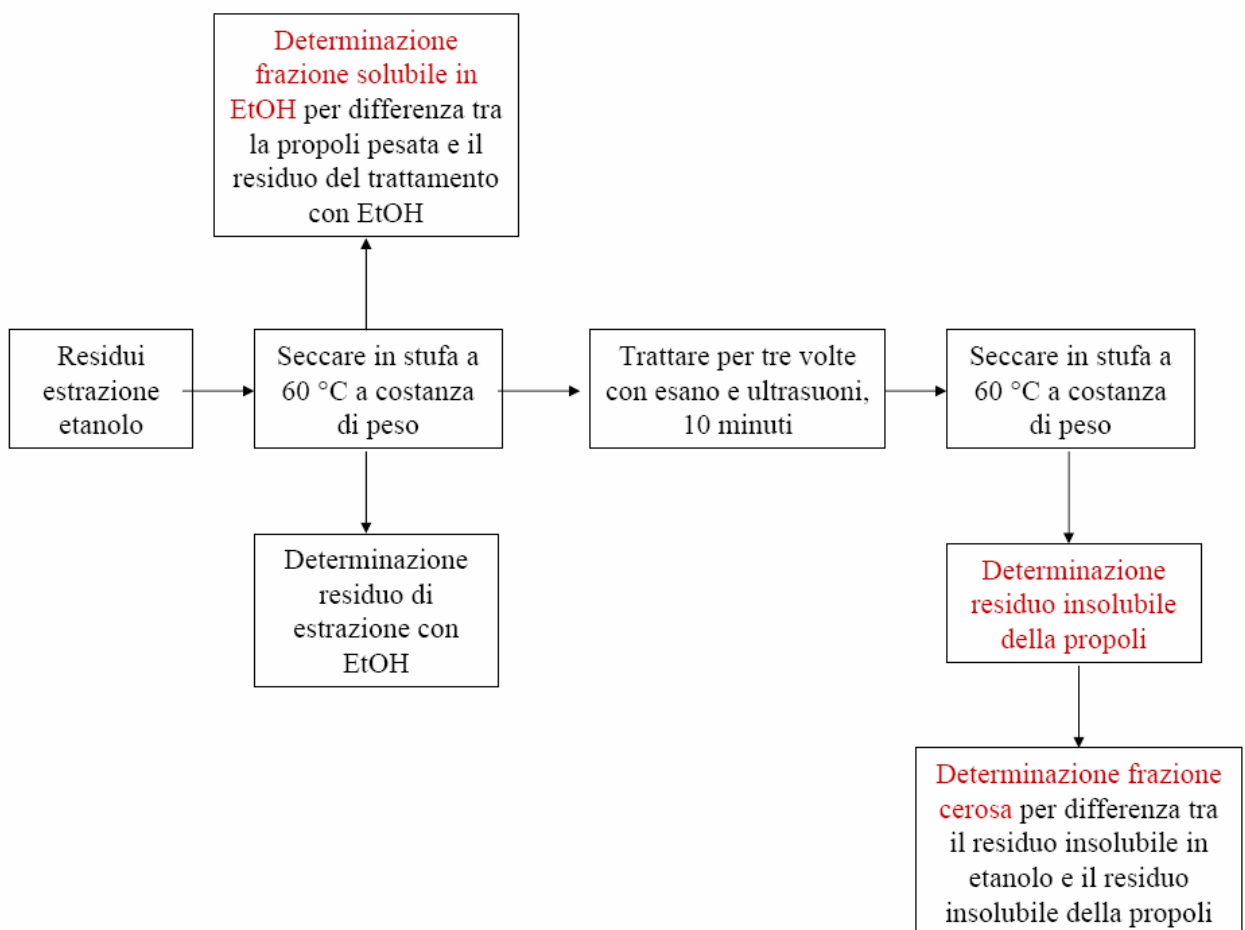


Figura M7. Schema del trattamento per la determinazione delle frazioni ponderali dei campioni di propoli

4.2 Determinazione delle frazioni ponderali dei campioni di propoli

Il residuo proveniente dalla preparazione degli EEP (Parte sper., **4.1**) era trattato secondo lo schema riportato in figura **M7**. La frazione solubile in etanolo era determinata per differenza tra la propoli pesata e il residuo del trattamento con etanolo. Questo era trattato tre volte con porzioni da 5 mL di esano, nel bagno ad ultrasuoni: rimaneva un residuo insolubile, che era determinato dopo essiccamento a costanza di peso in stufa a 60 °C. Per differenza tra il residuo del trattamento con etanolo e il residuo insolubile si determinava la frazione cerosa (solubile in esano).

4.3 Preparazione della propoli additivata di esteri

Questa miscela è stata usata nelle prove di estrazione con biossido di carbonio supercritico. In tutte le prove, è stata usata la propoli U3. La propoli grezza era omogeneizzata (Parte sper., **4.1**), quindi una porzione di circa 3 g era miscelata con circa 1 g di paraffina additivata di esteri (Parte sper., **3.1**). Si omogeneizzava nuovamente fino alla completa scomparsa delle striature bianche della cera.

5. Strumentazione

5.1 Spettrofotometria UV-VIS

Lo spettrofotometro a singolo raggio **Gilson “UV-VIS 7500 spectrophotometer”** è stato utilizzato per tutte le misure di assorbanza a singola lunghezza d’onda (tabella **M4**). Lo spettrofotometro a doppio raggio **Varian “Cary 50”** è stato usato per registrare gli spettri di assorbimento delle soluzioni di propoli.

5.2 Apparat per la cromatografia liquida

Il cromatografo A era costituito dei seguenti componenti: una coppia di bottiglie da 1 L per gli eluenti rivestite con un film di plastica che potevano essere mantenute sotto elio a 5 bar; una pompa binaria “Perkin Elmer Series 200 pump”; un gruppo di iniezione equipaggiato con un loop da 20 µL; un rivelatore UV-VIS “Perkin Elmer 785A UV/VIS detector” a singola

lunghezza d'onda con una cella da 12 μL ; un'interfaccia "Perkin Elmer PE Nelson NCI 900" che connetteva il cromatografo ad un personal computer. Il software Turbochrom versione 3 permetteva al computer di lavorare come registratore del sistema. Tutte le connessioni erano realizzate con tubi in PEEK da 7/1000 di pollice; lungo le linee erano posti due filtri Upchurch in acciaio sinterizzato da 0.22 μm , uno a valle dell'uscita della pompa, l'altro a valle del gruppo di iniezione.

Parametro	
Intervallo lunghezze d'onda	200-900 nm
Controllo lunghezze d'onda	0,1 nm
Accuratezza lunghezza d'onda	$\pm 0,5$ nm
Riproducibilità lunghezza d'onda	0,3 nm
Accuratezza di assorbanza	$\pm 0,002$
Riproducibilità assorbanza	0,002
Intervallo assorbanza	-0,17-2,00
Ampiezza di banda spettrale	2 nm
Monocromatore	CT
Detector	Fotocella diodo al Si
Lampade	W-D ₂

Tabella M4. Caratteristiche spettrofotometro Gilson UV-7500

Il cromatografo B era costituito dei seguenti componenti: quattro bottiglie da 1 L per gli eluenti rivestite con un film di plastica che potevano essere mantenute sotto elio a 5 bar; una pompa quaternaria "Perkin Elmer Series 200 pump"; un gruppo di iniezione equipaggiato con un loop da 2 μL ; un rivelatore UV-VIS "Perkin Elmer Series 200 UV/VIS detector" a singola lunghezza d'onda con una cella da 2,4 μL ; un'interfaccia "Perkin Elmer PE 600 Series link" che connetteva il cromatografo ad un personal computer. Il software Turbochrom versione 4 permetteva al computer di lavorare come registratore del sistema. Tutte le connessioni erano realizzate con tubi in PEEK da 5/1000 di pollice; lungo le linee erano posti due filtri Upchurch in acciaio sinterizzato da 0.22 μm , uno a valle dell'uscita della pompa, l'altro a valle del gruppo di iniezione.

I volumi vuoti sono stati valutati misurando il tempo di ritenzione di una soluzione circa 4 ppm di nitrato di sodio, ad un flusso di 100 % di eluente acquoso pari alla metà di quello usato per le analisi, rivelando a 220 nm. Per il controllo di efficienza dei sistemi HPLC, è stata usata una soluzione di acetofenone, naftalene e toluene (Parte sper., 2.5).

La soluzione di controllo era analizzata sulla colonna **Supelcosil LC-18**, usando il sistema cromatografico A con il seguente metodo (vedi figura **M8 (a)** e Tabella **M5**):

Eluenti: A H₂O; B MeOH;

Metodo di eluizione: 12 minuti, B 70 %, isocratica;
flusso 1,00 mL/min;

Rivelazione: 254 nm.

La soluzione di controllo era analizzata sulla colonna **Pursuit XRs C18**, usando il sistema cromatografico B con il seguente metodo (vedi figura **M8 (b)** e Tabella **M6**):

Eluenti: A H₂O; B ACN;

Metodo di eluizione: 12 minuti, B 60 %, isocratica;
flusso 0,20 mL/min;

Rivelazione: 254 nm.

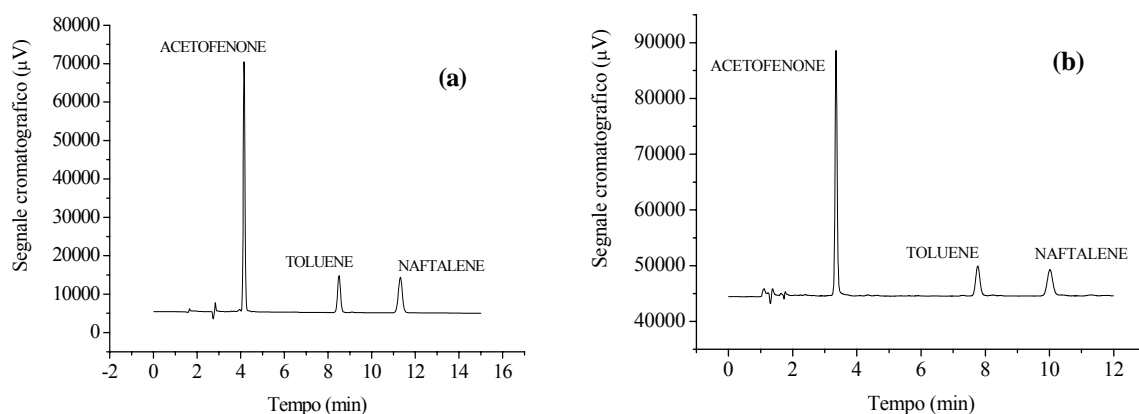


Figura M8. Cromatogrammi di controllo ottenuti iniettando soluzioni di controllo di acetofenone, toluene e naftalene disciolti in solvente isotonic con l'eluente e registrati sulle colonne (a) *Supelcosil LC-18*, 1,00 mL/min con 70/30 MeOH/H₂O su cromatografo A e (b) *Pursuit XRs C18*, 0,20 mL/min con 60/40 ACN/H₂O su cromatografo B; $\lambda_{riv} = 254$ nm (vedi anche tabelle **M5** ed **M6**)

	t_{rit} (min)	k	N
Acetofenone	3.35	1.33	12300
Toluene	7.77	4.40	18000
Naftalene	10.02	5.96	16000

Tabella M5. Parametri caratteristici della colonna **Pursuit XR-s C18** 0,20 mL/min con 60/40 ACN/H₂O su cromatografo B, calcolati dai valori di tempo di ritenzione (t_{rit}) ed ampiezza a metà altezza (w_h) misurati dal cromatogramma riportato in figura **M8 (a)** ($V_0 = 0,288$ mL); $k = (t_{rit} - t_0)/t_0$; $N = 5,55 * (t_{rit}/w_h)^2$.

	t_{rit} (min)	k	N
Acetofenone	4,12	1,45	13000
Toluene	8,50	4,06	16000
Naftalene	11,32	5,74	13000

Tabella M6. Parametri caratteristici della colonna **Supelcosil LC-18** 1,00 mL/min con 70/30 MeOH/H₂O su cromatografo A, calcolati dai valori di tempo di ritenzione (t_{rit}) ed ampiezza a metà altezza (w_h) misurati dal cromatogramma riportato in figura **M8 (b)**; $k = (t_{rit} - t_0)/t_0$; $N = 5,55 * (t_{rit}/w_h)^2$.

5.3 Cromatografo GC-MS

E' stato utilizzato, per le misure GC-MS, un sistema della Hewlett Packard composto dalle seguenti parti:

- un cromatografo modello 7890A;
- un iniettore capace di lavorare sia in modalità split sia in modalità splitless;
- un rivelatore di massa a quadrupolo singolo modello 5975C, con frammentazione a impatto elettronico capace di lavorare fino a 70 eV. Lo strumento era capace di lavorare sia in scan totale degli ioni (TIC) sia con un numero selezionato di frammenti soltanto (SIM).
- un campionatore automatico modello 7683B.

Il sistema aveva una gestione automatica, che veniva realizzata attraverso un personal computer interfacciato direttamente con il cromatografo 7890A. Il software di gestione era Agilent MSD Chem Station versione E.01.01.335.

5.4 Estrattore a fluidi supercritici

Per le estrazioni a fluidi supercritici, è stato usato l'estrattore Hewlett Packard "HP 7680T". Lo schema a blocchi dello strumento è riportato nella figura **M9**. L'estrattore era pilotato da un personal computer, e la gestione delle estrazioni era completamente automatica.

La matrice da estrarre è posta in una cella verticale da 7 mL (i.d. 11,75 mm). La cella è riempita con il biossido di carbonio liquido, che è poi portato allo stato supercritico alle condizioni di pressione e temperatura selezionate per il processo. L'estrazione avviene per un tempo definito facendo passare nella cella il mezzo supercritico con un flusso e alle condizioni di T e P selezionate, e può essere preceduta da un tempo statico di contatto tra il mezzo supercritico e la matrice. La soluzione supercritica proveniente dalla cella è quindi indirizzata verso una trappola passando attraverso un ago mantenuto ad una temperatura costante scelta dall'operatore. La trappola è costituita da un cilindro in acciaio contenente una fase solida, mantenuta ad una temperatura costante determinata dall'operatore. Le trappole a stato solido erano disponibili con diverse fasi solide di riempimento ma, nel corso della presente sperimentazione, l'unica trappola usata aveva un riempimento octadecilsilil (C18). Nella trappola la pressione è quella atmosferica, quindi il biossido di carbonio ritorna gassoso, depositando gli estratti sulla fase solida. Alla fine del ciclo di estrazione, la trappola è trattata con un solvente e la soluzione è raccolta in una o più vials da 2,5 mL. E' possibile programmare il numero di cicli di trattamento della trappola, il tipo e la quantità di solvente usato per ogni ciclo di trattamento. Lo strumento può essere caricato con un massimo di ventuno vials.

5.5 Altre apparecchiature

Le centrifugazioni sono state condotte con uno strumento "**Hettich Universal 320**". Al rotore erano sospesi quattro holder capaci di ospitare fino a sette tubi da centrifuga 100 x15.50 mm. In questa configurazione, la velocità di rotazione massima possibile era 4000 rpm.

Un rotavapor "**Büchi R134**" è stato usato per concentrare o portare a secco le soluzioni. Il rotavapor era equipaggiato con un bagno d'acqua "**Büchi B-480**" per poter mantenere a temperatura costante il pallone contenente la soluzione da trattare. Il vuoto del sistema è stato mantenuto con una pompa a membrana "**KNF modello N840**".

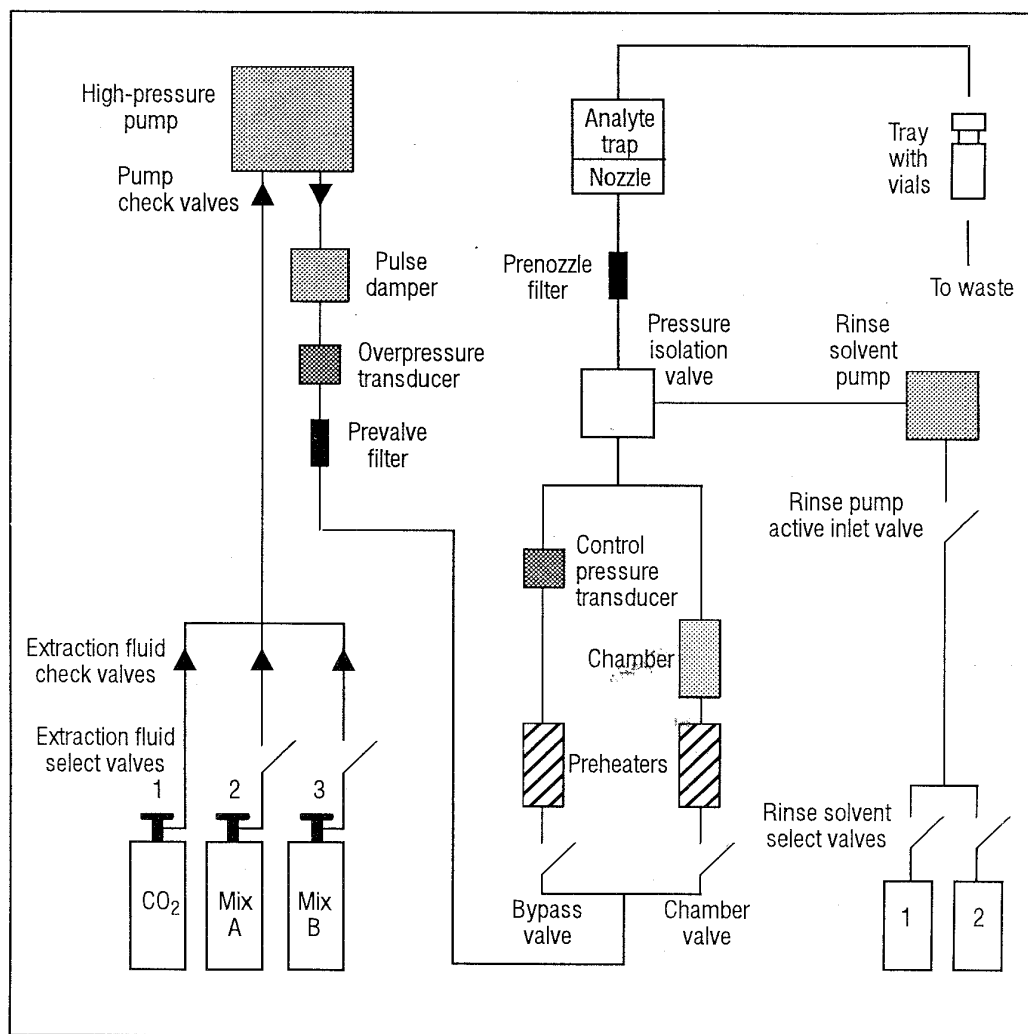


Figura M9. Schema a blocchi dell'estrattore a fluidi supercritici Hewlett Packard "HP 7680T"

Un bagno ad ultrasuoni "Elma Transsonic Digital" da 35 KHz e 320 W è stato usato per la preparazione delle soluzioni etanoliche di propoli e per il trattamento con fase oleosa.

Le pesate sono state fatte con una **bilancia analitica "Sartorius"** con quattro cifre decimali (fino a 100 g): l'incertezza di $\pm 0,1$ mg introdotta da questa bilancia si è rivelata sufficiente per la maggior parte delle situazioni che si sono presentate nel corso della presente sperimentazione. Per poter pesare quantità comprese tra le centinaia di μg a pochi mg, è stata usata una **bilancia analitica "Sartorius"** con cinque cifre decimali (fino a 30 g), che introduceva un'incertezza di $\pm 0,01$ mg.

6. Caratterizzazione di campioni di propoli

6.1 Determinazioni spettrofotometriche

6.1.1 Spettri UV degli EEP

Gli EEP erano diluiti in etanolo in matraccio tarato, in modo da avere un'assorbanza sul massimo nell'intorno di 0.5 (100-120 μL di EEP a 5000 ppm in matraccio da 25 mL, concentrazione finale circa 25 ppm). Gli spettri erano registrati con lo spettrofotometro Cary 50 nell'intervallo 400-230 nm contro etanolo assoluto. Gli spettri sono stati riportati in assorbanza per unità di concentrazione ($\text{ppm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), valutando la concentrazione rispetto alla sola massa effettivamente dissolta in etanolo (Parte sper., **4.2**; Ris. **1.1**). Gli spettri sono stati integrati nell'intervallo 230-400 nm, e i valori sono stati poi usati per confrontarli con quello ottenuto dagli spettri delle soluzioni esaniche estratte da sospensione acida (Parte sper., **6.6.2.2.1**; Ris. **1.3**). Gli spettri sono stati derivatizzati su tutto l'intervallo e migliorati con la funzione di smoothing "Adjacent averaging" su dieci punti, usando il software Origin 6.1. Le due lunghezze d'onda di massimo e minimo del grafico della derivata prima degli spettri erano i punti di flesso dello spettro.

6.1.2 Determinazione spettrofotometriche del contenuto di classi di composti

I metodi spettrofotometrici per l'analisi quantitativa di classi di composti sono stati messi a punto tarando e verificando la linearità di metodi già descritti in letteratura specificamente per la propoli [38].

Per la determinazione di **flavoni e flavonoli**, è stata tracciata una retta di taratura usando la galangina come composto di riferimento. In cinque matracci da 25 mL sono stati misurati 15 mL di MeOH e 500 μL di una soluzione al 5 % in peso di AlCl_3 in MeOH. Si aggiungevano quindi 40 μL di DMSO nel primo matraccio (bianco), e quantità variabili di una soluzione standard di galangina negli altri quattro matracci, in modo da avere le concentrazioni finali nell'intervallo 1.2 -12 ppm. Si portava quindi a volume con MeOH, e si lasciava riposare per 30 minuti. Passato questo tempo, si prendevano con lo spettrofotometro Gilson UV-7500 letture di assorbanza delle quattro soluzioni contro il bianco a 425 nm. I valori di assorbanza erano riportati contro i valori di concentrazione, e interpolati con una retta passante per

l'origine (vedi figura **M10 (a)** e Appendice 1, Tabella **A182**). Le prove sui campioni di propoli sono state eseguite come descritto per gli standard, preparando sempre il bianco e aggiungendo una quantità di propoli pari a circa 1250 µg. I flavoni e flavonoli totali nella propoli sono stati espressi come mg/g di galangina.

Per la determinazione di **flavanoni e didroflavonoli**, è stata tracciata una retta di taratura usando la pinocembrina come composto di riferimento. Sono stati presi cinque matracci da 10 mL: nel bianco è stato posto 1 mL di MeOH, negli altri quantità variabili di una soluzione standard di pinocembrina, quindi una quantità di MeOH tale che il volume finale fosse 1 mL. In tutti i matracci si aggiungevano 2 mL di una soluzione metanolica di 2,4 dinitro fenil idrazina (Parte sper., **2.6**). Si scaldava in bagno termostatico per 50 minuti a 50 °C. Una volta fredde, le soluzioni erano portate a volume con potassa metanolica circa 1,4 M. Un'aliquota di 500 µL di ciascuna di queste soluzioni era trasferita in un matraccio da 25 mL e si portava a volume con MeOH. Le soluzioni erano filtrate su filtro da siringa (Acrodisc in PTFE da 0.45 µm) prima dell'analisi. Si prendevano con lo spettrofotometro Gilson UV-7500 letture di assorbanza contro il bianco a 486 nm. L'intervallo di concentrazione di pinocembrina era 0,36-3,6 ppm. I valori di assorbanza sono stati riportati contro i valori di concentrazione, e interpolati con una retta passante per l'origine (vedi figura **M10 (b)** e Appendice 1, Tabella **A182**). Le prove sui campioni di propoli sono state eseguite come descritto per gli standard, preparando sempre il bianco e aggiungendo una quantità iniziale di propoli pari a circa 3000 µg. I flavanoli e diidroflavonoli totali nella propoli sono stati espressi come mg/g di pinocembrina.

Per la determinazione dei **fenoli totali** con il metodo Folin-Ciocalteu, è stata tracciata una retta di taratura usando una miscela bilanciata di pinocembrina e galangina (2:1 in massa). Sono stati preparati cinque matracci da 25 mL, ed in ciascuno di essi sono stati misurati 7,5 mL di acqua. Nel primo matraccio (bianco) si aggiungevano 200 µL di EtOH, negli altri volumi noti dalla soluzione di galangina+pinocembrina. L'intervallo di concentrazioni di galangina +pinocembrina standard usato per la taratura era 0.65-6.5 ppm. Alle soluzioni si aggiungevano quindi 2 mL del reattivo Folin-Ciocalteu e 3 mL di una soluzione 2 M di carbonato di sodio, si portava a volume con acqua, e si lasciava a riposo per due ore. Si misuravano quindi le assorbanze contro il bianco a 760 nm con lo spettrofotometro Gilson UV-7500. I valori registrati erano riportati in funzione dei valori di concentrazione, e interpolati con una retta passante per l'origine (vedi figura **M10 (c)** e Appendice 1, Tabella

A182). Le prove sui campioni di propoli sono state eseguite come descritto per gli standard, preparando sempre il bianco e aggiungendo una quantità di propoli pari a circa 500 µg. I fenoli totali nella propoli sono stati espressi come mg/g di galangina +pinocembrina.

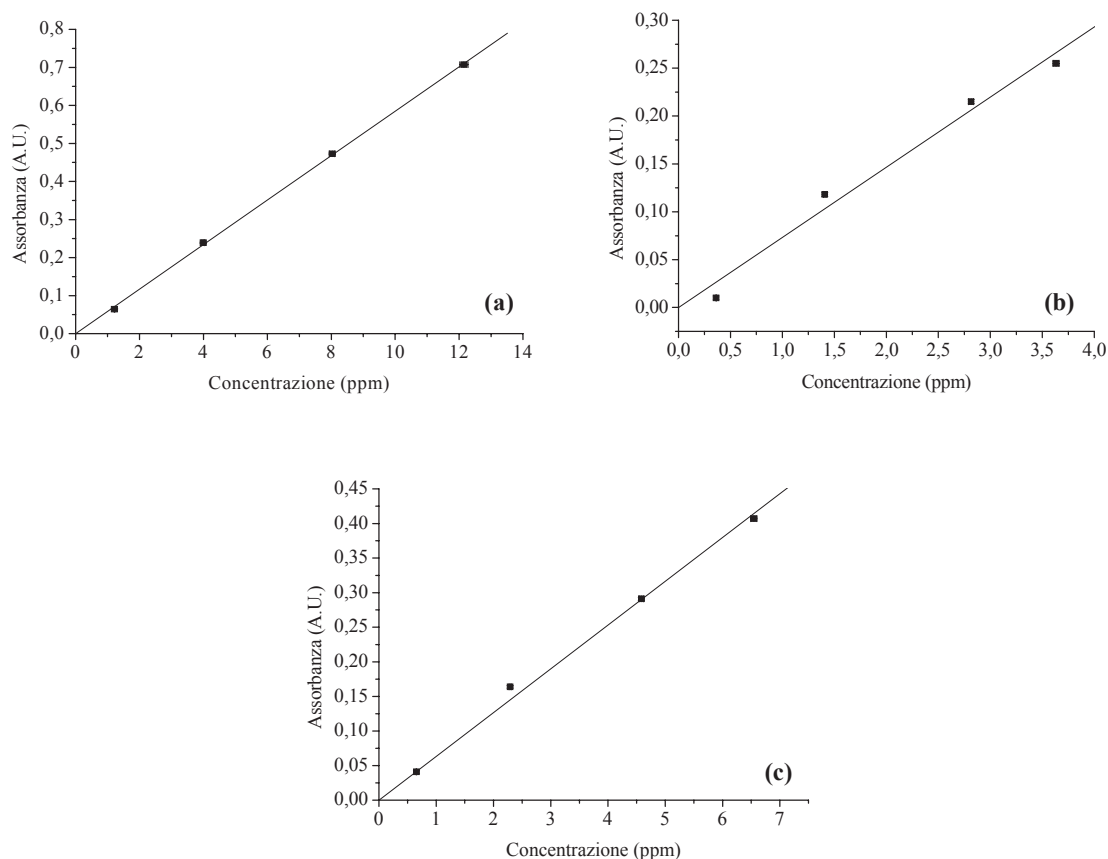


Figura M10. Rette di taratura dei metodi spettrofotometrici per la determinazione del contenuto di classi di composti: (a) flavoni e flavonoli come galangina, 1,2-12 ppm in MeOH contenente 0,1 % in peso di $AlCl_3$, assorbanza registrata a 425 nm; (b) flavanoni e diidroflavonoli come pinocembrina 0,36-3,6 ppm, dopo trasformazione in 2,4 dinitrofenil idrazone, in KOH 20 mM in MeOH, assorbanza registrata a 486 nm; (c) fenoli totali come galangina:pinocembrina 1:2 nell'intervallo di concentrazione 0,65-6,5 ppm in carbonato di sodio 240 mM e in presenza di reattivo di Folin Ciocalteau diluito 3:25, assorbanza registrata a 760 nm (Appendice 1, Tabella A182).

6.1.3 Determinazione spettrofotometrica del potere antiossidante

Il potere antiossidante dei campioni di propoli è stato valutato misurando la capacità di ridurre il Fe (III) a Fe (II) in soluzione acquosa acida, in presenza del complessante TPTZ. Il complesso Fe (II)- TPTZ generato dalla reazione di riduzione è infatti intensamente colorato in blu e può essere determinato per via spettrofotometrica con grande sensibilità a 593 nm

[88]. Il metodo è stato messo a punto basandosi su di un metodo già riportato in letteratura per la misura del potere antiossidante del plasma [89].

Per la misura del coefficiente di estinzione del complesso Fe (II)- TPTZ si è proceduto come segue. Si preparavano cinque matracci da 25 mL, ed in ciascuno si misuravano 3 mL di acqua, si portava quasi a volume con la soluzione reattiva (Parte sper., **2.6**) preparata però senza aggiungere Fe³⁺. Si aggiungevano invece quattro aliquote crescenti di soluzione di Fe (II) circa 0,1 M (Parte sper., **2.6**), in modo da avere concentrazioni nell'intervallo 8-33 µM, e si portava a volume sempre con la miscela reattiva. Si prendevano letture di assorbanza contro il bianco. Il coefficiente di estinzione era pari alla pendenza della retta dell'assorbanza a 593 nm in funzione della concentrazione (Appendice **1**, Tabella **A181**).

Le determinazioni sui campioni reali sono state condotte preparando le soluzioni in celle spettrofotometriche, in cui si misuravano 240 µL di acqua e 2,4 mL della miscela reattiva di Fe (III). Nella prima, si aggiungeva un'aliquota della soluzione etanolica od idroetanolica in esame (10-40 µg di propoli totale, pari a 20-80 µL di EEP di propoli diluiti a circa 500 ppm), nella seconda (il bianco) lo stesso volume di etanolo assoluto od idroalcolica. Le soluzioni così preparate erano poste in stufa a 40 °C a reagire, il tempo zero era quello in cui si miscelava la propoli con il reattivo. Tutte le misure spettrofotometriche sono state eseguite a 593 nm con lo spettrofotometro Gilson UV-7500 contro il bianco. La quantità di Fe (II) generata è stata calcolata usando il coefficiente di estinzione del complesso Fe (II)- TPTZ. Il potere antiossidante è stato espresso come µg (Fe²⁺)/µg (propoli).

L'evoluzione nel tempo della reazione propoli-Fe (III) è stata misurata eseguendo una prova come descritto (25,5 µg di propoli L3), prendendo letture di assorbanza a 593 nm a tempi definiti, contro un bianco preparato nella stessa maniera (vedi figura **M11**).

La ripetibilità del metodo e la determinazione del tempo di reazione a cui eseguire le misure sono state valutate eseguendo quattro prove distinte, tutte con la stessa metodologia e quantità descritti al capoverso precedente. Sono state prese letture di assorbanza delle soluzioni a 593 nm contro il bianco, a venti e trentacinque minuti da tempo zero. E' stato scelto il tempo di venti minuti perché più riproducibile, ed è stata determinata la SD dell'assorbanza misurata nelle quattro prove, che è stata poi usata per stimare l'incertezza sulle prove sui campioni reali (vedi tabella **M7**).

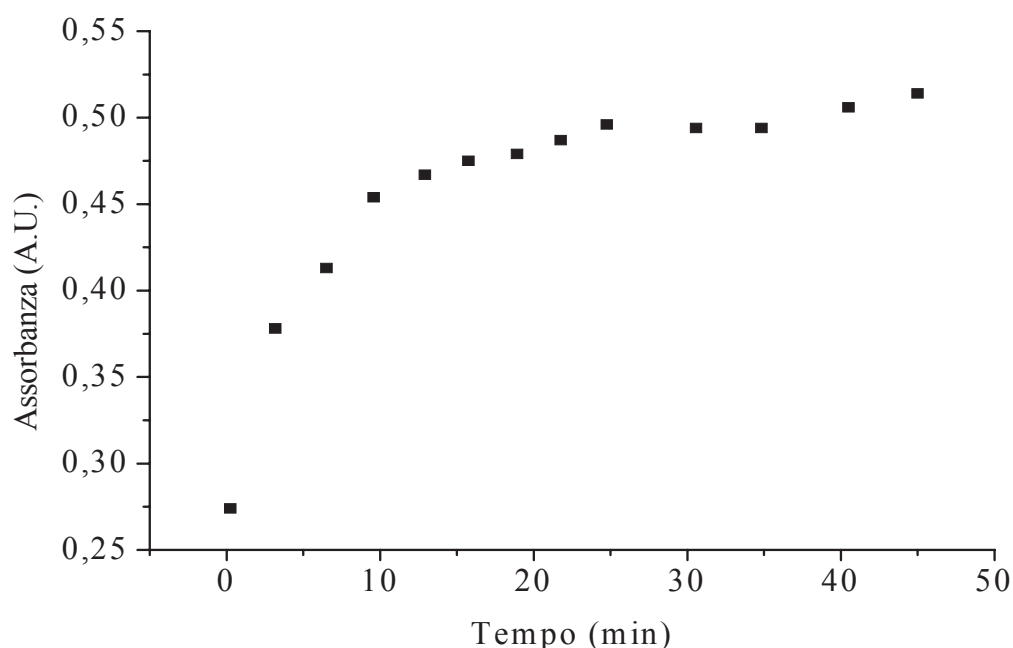


Figura M11. Andamento nel tempo del potere antiossidante di propoli L3 (25,5 μg) in una soluzione di Fe (III) in tampone acetico (Parte sper., 2.6) a $T=40^\circ\text{C}$, valutato misurando l'assorbanza a 593 nm (t_0 aggiunta della propoli)

La linearità del metodo in presenza di propoli è infine stata valutata eseguendo misure di potere antiossidante di EEP di propoli L3 a quattro diverse concentrazioni, nell'intervallo 10-42 μg di propoli. Si vede (figura M12) che, nell'intervallo in esame, il risultato è ottimo. La pendenza di questa prova è pari al potere antiossidante della propoli, nel caso specifico per la propoli L3 è stato misurato un valore di $0,147 \pm 0,001 \mu\text{g}(\text{Fe}^{2+})/\mu\text{g}(\text{propoli})$.

Soluzione	Ass _{20min} (A.U.)	Ass _{35min} (A.U.)
1	0,483	0,540
2	0,468	0,519
3	0,464	0,506
4	0,430	0,483
Media	0,461	0,512
RDS	4,85	12,3

Tabella M7. Risultati della misura del potere antiossidante degli EEP di propoli L3 (25,5 μg) in una soluzione di Fe (III) in tampone acetico (Parte sper., 2.6) a $T=40^\circ\text{C}$, valutato misurando l'assorbanza di quattro soluzioni a 593 nm a due diversi tempi, 20 e 35 minuti (t_0 aggiunta della propoli)

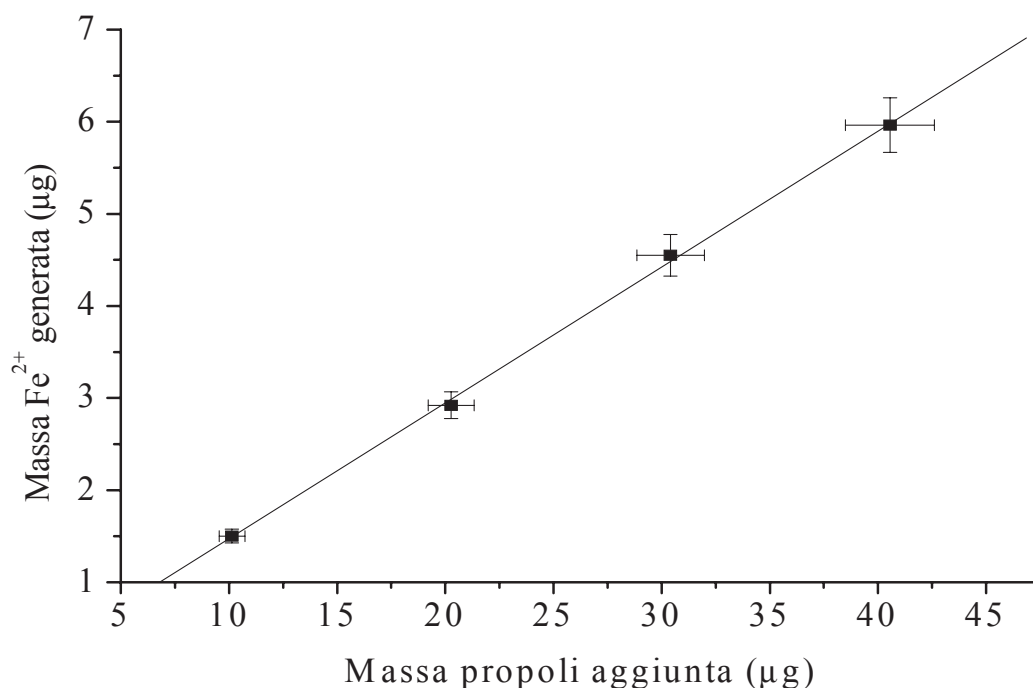


Figura M12. Misura di linearità del metodo della misura del potere antiossidante di EEP di propoli L3 nell'intervallo di quantità 10-42 µg, in una soluzione di Fe (III) in tampone acetico (Parte sper., 2.6) a $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, quantitativa del Fe (II) prodotto dall'assorbanza a 593 nm (Appendice 1, Tabella A181).

6.2 Caratterizzazione cromatografica di campioni di propoli

6.2.1 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'inverno 2006

Nella figura **M13** è riportato lo schema a blocchi delle procedure analitiche usate nella caratterizzazione dei campioni di propoli raccolti nell'inverno 2006.

Il metodo cromatografico **G1**, usato per la caratterizzazione delle soluzioni, è il seguente:

Colonna: **Supelcosil LC-18**, 250 x4,6 mm, particelle da 5 µm;

Eluenti: A 1 % acido acetico in H₂O; B ACN;

Metodo di eluizione: 2.5 minuti, B 25 %, isocratica;
37.5 minuti, B 90 %, gradiente lineare;

3 minuti, B 90 %, isocratica;

flusso 1.00 mL/min;

Rivelazione: variabile.

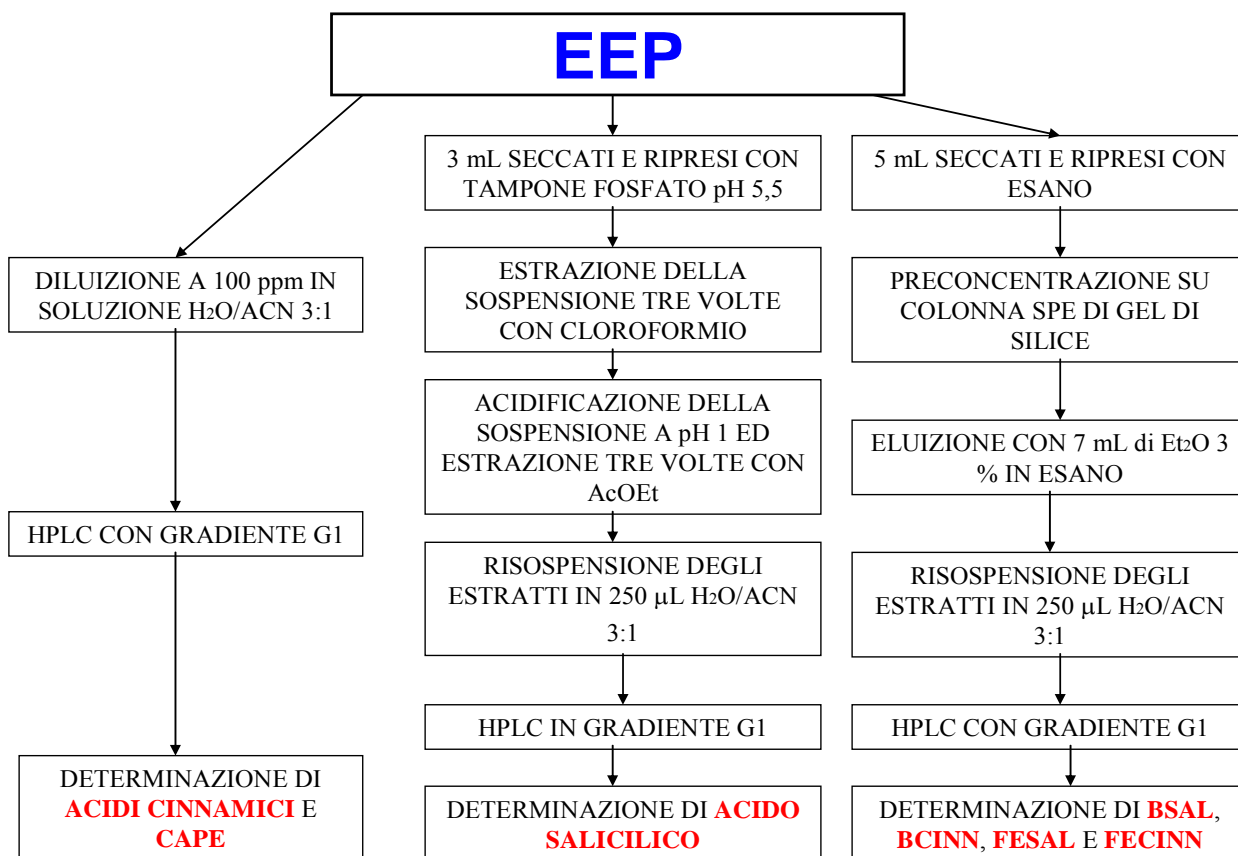


Figura M13. Schema a blocchi delle metodiche analitiche usate nella caratterizzazione cromatografica dei campioni di propoli raccolti nell'inverno 2006

6.2.1.1 Determinazione di acidi organici e CAPE

Un volume noto di EEP a 5000 ppm (circa 200 µL in matraccio da 10 mL) era diluito in H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %), in modo da avere una concentrazione finale di 100 ppm circa (loop da 20 µL, per una quantità iniettata pari a circa 2 µg). Le analisi HPLC sono state eseguite con la metodica G1 sul cromatografo A (Parte sper., 5.2), rivelando come segue: 8 minuti, 320 nm; 8 minuti 275 nm; 340 nm, fino alla fine.

I picchi sono stati assegnati per coiniezione con soluzioni di standard puri (cromatogramma degli standard in figura M14). L'analisi quantitativa è stata eseguita tracciando rette di taratura nell'intervallo di interesse su cinque punti. Il segnale usato nell'analisi quantitativa è stata l'area del picco. I parametri caratteristici del metodo per l'analisi quantitativa sono riportati in tabella M8. Prima dell'integrazione del picco del CAPE nei campioni di propoli, si è proceduto alla deconvoluzione.

(a)	LOD (pg)	LOQ (pg)
Acido caffeico	28	94
Acido p-cumarico	25	82
Acido ferulico	27	90
Acido t-cinnamico	120	400
CAPE	75	250

(b)	Intervallo calibrazione (ng)	Sensibilità ($\mu V*s$)/ pg	Sensibilità relativa	R
Acido caffeico	80-320	6,35	1	0,99991
Acido p-cumarico	20-140	7,25	1,14	0,99799
Acido ferulico	20-100	6,65	1,05	0,99977
Acido t-cinnamico	10-50	1,5	0,236	0,99901
CAPE	80-360	3,6	0,567	0,99960

Tabella M8. Parametri caratteristici del metodo HPLC per la quantificazione di acidi cinnamici e CAPE: (a) limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) espressi come pg iniettati (loop da 20 μ L); (b) parametri delle rette di taratura, l'intervallo di calibrazione è espresso in ng iniettati, la sensibilità è espressa come segnale cromatografico (area) in $\mu V*s$ per massa iniettata in pg, la sensibilità relativa è espressa rispetto a quella dell'acido caffeico posta pari a 1

6.2.1.2 Determinazione dell'acido salicilico

In un imbuto separatore da 25 mL, si misuravano 3 mL di EEP a 5000 ppm. Si allontanava l'etanolo al rotavapor, quindi si risospendeva il residuo in 3 mL di una soluzione di NaH_2PO_4 a pH 5.5 (Parte sper., 2.6). Si estraeva con tre porzioni di cloroformio di 5, 2 e 2 mL rispettivamente. La sospensione acquosa era quindi corretta a pH circa 1 per aggiunta di 1,1 mL di acido cloridrico 1 M, e si estraeva con tre porzioni da 5 mL di acetato di etile. Gli estratti in acetato di etile erano filtrati su solfato di sodio e portati a secco al rotavapor. Il residuo secco era ripreso con 240 μ L di una miscela H_2O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata

con acido acetico 0,75 %) e filtrato su filtri in PTFE da siringa da 0.45 μm (Acrodisc), per un fattore di concentrazione finale di 12,5. Questa soluzione era analizzata mediante HPLC con la metodica G1, rivelando a 305 nm. Il bianco della preparazione è stato determinato trattando 3 mL di etanolo.

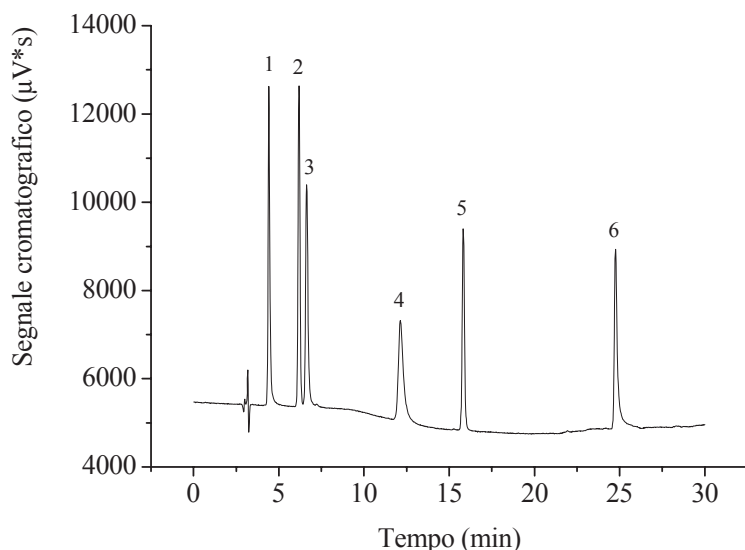


Figura M14 Cromatogramma degli standard di acidi benzoici, cinnamici e CAPE, iniettati in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %) ed eluiti con il gradiente G1 rivelando a 293 nm. 1. Acido caffeico, 14 ng; 2. acido p-cumarico 9 ng; 3. acido ferulico 12 ng; 4. acido salicilico 45 ng; 5. acido t-cinnamico 11 ng; 6. CAPE 24 ng.

(a)	LOD (pg)	LOQ (pg)
Acido salicilico	88	300

(b)	Intervallo calibrazione (ng)	Sensibilità ($\mu\text{V*s}$)/ pg	Sensibilità relativa	R
Acido salicilico	10-110	2,05	0,323	0,99991

Tabella M9. Parametri caratteristici del metodo HPLC per la quantificazione di acido salicilico: (a) limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) espressi come pg iniettati (loop da 20 μL); (b) parametri delle rette di taratura, l'intervallo di calibrazione è espresso in ng iniettati, la sensibilità è espressa come segnale cromatografico (area) in $\mu\text{V*s}$ per massa iniettata in pg, la sensibilità relativa è espressa rispetto a quella dell'acido caffeico posta pari a 1 (vedi Tabella M8)

Il picco dell'acido salicilico è stato assegnato per coiniezione con soluzioni di standard puro. Per l'analisi quantitativa, è stata tracciata una retta con soluzioni standard. I parametri di interesse per l'analisi quantitativa sono riportati in tabella **M9**.

Il processo di preparazione del campione è stato provato su quattro soluzioni standard di acido salicilico, e le soluzioni sono state analizzate. I valori di recupero sono riportati in tabella **M10**.

Le quantità trattate sono state interpolate in funzione delle quantità aggiunte, e la pendenza è stata trovata pari a $0,61 \pm 0,02$, $R = 0,99623$. Le quantità di acido salicilico determinate analiticamente nei campioni di propoli sono quindi state corrette per questo valore di resa.

Quantità trattate (ng)	Quantità recuperate (ng)	Quantità recuperata (%)
114,5	67	58,5
229	147	64,2
687	467	68,0
1374	811	59,0
Media		0,61
SD		0,02

Tabella M10. Quantità di acido salicilico standard sottoposte al trattamento di preparazione analitica descritto in Figura M13, per aggiunta di quantità crescenti di una soluzione in ACN 18,3 ppm a 3 mL di etanolo in un imbuto separatore da 25 mL, quantità recuperate in assoluto e percentuali, bianco con etanolo puro

6.2.1.3 Determinazione di esteri cinnamici e salicilici

Le colonne SPE sono state preparate come segue. Un pasteur spezzato sul fondo (i.d. 5,6 mm) era tappato da un pezzo di ovatta pretrattato in etanolo e seccato in stufa. Si decantava quindi del gel di silice (Parte sper., 3.2) sospeso in esano, sino a raggiungere un'altezza pari a 2.5 cm, quindi condizionata con 5 mL di una soluzione di etere etilico al 3 % in esano.

Per la tracciatura delle curve di recupero degli esteri standard, si è proceduto come segue. Un volume noto di una soluzione standard in esano era adsorbito in testa ad una colonnina. Si trattava con un volume noto di eluente, e si raccoglieva la soluzione in un matraccio da 10 mL. Si ripeteva l'esperimento sulla stessa quantità di estere trattando la colonnina con diversi

volumi di eluente. Gli esteri eluiti erano determinati spettrofotometricamente, dopo aver portato a volume con esano. Le curve di recupero sono state tracciate riportando la resa percentuale di recupero in funzione del volume di eluente usato per il trattamento.

Per il trattamento dei campioni di propoli, si è proceduto come segue: 3 mL di EEP a 5000 ppm erano misurati in un pallone da 5 mL, e portati a secco nel rotavapor. Si riprendeva con 500 μ L di esano, e si preconcentrava in testa ad una colonnina di gel di silice. Si trattava con 7 mL di eluente, e si raccoglieva in un pallone da 10 mL. Si portava a secco questa soluzione esanica con il rotavapor, e si risospendeva con 250 μ L di una soluzione 1:3 di ACN/H₂O 1% in acido acetico.

Le analisi HPLC sono state eseguite con il metodo di eluizione **G1** sul cromatografo A, rivelando a 293 nm. I picchi degli esteri sono stati assegnati per coincidenza con soluzioni di standard puri. L'analisi quantitativa è stata eseguita tracciando rette di taratura nell'intervallo di interesse su quattro punti, ed i parametri di interesse per l'analisi quantitativa sono riportati in tabella **M11**.

(a)	LOD (pg)	LOQ (pg)
BSAL	300	1000
BCINN	60	200
FESAL	324	1100
FECINN	60	200

(b)	Intervallo calibrazione (ng)	Sensibilità (μV*s)/ pg	Sensibilità relativa	R
BSAL	20-500	1,1	1	0,99998
BCINN	10-200	5,6	5,09	0,99995
FESAL	20-500	1	0,91	0,99929
FECINN	10-200	5,2	4,73	0,99993

Tabella M11. Parametri caratteristici del metodo HPLC per la quantificazione di esteri cinnamici e salicilici:

(a) limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) espressi come pg iniettati (loop da 20 μ L); **(b)** parametri delle rette di taratura, l'intervallo di calibrazione è espresso in ng iniettati, la sensibilità è espressa come segnale cromatografico (area) in μ V*s per massa iniettata in pg, la sensibilità relativa è espressa rispetto a quella del BSAL posta pari a 1

6.2.2 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'autunno 2007

Nella figura **M15** è riportato lo schema a blocchi completo usato nella caratterizzazione dei campioni di propoli raccolti nell'autunno 2007. I metodi cromatografici **G2** e **I3**, usati per la caratterizzazione HPLC delle soluzioni, sono in tabella **M12**.

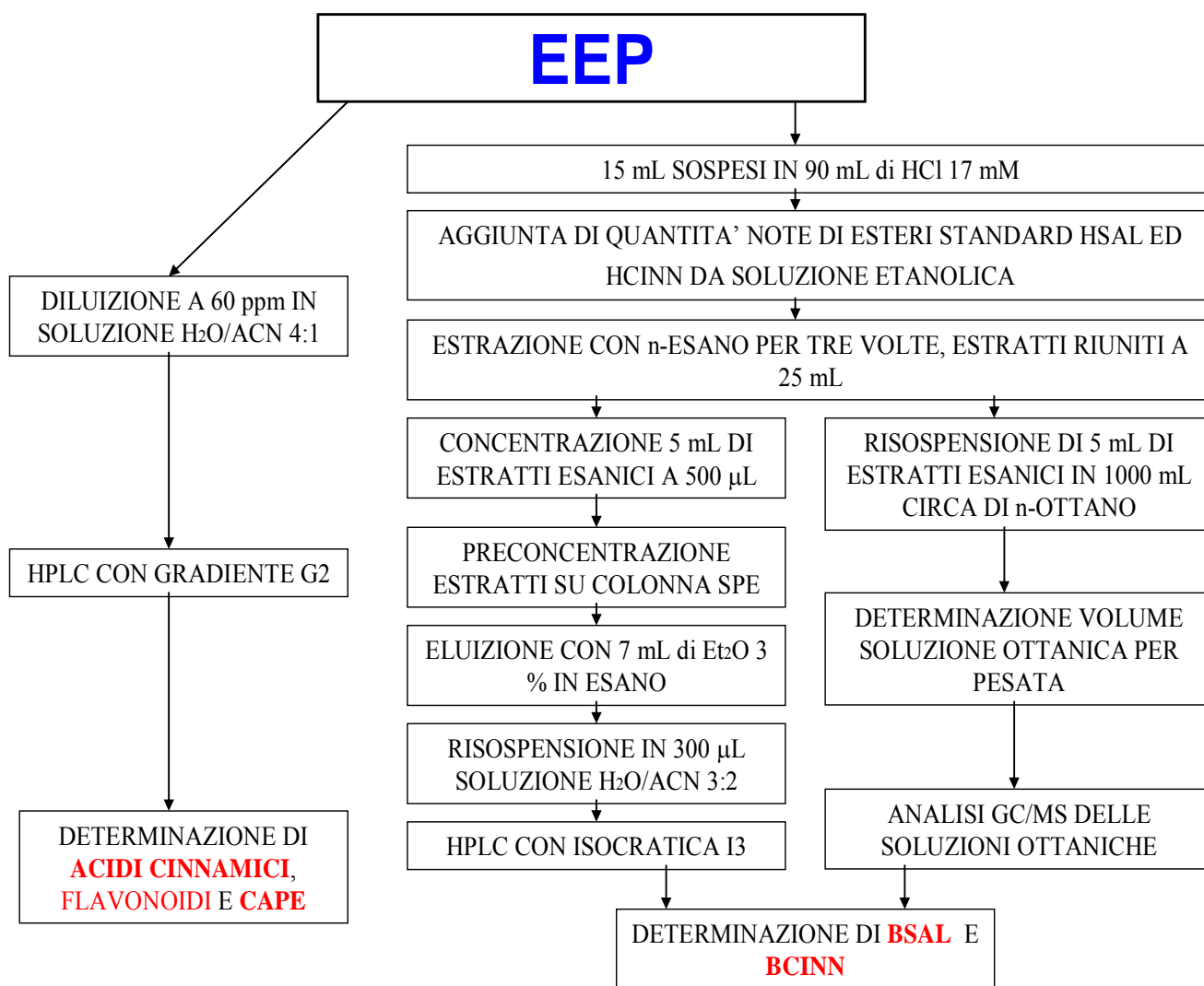


Figura **M15**. Schema a blocchi della caratterizzazione cromatografica dei campioni di propoli raccolti nell'autunno 2007

G2	Colonna:	Pursuit C18 , 150 x2.1 mm, particelle da 3 µm;
	Eluenti:	A 0.1 % acido formico in acqua; B 0.1 % acido formico in ACN;
	Metodo di eluizione:	2 minuti, B 20 %, isocratica; 26.5 minuti, B 100 %, gradiente -2,0; 0,5 minuti, B 100 %, isocratica; flusso 0,20 mL/min;
	Rivelazione:	320, 293, 275, 250 nm.
I3	Colonna:	Supelcosil LC-18 , 250 x4,6 mm, particelle da 5 µm;
	Eluenti:	A 1 % acido acetico in H ₂ O; B ACN;
	Metodo di eluizione:	45 minuti, B 60 %, isocratica; flusso 1,00 mL/min;
	Rivelazione:	293 nm.

Tabella M12. Metodi cromatografici usati per le analisi HPLC dei campioni di propoli raccolti in autunno 2007

6.2.2 1 Determinazione di acidi organici, CAPE e flavonoidi

Un volume noto di EEP era diluito in H₂O/ACN 4:1 (fase acquosa acidificata con acido formico 0,1 %), in modo da raggiungere una concentrazione finale di circa 60 ppm (loop da 2 µL, per un totale di circa 120 ng iniettati). Le analisi HPLC erano eseguite con la metodica **G2** (vedi Tabella **M12**), rivelando ciascun campione a quattro le lunghezze d'onda: 320, 293, 275 e 250 nm.

L'assegnazione dei picchi è stata preliminarmente condotta mediante coiniezione con soluzioni standard. Le assegnazioni sono state quindi verificate mediante determinazione dei valori di rapporti di intensità di segnale a diverse lunghezze d'onda. Tali valori sono stati confrontati con rapporti di riferimento, misurati con lo stesso gradiente con le soluzioni di standard di interesse. Tutti i valori dei rapporti di intensità misurati sui campioni reali sono stati divisi per il valore determinato sugli standard prima dell'elaborazione statistica, in modo che il valore atteso fosse per tutti pari ad uno. I dettagli di queste elaborazioni sono riportati in **Appendice 4**.

L'analisi quantitativa è stata eseguita con rette di taratura tracciate su quattro punti con soluzioni di standard puri nell'intervallo di concentrazione di interesse. Le determinazioni quantitative degli acidi cinnamici sono state eseguite usando il segnale cromatografico registrato a 320 nm, quelle dei flavonoidi con il segnale registrato a 250 nm. I parametri significativi per l'analisi quantitativa sono riportati in tabella **M13**.

(a)	LOD (pg)	LOQ (pg)
Acido caffeico	10	30
Acido p-cumarico	2	7
Acido ferulico	3	10
Quercetina	7	24
Apigenina	8	28
Kaempferolo	5	17
Crisina	3	10

(b)	Intervallo calibrazione (ng)	Sensibilità ($\mu V*s$)/ pg	Sensibilità relativa	R
Acido caffeico	0,1-3,7	43	1	0,99838
Acido p-cumarico	0,1-4,0	195	4,53	0,99998
Acido ferulico	0,1-4,3	130	3,02	0,99473
Quercetina	0,11-0,44	37,5	0,872	0,99992
Apigenina	0,12-0,48	32	0,744	0,99999
Kaempferolo	0,14-0,54	35	0,814	0,99979
Crisina	0,2-10	65	1,51	0,99974

Tabella M13. Parametri caratteristici del metodo HPLC per la quantificazione di acidi cinnamici e flavonoidi con il metodo cromatografico **G2** (Tabella **M12**): **(a)** limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) espressi come pg iniettati (loop da 2 μL); **(b)** parametri delle rette di taratura, l'intervallo di calibrazione è espresso in ng iniettati, la sensibilità è espressa come segnale cromatografico (area) in $\mu V*s$ per massa iniettata in pg, la sensibilità relativa è espressa rispetto a quella dell'acido caffeico posta pari a 1. Acidi cinnamici quantificati con il segnale registrato a 320 nm, flavonoidi con il segnale registrato a 250 nm

6.6.2.2 Determinazione di esteri cinnamici e salicilici

6.6.2.2.1 Estrazione con esano

In un imbuto separatore da 250 mL, si misuravano 90 mL di una soluzione 17 mM di acido cloridrico, quindi 15 mL di EEP a 5000 ppm, o di etanolo per la determinazione del bianco.

Alla miscela si aggiungeva quindi un volume noto di una soluzione etanolica a titolo noto di HSAL ed HCINN (10,0 e 19,8 μg rispettivamente, figure **M1** ed **M16**). Si estraeva la risultante sospensione con tre porzioni distinte di 30 mL di esano, e si riunivano gli estratti che si filtravano su solfato di sodio anidro. La soluzione esanica era concentrata, trasferita in matraccio da 25 mL, portata a volume sempre con esano e conservata a temperatura ambiente e al buio.

La resa ponderale di questa estrazione è stata determinata seccando un volume noto degli estratti esanici in un pallone tarato, e pesando il residuo secco. Gli spettri UV-VIS sono stati determinati in EtOH per diluizione di una quantità nota della soluzione esanica nell'intervallo spettrale 230-400 nm, in modo da avere un'assorbanza sul massimo pari a circa 0,5 (300-700 μL di estratti esanici). Gli spettri sono stati riportati in assorbanza per unità di concentrazione ($\text{ppm}^{-1} \text{cm}^{-1}$), valutando la concentrazione rispetto alla massa effettivamente estratta in esano.

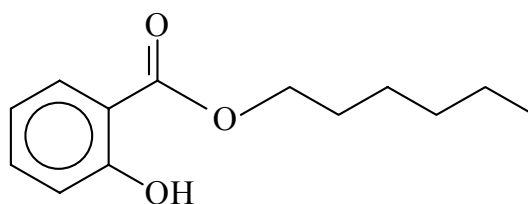


Figura M16 Struttura dell'esil salicilato

6.6.2.2 Analisi GC-MS

5 mL della soluzione esanica ottenuta per estrazione della sospensione di propoli in HCl (Parte sper., **6.6.2.2.1**) erano concentrati al rotavapor in presenza di 500 μL di n-ottano. Quando tutto l'esano era stato allontanato, la soluzione veniva trasferita in una vial tarata con tappo di silicone da 1,5 mL, aiutandosi con n-ottano. Il volume finale della soluzione in n-ottano era determinato per pesata.

Gli standard per la determinazione delle rette di taratura erano preparate nell'intervallo opportuno per diluizione in n-ottano delle soluzioni esaniche standard di BSAL, BCINN, HSAL ed HCINN.

L'autocampionatore era preparato caricando sia le soluzioni incognite sia quattro soluzioni nottaniche degli standard di interesse nell'intervallo di concentrazioni previsto. La sequenza di iniezione prevedeva di iniettare per primi i quattro standard, quindi i campioni alternati con una delle soluzioni standard a concentrazione intermedia. L'iniezione degli standard tra i campioni ha permesso di verificare la stabilità del segnale per tutto il corso del ciclo analitico. Alla fine dell'analisi, venivano nuovamente iniettate tutte e quattro le soluzioni standard.

L'analisi era condotta su di 1 μ L di soluzione, che era iniettato in modalità splitless, con temperatura dell'iniettore 280 °C. Il programma di eluizione era il seguente:

- 120 °C, 2 min;
- 200 °C, 5 °C/min;
- 200 °C, 5 min;
- 280 °C, 10 °C/min;
- 280 °C, 1 min;
- 300 °C, 20 °C/min;
- 300 °C, 20 min.

La ionizzazione è stata condotta per impatto elettronico a 70 eV. Sono state eseguite analisi sia in modalità TIC sia in modalità SIM. Le analisi in TIC sono state condotte per l'identificazione spettrale delle specie.

	$m/z^+ 1$	$m/z^+ 2$	$m/z^+ 3$	$t_{rit} \text{ (min)}$
HSAL	120	138	222	18,42
BSAL	65	91	228	23,97
HCINN	131	148	232	24,31
BCINN	91	131	192	28,68

Tabella M14. Ioni usati per la determinazione quantitativa degli esteri BSAL, BCINN, HSAL, HCINN e loro tempo di ritenzione con il metodo descritto

L'analisi qualitativa in modalità TIC è stata condotta mediante confronto dello spettro di massa con quelli disponibili nella libreria elettronica dello strumento [92]. Dall'analisi degli standard, sono stati scelti tre frammenti per ciascun estere per la successiva analisi SIM (vedi

Tabella **M14**). Tali frammenti sono stati scelti tra quelli più intensi, scartando gli ioni più diffusi e quindi poco caratteristici (Appendice 2).

I picchi degli esteri di interesse nei campioni reali di propoli in modalità SIM sono quindi stati assegnati mediante confronto dei tempi di ritenzione con quelli registrati per gli standard puri, nonché dalla valutazione dei rapporti di intensità dei tre frammenti scelti per l'analisi, confrontati con quelli registrati per gli standard puri. Quest'ultima valutazione aveva un margine di tolleranza di $\pm 20\%$.

(a)	LOD (pg)	LOQ (pg)
BSAL	17	57
BCINN	17	57
HSAL	16	54
HCINN	20	70

(b)	Intervallo calibrazione (ng)	Sensibilità S/ pg	Sensibilità relativa	R	RSD
BSAL	1- 8	1,711	1	0,9980	0,8
BCINN	2- 19	1,781	1,04	0,9932	0,4
HSAL	1- 6	1,835	1,07	0,9930	0,6
HCINN	1- 6	1,434	0,838	0,9927	0,7

Tabella M15. Parametri caratteristici del metodo GC/MS per la quantificazione di esteri cinnamici e salicilici: **(a)** limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) espressi come pg iniettati (1 μ L iniettato in modalità splitless); **(b)** parametri delle rette di taratura, l'intervallo di calibrazione è espresso in ng iniettati, la sensibilità è espressa come segnale cromatografico (area) per massa iniettata in pg, la sensibilità relativa è espressa rispetto a quella del BSAL posta pari a 1.

L'analisi quantitativa è stata condotta mediante tracciatura con standard puri su quattro punti, sempre in condizioni SIM uguali a quelle usate per l'analisi dei campioni reali. La RSD nella determinazione del segnale dei quattro esteri nelle condizioni di analisi è stata determinata iniettando per sette volte una soluzione circa 5 ppm in ciascun estere. I valori di interesse per l'analisi quantitativa sono riportati in Tabella **M15**.

6.6.2.2.3 Analisi HPLC

5 mL degli estratti esanici (Parte sper., 6.6.2.2.1) erano concentrati sino ad arrivare ad un volume di 500 μ L circa. Si preconcentrava in testa ad una colonnina SPE in gel di silice, e si trattava con 7 mL di eluente, raccogliendo in un pallone da 10 mL. Si aggiungevano 250 μ L di H₂O/ACN 2:3 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %), quindi si allontanava l'esano con il rotavapor. Le analisi HPLC erano eseguite con la metodica I3 (Tabella M12). Per i parametri caratteristici del metodo, vedi tabella M16.

(a)	LOD (pg)	LOQ (pg)
BSAL	350	1200
BCINN	80	270
FESAL	2200	7000
FECINN	480	1600

(b)	Intervallo calibrazione (ng)	Sensibilità (μ V*s)/ pg	Sensibilità relativa	R
BSAL	20-500	0,765	1	0,99980
BCINN	10-200	3,37	4,41	0,99995
FESAL	20-500	0,77	1,01	0,99997
FECINN	10-200	3,01	3,93	0,99999

Tabella M16. Parametri caratteristici del metodo HPLC per la quantificazione di esteri cinnamici e salicilici:

(a) limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) espressi come pg iniettati (loop da 20 μ L); (b) parametri delle rette di taratura, l'intervallo di calibrazione è espresso in ng iniettati, la sensibilità è espressa come segnale cromatografico (area) in μ V*s per massa iniettata in pg, la sensibilità relativa è espressa rispetto a quella del BSAL posta pari a 1

7. Trattamenti della propoli

7.1 Trattamenti con biossido di carbonio supercritico

Le condizioni di estrazione usate nel corso della sperimentazione sono in tabella M17.

Parametro	Condizioni
Temperatura CO ₂ (°C)	40
Pressione CO ₂ (MPa)	88
Densità CO ₂ (g/mL)	0,40
Equilibratura (min)	0,50
Tempo estrazione (min)	Variabile
Volume estraente (mL/ vol. di cella)	Variabile
Flusso CO ₂	1,00 mL/min
Temperatura trappola (°C)	40
Temperatura ago (°C)	45
Cicli eluizione trappola (Numero; mL)	4 o 5; 1,5
Solvente rinse	etanolo

Tabella M17. Parametri di estrazione usati nelle prove di trattamento della propoli con CO₂ supercritico

7.1.1 Estrazione di standard di esteri

Su di un batuffolo di ovatta, pretrattato con CO₂ alle condizioni di processo, si gocciolava un volume noto di una soluzione etanolica di standard (50 µg di BCINN o 250 µg di BSAL le quantità totali trattate). Si faceva evaporare l'etanolo sotto un flusso costante di azoto, quindi il batuffolo era introdotto nella cella e si avviava il ciclo di estrazione. Gli estratti erano raccolti dalla trappola trattandola con cinque porzioni da 1,5 mL di etanolo. Sono state eseguite prove a tempi variabili per entrambi gli esteri: 6-12-18-24 minuti (Tabella **R14**). La prova di estrazione che durava 24 minuti è stata quindi ripetuta nove volte, per poter determinare una media ed una deviazione standard del recupero.

Le soluzioni provenienti dal trattamento della trappola erano riunite in un matraccio da 10 mL e si portava a volume con etanolo. Si misurava quindi l'assorbanza alla lunghezza d'onda appropriata (305 nm per BSAL, 277 nm per BCINN) contro etanolo, e si sottraeva il bianco per determinare l'assorbanza da attribuire all'estere.

Per la determinazione del bianco dell'estrattore, sono state condotte sette estrazioni nelle stesse condizioni e al tempo massimo (24 minuti), ma mettendo soltanto etanolo assoluto sull'ovatta pretrattata. Il bianco da sottrarre era determinato come la media dell'assorbanza registrata per le sette soluzioni.

7.1.2 Estrazione di campioni di propoli a ciclo singolo

Il trattamento degli EEP è stato condotto come segue. Su di un batuffolo di ovatta pretrattata con CO₂ alle condizioni di processo, si misuravano 100 µL di EEP di propoli additivata di esteri (Parte sper., **3.1**), e si evaporava l'etanolo sotto un flusso costante di azoto. Il batuffolo era introdotto nella cella e si avviava il ciclo di estrazione (tempo di estrazione 24 minuti). Gli estratti erano recuperati trattando la trappola con cinque porzioni da 1,5 mL di solvente (cinque vials), riuniti in un pallone da 10 mL, portati a secco al rotavapor, ripresi con 200 µL di H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %) ed analizzati mediante HPLC. L'ovatta risultante dall'estrazione era quindi posta su di un imbuto e trattata con circa 5 mL di etanolo. La soluzione, raccolta in un pallone da 5 mL, era portata a secco e ripresa con 360 µL di H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %) ed analizzata mediante HPLC.

Il trattamento della propoli solida è stato condotto come segue. Sulla bilancia analitica a cinque cifre, si faceva la tara ad un batuffolo di ovatta pretrattata con CO₂ alle stesse condizioni di processo. Si tagliava, con l'ausilio di un bisturi, una porzione di propoli additivata di esteri (800-1000 µg), si pesava l'insieme ovatta +propoli, e la massa di propoli processata era valutata per differenza. Il batuffolo era introdotto nella cella e si avviava il ciclo di estrazione (tempi di estrazione 48 minuti). Gli estratti erano recuperati trattando la trappola con cinque porzioni da 1,5 mL di etanolo (cinque vials), riuniti in pallone da 25 mL, portati a secco nel rotavapor e ripresi con 150-300 µL di H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %) ed analizzati mediante HPLC. Il batuffolo contenente il residuo di estrazione era introdotto in un tubo da centrifuga, ed estratto in bagno ad ultrasuoni per dieci minuti alla massima potenza per tre volte con 2,5 mL di etanolo (Parte sper., **4.1**). Gli estratti erano poi riuniti in un pallone da 10 mL, portati a secco nel rotavapor e ripresi con 150-300 µL di H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %) ed analizzati mediante HPLC.

Tutte le soluzioni sono state analizzate mediante HPLC con il seguente gradiente **G4**:

Colonna: **Supelcosil LC-18**, 250 x4,6 mm, particelle da 5 µm;

Eluenti: A 1 % acido acetico in H₂O; B ACN;

Metodo di eluizione: 15 minuti, B 30 %, isocratica;
6 minuti, B 60 %, gradiente lineare;
20 minuti, B 60 %, isocratica;
14 minuti, B 90 % gradiente lineare;
15 minuti, B 90 % isocratica;
flusso 1.00 mL/min;

Rivelazione: 293 nm.

In parallelo ad ogni prova, sono stati analizzati, sempre con lo stesso gradiente, anche gli EEP della propoli sottoposta al trattamento, I recuperi di estrazione e i residui sono state calcolati rispetto ai valori determinati per questa soluzione.

7.1.3 Misure di estrazione di propoli solida in funzione del tempo

Le estrazioni su propoli solida sono state condotte come descritto (Parte sper., **7.1.2**). Sono stati effettuati cinque cicli successivi di estrazione senza aprire la cella o svuotare il sistema: alla fine di ogni ciclo, l'estrattore eseguiva la pulizia della trappola, e durante tale operazione la propoli rimaneva in contatto statico con il mezzo supercritico alle condizioni di estrazione. I volumi di biossido di carbonio utilizzati e i tempi di estrazione di ciascun ciclo e ciascuna prova sono riportati nella tabella **M18**.

Gli estratti provenienti dallo stesso step erano raccolti in un pallone da 25 mL, portati a secco, e riprese con 150-250 μ L di H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %), e queste soluzioni sono state analizzate mediante HPLC con il gradiente **G4** (Parte sper., **7.1.2**). I recuperi di estrazione e i residui sono state calcolati rispetto ai valori determinati nell'analisi degli EEP della propoli usata tal quale.

7.2 Trattamento con fase oleosa

Lo schema di processo è in figura **M17**. In una provetta da centrifuga tarata, si misuravano circa 2,5 cm di estraente cera-olio fuso (Parte sper., **3.3**).

(a)	Tempo estr. (min)	Massa estr. (μg)	Vol. cella	Step 1 (min)	Step 2 (min)	Step 3 (min)	Step 4 (min)	Step 5 (min)
Q1	42	830	6	2	4	8	14	14
O1	84	830	12	6	6	12	24	36
O2	84	960	12	6	6	12	24	36
C1	126	970	18	6	12	24	36	48

(b)	Tempo estr. (min)	Massa estr. (μg)	Vol. cella	Step 1 (mg CO ₂)	Step 2 (mg CO ₂)	Step 3 (mg CO ₂)	Step 4 (mg CO ₂)	Step 5 (mg CO ₂)
Q1	42	830	6	1850	3700	7400	12950	12950
O1	84	830	12	5550	5550	11100	22200	33300
O2	84	960	12	5550	5550	11100	22200	33300
C1	126	970	18	5550	11100	22200	33300	44400

Tabella M18. Durata dei singoli step nelle prove di estrazione in funzione del tempo (a) come tempo di estrazione e (b) massa di CO₂ utilizzata nell'estrazione (flusso costante, pari a 1 mL/min) nelle condizioni riportate nella tabella M17. E' riportata anche la massa di propoli trattata in ciascuna prova in μg e il volume di CO₂ passata in volumi di cella (cella di estrazione, 7 mL)

La quantità di estraente aggiunto si determinava quindi per pesata (in venti prove totali, la media e la SD della quantità di estraente ceroso sono state 4,3 g e 0,4 g). Una volta che l'estraente era solidificato a T ambiente, si aggiungevano 1,8 mL di acqua, e 3,2 mL degli EEP 5000 ppm da trattare. La miscela era trattata nel bagno ad ultrasuoni per dieci minuti, e contemporaneamente miscelato con un agitatore costruito ad hoc (figura M18). La soluzione idroalcolica trattata era centrifugata per dieci minuti a 4000 rpm, trasferita in un matraccio da 10 mL, e portata a volume con una soluzione EtOH/H₂O 65/35. La soluzione così ottenuta era caratterizzata secondo lo schema riportato in figura M15. Il bianco dell'estrazione è stato ottenuto estraendo una soluzione idroalcolica EtOH/H₂O 65/35. I valori analitici sono stati riportati come quantità residua dopo il trattamento rispetto alla quantità attesa nella propoli non trattata.

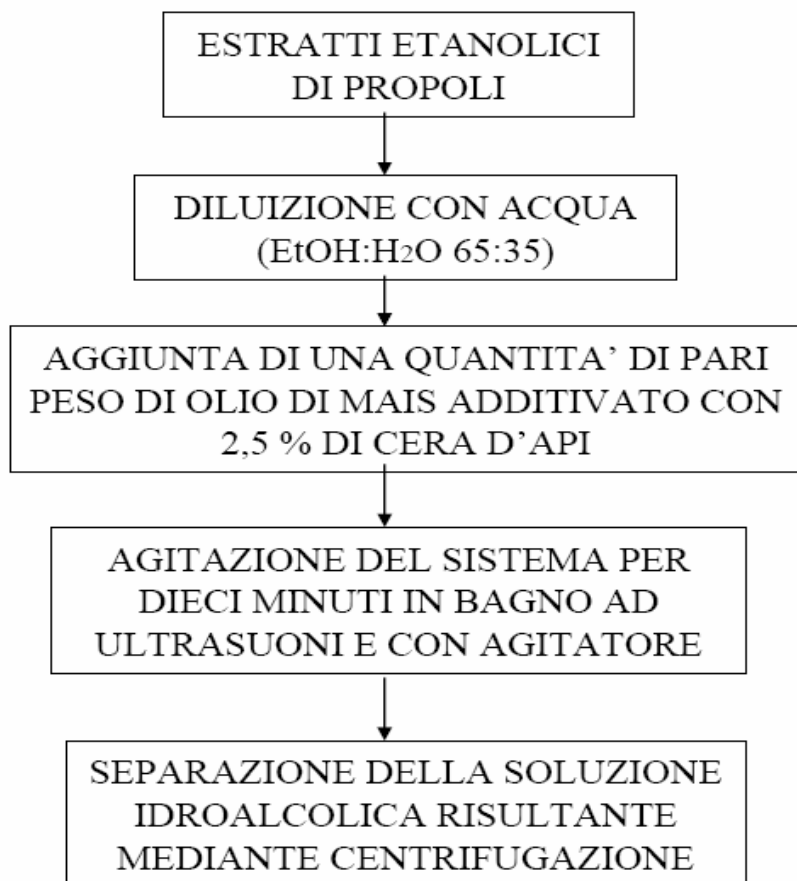


Figura M17. Schema di trattamento con olio di soluzioni idroetanoliche di propoli



Figura M18. Agitatore

Prove preliminari di trattamento sono state condotte su soluzioni idroalcoliche di BSAL e BCINN standard, variando il rapporto EtOH/H₂O. Alla fase oleosa si aggiungevano 5 mL di

una miscela idroalcolica, e un volume noto di una soluzione a titolo noto dei due esteri. Si trattava come spiegato al punto precedente, e si portava a volume in un matraccio da 10 mL. Sono state condotte tre prove, con idroalcoliche al 65, 80 e 100 % in volume di etanolo. Le analisi HPLC sono state condotte mediante HPLC eseguite con la metodica **I3** (vedi Tabella **M12**).

Capitolo 3 Risultati

1. Caratterizzazione chimico-fisica dei campioni di propoli

1.1 Determinazione delle percentuali di massa di campioni di propoli secondo le proprietà di solubilità

Gli EEP a 5000 ppm sono stati preparati per trattamento con etanolo in bagno ad ultrasuoni di 120-130 mg di propoli solida a volume a 25 mL (Parte sper., **4.1**). Le soluzioni così preparate erano torbide per la presenza di fiocchi bianchi molto sottili. La filtrazione con filtri in nylon Millex da 0.22 μm forniva soluzioni limpide, ma durante la conservazione continuavano a formarsi altri precipitati sempre formati da fiocchi bianchi. Questi venivano allontanati prima dell'uso sempre per filtrazione con filtri in nylon Millex da 0.22 μm . Questo fenomeno è probabilmente da attribuire all'aumento della temperatura durante il trattamento nel bagno ad ultrasuoni, che aumenta il potere solvente dell'etanolo nei confronti della frazione cerosa. La capacità dell'etanolo di solubilizzare la frazione cerosa della propoli a temperatura elevata è riportata in letteratura [27, 64]. La scelta di usare etanolo assoluto piuttosto che una soluzione EtOH/H₂O, che non avrebbe creato questo tipo di problemi [68], è stata giustificata dal fatto che le soluzioni contenenti acqua sarebbero state più difficili da maneggiare nelle operazioni di portata a secco necessarie per i trattamenti di preparazione analitica.

La percentuale di massa solubile in etanolo nei campioni di propoli è stata misurata per differenza tra la massa di propoli grezza pesata per la preparazione degli EEP e la massa seccata del residuo dell'estrazione con gli ultrasuoni (Parte sper., **4.2**). Il residuo della preparazione degli EEP è stato quindi trattato con esano (Parte sper., **4.2**). La massa di materiale ceroso è stata misurata per differenza tra la massa del residuo della preparazione degli EEP prima e dopo trattamento con esano (Parte sper., **4.2**). Le frazioni di solubilità misurate sono riportate in tabella **R1**, insieme con la percentuale del residuo completamente insolubile.

Questi valori possono essere confrontati con quelli disponibili in letteratura (Stato dell'arte, **2.1**). Le percentuali di massa solubile in etanolo sono compatibili con quelle riportate per trenta campioni di propoli cinese ed uruguayana [5, 39], comprese tra 65 ed 82 %, mentre i

valori da campioni di propoli brasiliana misurati su cinquecento campioni di diversa origine botanica sono tendenzialmente più bassi, compresi tra 40 e 65 % [70].

Campione	Solubile etanolo (m/m)	in Cere in (m/m)	(solubili esano)	Residuo insolubile (m/m)
L1	83,0	6,5		11,4
U1	82,5	4,0		13,5
U2	84,5	8,0		7,5
U3	82,5	9,0		8,3
R	80,0	2,5		17,4
G	73,0	22		5,1
A1	89,0	8,3		2,7
A2	92,0	6,9		1,3
T1	84,5	9,2		6,2
T2	76,0	8,0		15,8
L2	69,0	11,5		19,4
L3	81,5	8,5		10,2
Media	81,5	8,7		9,9
RDS	7,8	55,0		58,5

Tabella R1. Percentuali di massa di campioni di propoli secondo le proprietà di solubilità. In rosso sono evidenziati i valori che si distinguono dalla media per più di una SD

I valori di frazione cerosa sono compatibili con quelli tipici della propoli brasiliana, normalmente comprese tra 2 e 20% [64-65; 68], mentre per la propoli uruguayana e cinese i valori, con poche eccezioni, sono compresi tra 19 e 31 % [5, 39]. L'unico valore disponibile per l'insolubile è 10 %, riportato da Nikolaev [35], che è in linea con i valori qui riportati.

1.2 Spettro UV-VIS degli estratti etanolic

Gli spettri UV-VIS sono stati registrati nell'intervallo 230-400 nm contro etanolo puro, diluendo 100-120 µL degli EEP a 5000 ppm di propoli a 25 mL con etanolo, e sono riportati nella figura **R1**. Tutti gli spettri condividono un profilo simile, con un massimo ed un minimo, e due punti di flesso. I valori caratteristici sono stati raccolti nelle tabelle **R2** ed **R3**.

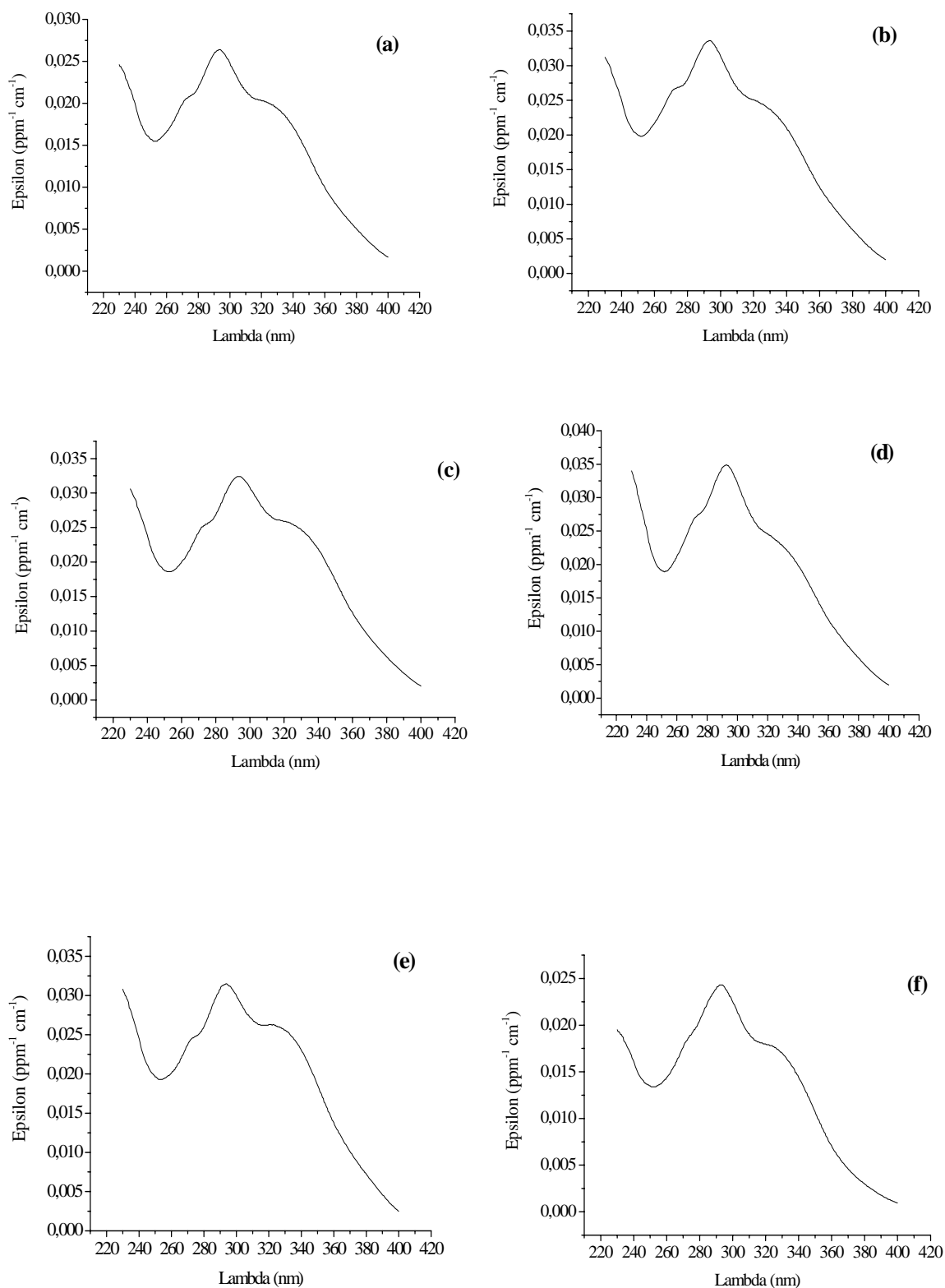


Figura R1. Spettri UV-VIS degli EEP di campioni di propoli raccolti nell'inverno 2006 (vedi tabella **M2**): (a) campione L1; (b) campione U1; (c) campione U2; (d) campione U3; (e) campione R; (f) campione G; 100-120 μL di EEP a 5000 ppm in matraccio da 25 mL (concentrazione finale circa 25 ppm), registrati con lo spettrofotometro Cary 50, riportati come assorbanza per unità di massa di propoli solubilizzata in etanolo (Tabella **R1**) nell'intervallo 230-400 nm, bianco etanolo.

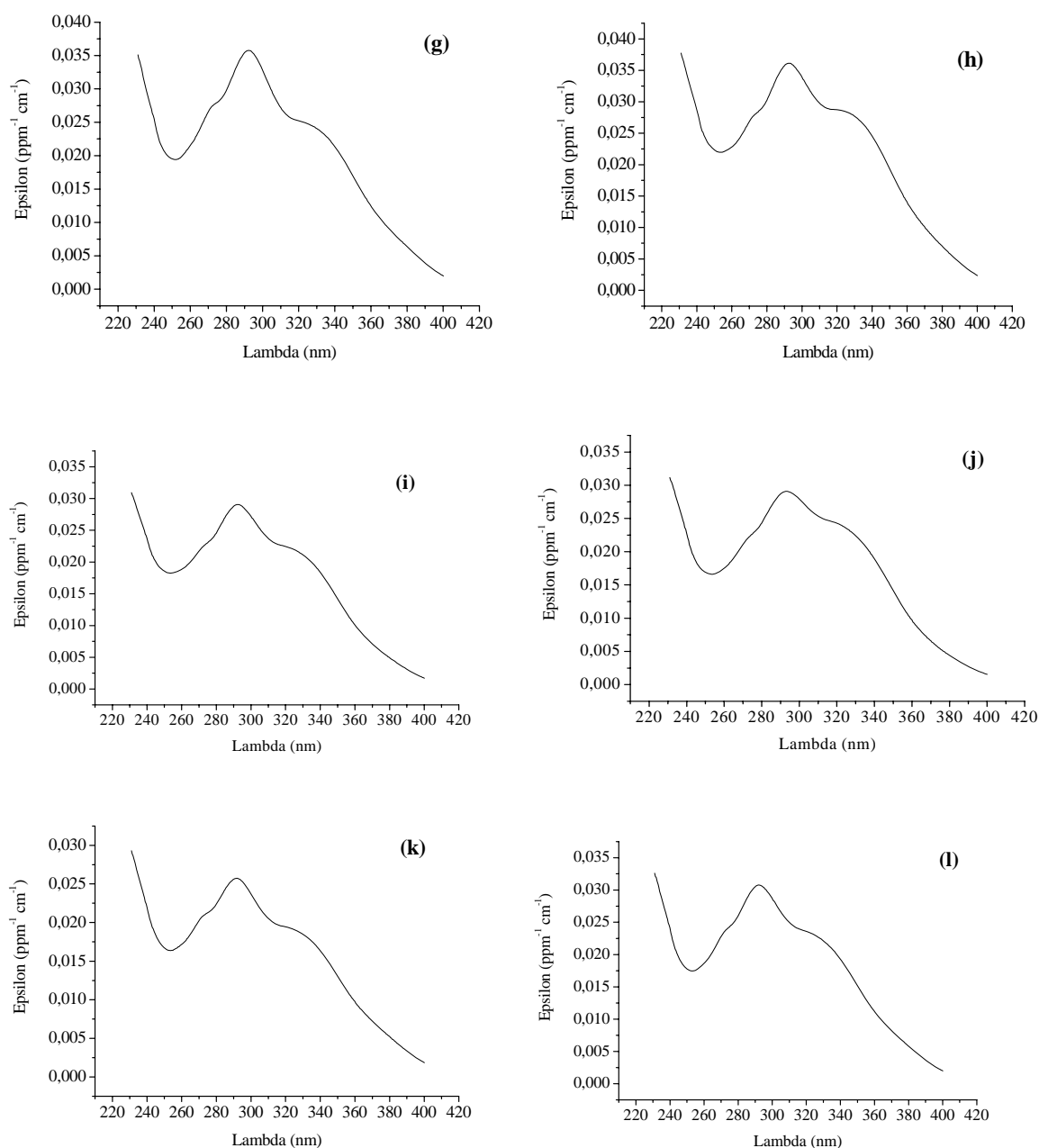


Figura R1. Continua da pag. .84. Spettri UV-VIS degli EEP di campioni di propoli raccolti nell'autunno 2007 (vedi tabella M3): (g) campione A1; (h) campione A2; (i) campione T1; (j) campione T2; (k) campione L2; (l) campione L3; 100-120 μL di EEP a 5000 ppm in matraccio da 25 mL (concentrazione finale circa 25 ppm), registrati con lo spettrofotometro Cary 50, riportati come assorbanza per unità di massa di propoli solubilizzata in etanolo (Tabella R1) nell'intervallo 230-400 nm, bianco etanolo.

Le posizioni dei punti di minimo, di massimo e i flessi dei diversi campioni sono tutti molto vicini tra di loro (tabella R2). Lo spread dei valori dei coefficienti di estinzione è molto maggiore rispetto a quello del loro rapporto (Tabella R3). Questo dato, valutato insieme alla

vicinanza delle posizioni dei massimi e dei minimi, indica una costanza di forma degli spettri, che si può associare ad una notevole similarità di composizione tra i diversi campioni. Poiché la materia prima per la manifattura della frazione solubile in etanolo della propoli è raccolta dalla flora locale (Stato dell'arte, **1**), i campioni di propoli esaminati devono avere una comune origine vegetale, nonostante la differente origine geografica.

Campione	Massimo	Minimo	Flesso 1	Flesso 2
L1	293.0	252.5	319,5	274.5
U1	293,0	252.0	319,5	274.5
U2	293.5	253.0	318.5	274.5
U3	292.5	251.5	319.5	274.5
R	293.5	253.5	319	274.5
G	293.5	252.0	319	275
A1	292.0	252.0	318.5	274.5
A2	292.5	253.5	320	274.5
T1	292.5	253.5	316	274.5
T2	293.0	253.5	316	274.5
L2	291.5	253.5	319	274.5
L3	292.0	253.5	319,5	274.5

Tabella R2. Lunghezze d'onda (nm) del massimo, del minimo e dei due punti di flesso degli spettri UV-VIS della frazione solubile in etanolo di campioni di propoli, tutti i valori ± 1 nm, spettri registrati come da figura **R1**

L'analisi dei dati spettrali (Tabella **R3**) e delle frazioni di massa (Tabella **R1**) non evidenzia differenze significative tra i campioni. Il campione G ha una quantità di ceroso significativamente superiore a quello di tutti gli altri campioni. Questa osservazione può essere correlata con l'osservazione che il campione G ha valori di coefficienti di estinzione significativamente più bassi di quelli delle altre propoli, ma la forma del suo spettro (rapporto Min/Max) è perfettamente in media. La presenza di una elevata percentuale di cera potrebbe indicare la presenza più abbondante anche di specie a basso peso molecolare come acidi grassi, chetoni, esteri alifatici ed alcani a basso peso molecolare, tutti solubili in etanolo. Una presenza in eccesso di tali composti abbassa il valore dei coefficienti di estinzione, ma non può influenzare la forma dello spettro nell'intervallo 400-230 nm.

I valori misurati dei coefficienti di estinzione sono compatibili con quelli di propoli giapponese di pioppo, compresi tra 0,0054 e 0,0288 ppm⁻¹ cm⁻¹ [43]. I profili spettrali da noi registrati hanno un profilo molto simile a quelli della propoli argentina di pioppo [47] e per la propoli brasiliana sempre di pioppo [83]. La forma degli spettri è caratteristica dell'origine

botanica e propoli con diversa origine possono mostrare forme degli spettri anche molto diverse [70]. E' quindi possibile avanzare l'ipotesi che la frazione balsamica di tutte le propoli esaminate sia di pioppo. Questo dato è stato confermato dall'analisi cromatografica (Ris., 2.1.2; 2.2.4).

Campione	Massimo (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	Minimo (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	Rapporto Min/max
L1	0,0258	0,0151	0.585
U1	0,0326	0,0193	0.590
U2	0,0307	0,0175	0.570
U3	0,0323	0,0175	0.540
R	0,0306	0,0187	0.610
G	0,0225	0,0124	0.550
A1	0,0364	0,0203	0.560
A2	0,0351	0,0219	0.625
T1	0,0288	0,0184	0.640
T2	0,0291	0,0169	0.580
L2	0,0250	0,0165	0.660
L3	0,0300	0,0176	0.585
Media	0,0299	0,0177	0,592
RSD	13,6	13,8	6,22

Tabella R3. Valori dei coefficienti di estinzione (in ppm⁻¹ cm⁻¹) sul massimo e sul minimo degli spettri UV-VIS della frazione solubile in etanolo di campioni di propoli (Tabella R2), calcolati rispetto alla massa di propoli solubilizzata in etanolo (Tabella R1) e loro rapporto. In rosso i valori superiori alla media di più di 1,5 valori di SD, in blu quelli inferiori alla media di meno di 1,5 valori di SD. Incertezza sperimentale sui valori dei coefficienti inferiore a 1 %

1.3 Caratterizzazione ponderale e spettrofotometrica delle soluzioni esaniche ottenute dall'estrazione da acquosa acida degli EEP per la preparazione dei campioni analitici

Sono state misurate la quantità di massa estratta e le proprietà spettrali delle soluzioni esaniche ottenute per estrazione degli EEP sospesi in fase acquosa acida da HCl (Parte sper., 6.6.2.2.1).

La quantità di materiale estratto è stato misurato per evaporazione del solvente da 5 mL di estratti esanici e pesata del residuo, ed è riportata come percentuale rispetto alla massa sottoposta all'estrazione (Tabella R4). Gli spettri UV-VIS sono stati registrati in etanolo

contro etanolo puro per diluizione in matraccio da 25 mL di 300-700 μL di estratti esanici nell'intervallo 220-400 nm.

Campione	Massa estratta in esano (%) m/m	Rapporto integrali spettri UV-VIS
A1	82,0	0,179
A2	81,0	0,176
T1	57,0	0,188
T2	56,0	0,252
L2	72,0	0,238
L3	68,0	0,239
Media	69,3	0,212
RSD	16,3	16,1

Tabella R4. Percentuale della massa di propoli estratta con esano, da 15 mL di EEP a 5000 ppm diluiti in soluzione acquosa acida, misurata per pesata del residuo di evaporazione di 15 mL degli estratti esanici e riportata come percentuale rispetto alla massa totale soggetta al processo di estrazione (Parte sper., 6.6.2.2.1), e valore del rapporto tra l'integrale dello spettro dell'estratto esanico e di quello etanologico tra 230 e 400 nm (Ris., 1.2).

Campione	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($\text{ppm}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_{\min} (nm)	ϵ_{\min} ($\text{ppm}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Rapporto Min/Max
A1	292.5	0,00805	253	0,00294	0,365
A2	293	0,00790	257	0,00330	0,418
T1	292.5	0,00960	254	0,00465	0,484
T2	293	0,00890	251	0,00396	0,445
L2	292	0,00755	255,5	0,00342	0,453
L3	292,5	0,00915	254	0,00361	0,395
Media		0,0085		0,0036	0,427
RSD		9,5		16,3	10,1

Tabella R5. Lunghezze d'onda (nm) e intensità di assorbimento dei massimi e dei minimi in $\text{ppm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ degli spettri UV-VIS degli estratti esanici misurati diluendo 300-700 μL di estratti in un matraccio da 25 mL in etanolo, calcolati rispetto alla massa effettivamente estratta (Tabella R4), e i rapporti dell'intensità tra i coefficienti del minimo e del massimo, bianco etanolo. Le posizioni dei massimi e dei minimi ± 1 nm, incertezza sperimentale dei coefficienti inferiori a 1 %

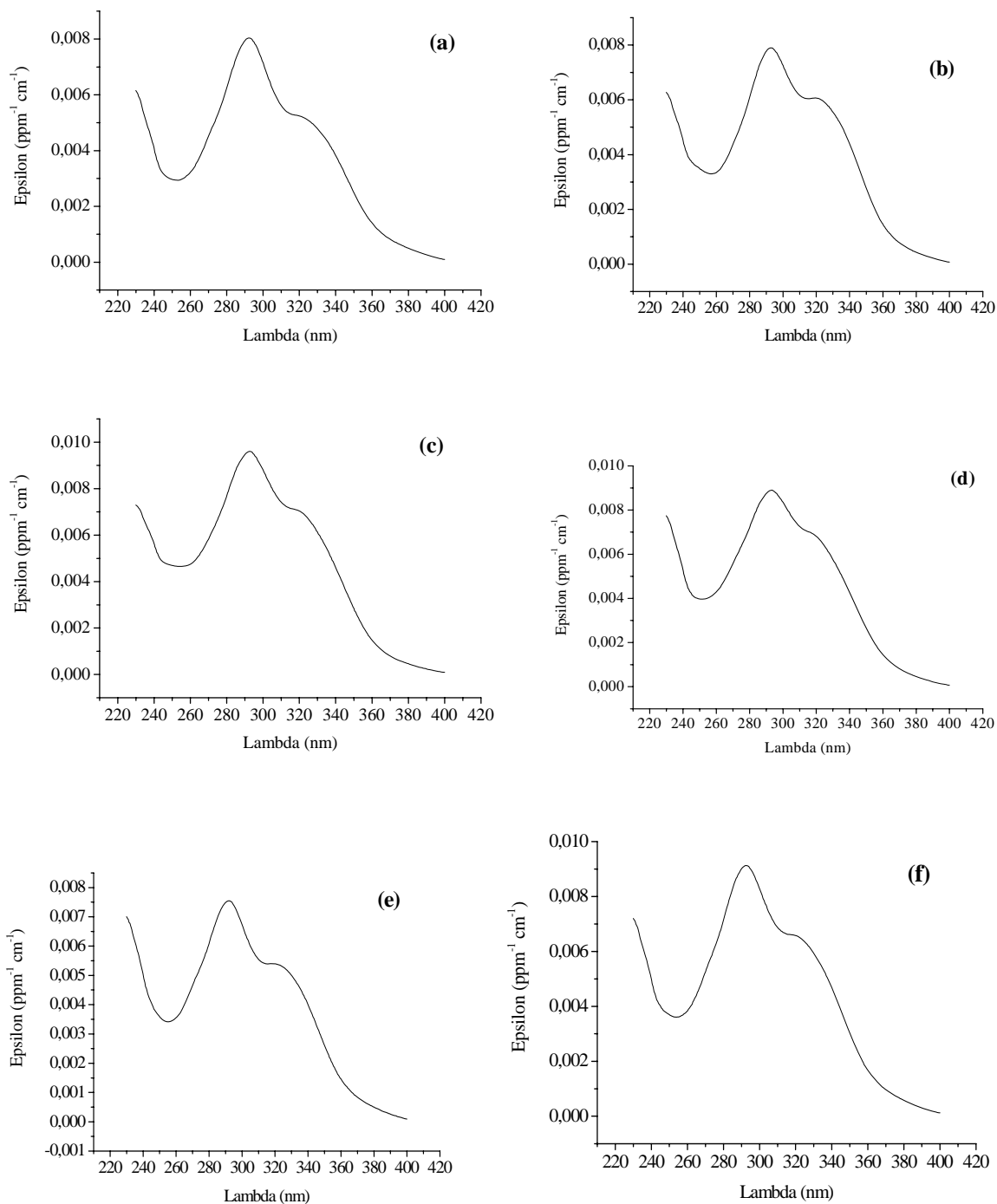


Figura R2. Spettri UV-VIS di soluzioni esaniche ottenute per estrazione da soluzione acquosa acida di EEP, misurati diluendo 300-700 μL di estratti in un matraccio da 25 mL in etanolo, e riportati come unità di assorbanza per unità di massa degli estratti (Tabella R4), bianco etanolo: (a) campione A1; (b) campione A2; (c) campione T1; (d) campione T2; (e) campione L2; (f) campione L3.

Gli spettri sono riportati in figura R2, in $\text{ppm}^{-1} \text{cm}^{-1}$ rispetto alla massa effettivamente estratta; inoltre, gli spettri sono stato normalizzati rispetto al massimo posto uguale ad 1, e lo stesso è stato fatto per gli spettri UV-VIS degli EEP di propoli (Ris. 1.2). Questi profili normalizzati

sono stati riportati nello stesso grafico, per poter mettere in evidenza le differenze di forma (Figura **R3**). I valori caratteristici degli spettri sono riportati in tabella **R5**. Gli spettri sono stati integrati nell'intervallo 230-400 nm, e altrettanto è stato fatto con gli spettri degli EEP di propoli (Ris., **1.2**). E' stato quindi calcolato il rapporto tra i due integrali (tabella **R4**).

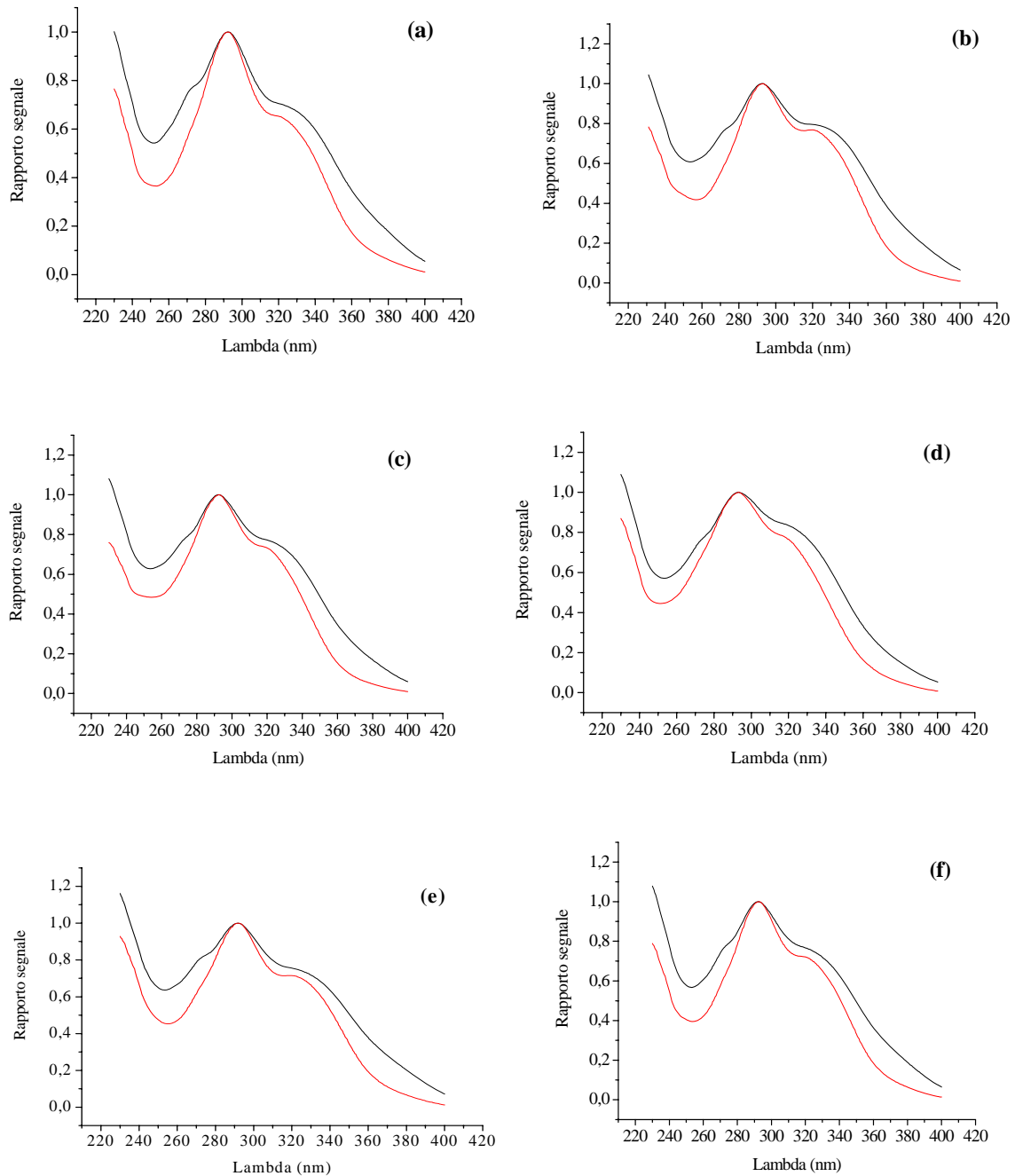


Figura R3. Confronto degli spettri UV-VIS degli EEP (linea nera) e degli estratti esanici (linea rossa), misurati come da figura **R1** ed **R2**, entrambi normalizzati ad uno rispetto al massimo: **(a)** campione A1; **(b)** campione A2; **(c)** campione T1; **(d)** campione T2; **(e)** campione L2; **(f)** campione L3.

Le posizioni dei massimi e dei minimi non cambiano in maniera sensibile (Tabella **R2** ed **R5**), ma emergono alcuni cambiamenti importanti nella forma dei profili: uno dei due punti di flesso presente negli EEP scompare, l'altro è più accentuato (Figura **R3**); gli spettri sono più stretti intorno al massimo.

Si può quindi concludere che l'estrazione è selettiva, perché ad un cambiamento di forma dello spettro corrisponde un mutamento nella composizione della miscela. Questa conclusione è confermata dai valori dei rapporti degli integrali degli spettri UV-VIS, che indicano che le specie che vengono estratte in esano hanno un contenuto minore di composti con un sistema elettronico coniugato (acidi cinnamici e benzoici, fenoli), che sono caratterizzati da forti assorbimenti nell'intorno dei 290 nm. Tali specie, infatti, sono caratterizzati da una bassa estraibilità in esano (dati da attività sperimentale Progetto PON Inagrimed, non pubblicati). L'estrazione con esano delle soluzioni etanoliche di propoli è quindi un buon punto di partenza per la caratterizzazione di quella frazione della propoli di polarità medio-bassa, composta tra gli altri di esteri alifatici ed aromatici, alcoli aromatici ed alifatici, acidi organici, chetoni alifatici, terpeni, terpenoidi e steroidi [8].

2. Caratterizzazione chimica di campioni di propoli

2.1 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'inverno 2006

Per la caratterizzazione del contenuto di acidi cinnamici, acido salicilico e degli esteri CAPE, BCINN, BSAL, FECINN e FESAL negli EEP delle propoli raccolte nell'inverno 2006 è stato usato lo schema analitico riportato nella Figura **M13**. Gli acidi cinnamici e il CAPE sono stati scelti perché caratteristici della propoli di pioppo [29], ed il CAPE è anche uno dei maggiori allergeni. L'identificazione di queste specie nei campioni di propoli esaminati può confermare l'osservazione già avanzata dall'analisi degli spettri UV-VIS, e cioè che la materia prima vegetale usata per la manifattura della frazione balsamica dei campioni di propoli esaminati sia di pioppo. Gli esteri BSAL e BCINN sono anch'essi caratteristici di questo tipo di propoli, ed inoltre sono responsabili di reazioni allergiche. Lo schema indica che si sono dovute seguire tre metodiche analitiche diverse per portare a termine la caratterizzazione. Le specie di interesse erano infatti presenti nei campioni in concentrazioni diverse anche per più ordini di grandezza, e l'acido salicilico e gli esteri non sono determinabili senza un pretrattamento degli EEP.

2.1.1 Determinazione di esteri cinnamici e salicilici

2.1.1.1 Messa a punto del metodo con soluzioni standard

La coiniezione di soluzioni di EEP diluiti di propoli (Parte sper., **6.2.2.1**) con BSAL o BCINN standard e senza nessun pretrattamento faceva registrare due nuovi picchi. In letteratura è documentata la presenza di BSAL [1; 8; 36] e BCINN [22] in campioni di propoli, senza che sia possibile desumere l'ordine di grandezza della concentrazione. La presenza di questi esteri in alcuni campioni di propoli non comportava automaticamente che dovessero essere presenti nei campioni in nostro possesso, a causa della grande variabilità della propoli. Data però la loro importanza nell'ambito di questo lavoro, si è voluto verificare se fossero presenti in quantità tali da non essere rivelabili se non con un adeguato pretrattamento. Il metodo che si è andato ad implementare è riportato nello schema a blocchi riportato in figura **M13**.

Le curve di recupero degli esteri sono state determinate eluendo un'opportuna quantità di esteri standard (circa 50 µg per gli esteri cinnamici, circa 250 µg per gli esteri salicilici) in soluzione esanica con quantità variabili di eluente (3 % etere etilico in esano) da una colonna di gel silice. Le quantità recuperate di estere sono state raccolte in matraccio da 10 mL e determinate spettrofotometricamente a 305 nm per i salicilati e a 271 nm o 277 nm per i cinnamati (Appendice **1**, tabelle **A178** ed **A179**) e riportate in grafico come recupero percentuale del totale trattato (figure **R4**, **R5**, **R6** e **R7**) in funzione del volume di eluente usato. Un bianco era preparato prima di ogni determinazione, eluendo la colonnina, prima di caricarla con l'estere, con il volume massimo di eluente che si prevedeva di usare nella prova, e portando a volume in un matraccio da 10 mL con lo stesso eluente. Questa prova ha permesso di determinare il volume di eluente minimo necessario a recuperare quantitativamente tutte le specie di interesse dalla colonna nelle condizioni sperimentali. Gli esteri salicilici necessitavano di volumi di eluizione di 2-3 mL, gli esteri cinnamici volumi maggiori, nell'intervallo dei 4-6 mL. La differenza di comportamento delle due classi di esteri può dipendere dalla capacità degli esteri salicilici di formare un legame intramolecolare [93] tra la funzionalità fenolica e l'ossigeno carbonilico. Questo legame intramolecolare impedisce ai salicilati di interagire con la silice. La quantità di eluente sufficiente per recuperare quantitativamente tutti gli esteri è stata quindi fissata a 7 mL.

Valori di recupero per tutti gli esteri sono stati determinati eseguendo l'intero processo di preparazione del campione descritto in figura **M13**, trattando 3 mL di una soluzione etanolica dei quattro standard, BCINN, BSAL, FESAL e FECINN (rispettive concentrazioni dei quattro esteri: 0,72; 0,51; 0,40 e 0,1 ppm). I valori di recupero di ciascun estere come percentuale sono riportati in tabella **R6**. Il valore medio è stato usato come fattore correttivo delle quantità analitiche determinate nei campioni reali. Il bianco è stato realizzato trattando etanolo puro.

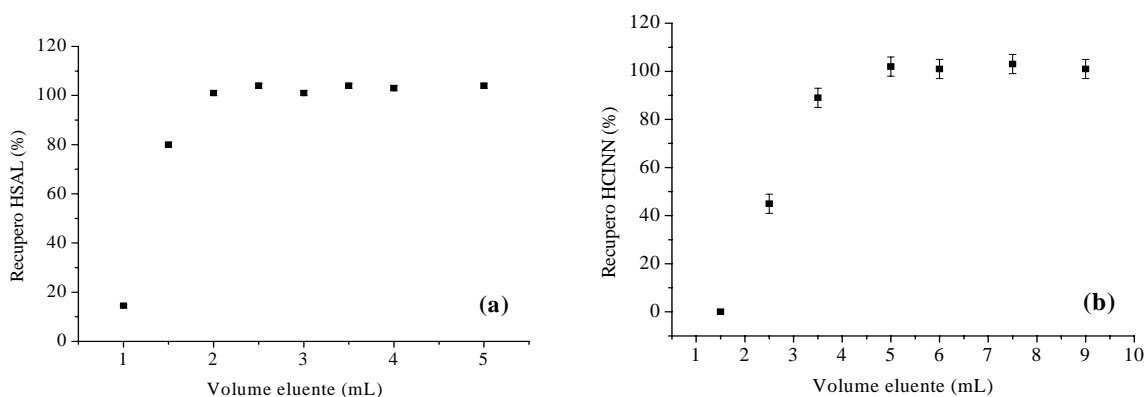


Figura R4. Percentuali di recupero di (a) HSAL e (b) HCINN in soluzione etanica recuperati da colonna SPE in funzione del volume di eluente (Et_2O 3% in esano) usato per trattare la colonna, determinati spettrofotometricamente, quantità eluita circa 250 μg di HSAL e 50 μg di HCINN. Il bianco eluito dalla colonnina senza caricare l'estere

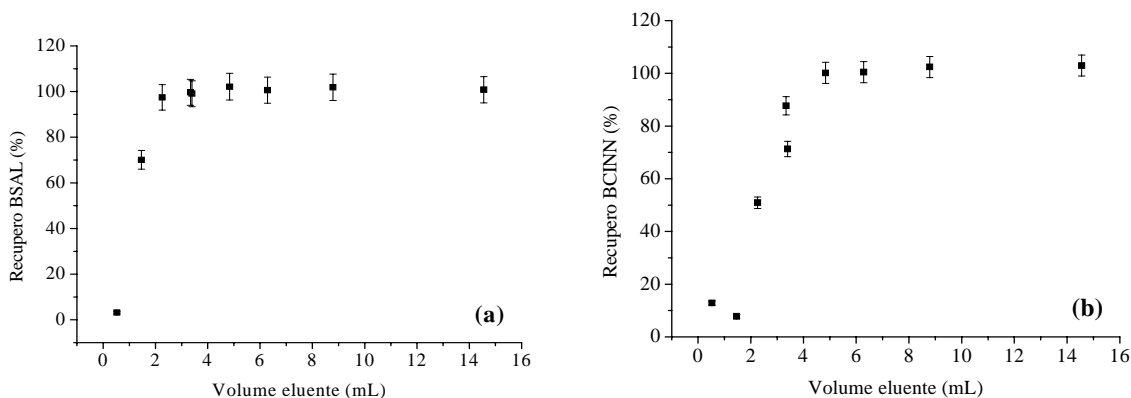


Figura R5. Percentuali di recupero di (a) BSAL e (b) BCINN in soluzione etanica recuperati da colonna SPE in funzione del volume di eluente (Et_2O 3% in esano) usato per trattare la colonna, determinati spettrofotometricamente, quantità eluita circa 250 μg di BSAL e 50 μg di BCINN. Il bianco eluito dalla colonnina senza caricare l'estere

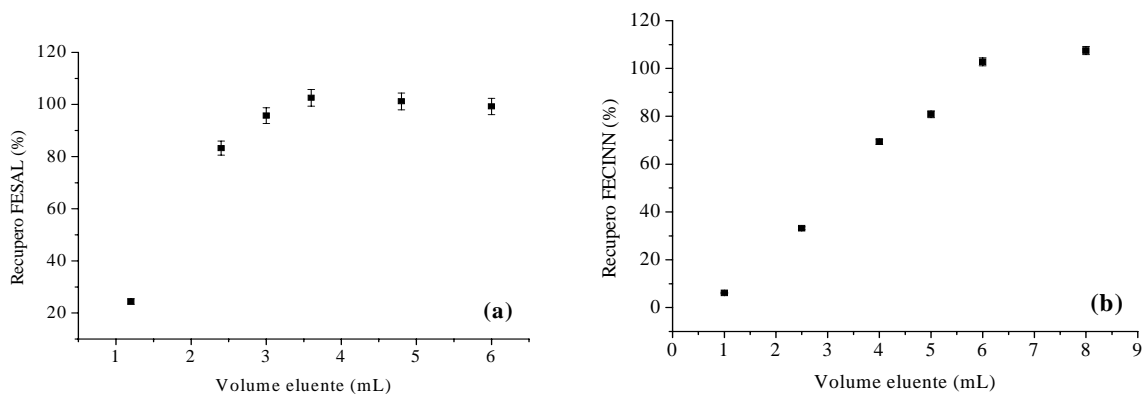


Figura R6. Percentuali di recupero di (a) FESAL e (b) FECINN in soluzione esanica recuperati da colonna SPE in funzione del volume di eluente (Et_2O 3 % in esano) usato per trattare la colonna, determinati spettrofotometricamente, quantità eluita circa 250 μg di FESAL e 50 μg di FECINN. Il bianco eluito dalla colonnina senza caricare l'estere

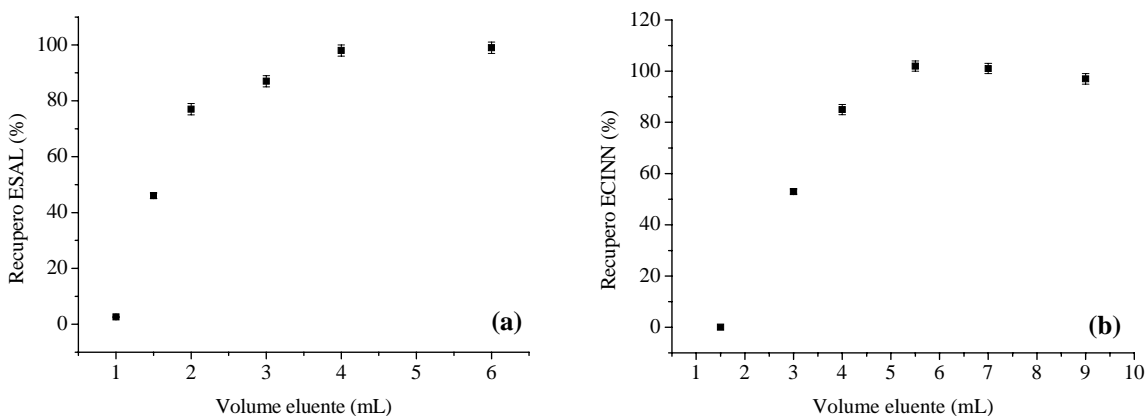


Figura R7. Percentuali di recupero di (a) ESAL e (b) ECINN in soluzione esanica recuperati da colonna SPE in funzione del volume di eluente (Et_2O 3 % in esano) usato per trattare la colonna, determinati spettrofotometricamente, quantità eluita circa 250 μg di ESAL e 50 μg di ECINN. Il bianco eluito dalla colonnina senza caricare l'estere

La quantità di solvente usato per eluire la colonnina era più che sufficiente a recuperare quantitativamente gli esteri, come emerge dalle curve di recupero degli standard. Le perdite e la mancanza di riproducibilità sono perciò attribuibili alle operazioni di concentrazione e portata a secco. Gli esteri in questione hanno una tensione di vapore non trascurabile, e potrebbero quindi parzialmente evaporare una volta che sia stato eliminato completamente il solvente.

Recuperi BSAL (%)	Recuperi (%)	BCINN	Recuperi (%)	FESAL	Recuperi (%)	FECINN
93,5	101,3		89,1		87,1	
89,1	100,7		88,3		83,0	
53,8	89,4		63,8		82,6	
80,3	92,0		75,9		74,7	
75,1	95,0		73,4		73,9	
75,9	80,9		74,7		87,0	
80,2	85,5		81,6		90,1	
75,1	81,9		79,6		82,0	
87,2	91,5		71,5		75,8	
60,3	66,7		63,5		69,5	
74,8	77,0		73,1		75,3	
69,7	71,9		71,3		66,5	
77,6	81,8		79,3		82,4	
63,7	75,1		67,9		71,7	
75,5	85,0		75,2		78,7	
15	12		10		9	

Tabella R6. Recuperi percentuali di standard di esteri benzilici determinati trattando 3 mL di una soluzione etanolica di BSAL, BCINN, FESAL e FECINN (concentrazioni dei quattro esteri: 0,72; 0,51; 0,40 e 0,1 ppm) secondo lo schema riportato in figura M13. L'analisi finale è stata fatta con lo HPLC gradiente G1 (vedi punto), analisi quantitativa con rette di taratura (Parte sper., 6.2.1.3), in grassetto media e RSD. Bianco, etanolo puro

2.1.1.2 Analisi quantitativa degli esteri BSAL, BCINN, FESAL, FECINN in campioni di propoli raccolti nell'inverno 2006

Sono stati trattati 3 mL degli EEP a circa 5000 ppm di ciascuna delle propoli L1, U1, U2, U3, R e G, secondo lo schema analitico riportato in figura M13. Un bianco è stato realizzato trattando lo stesso volume di etanolo assoluto. L'analisi dei profili HPLC delle soluzioni trattate mostra che la preparazione analitica modificava radicalmente il profilo cromatografico, rispetto a quello delle propoli tal quali (vedi figura R8). Sono molto attenuati tutti i segnali al di sotto di un certo valore di tempo di ritenzione nel gradiente usato. La coiniezione delle soluzioni trattate con standard dei quattro esteri BSAL, BCINN, FESAL e FECINN ha messo in evidenza la presenza di tutte e quattro le specie ricercate.

L'analisi quantitativa degli esteri è stata fatta con rette di taratura (Parte sper., 6.2.1.3), e correggendo i valori analitici per i valori di recupero del processo di preparazione del

campione (Tabella **R6**). I valori di concentrazione in $\mu\text{g/g}$ degli esteri nei campioni di propoli solida sono riportati in tabella **R7**.

La concentrazione degli esteri è più di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella degli acidi cinnamici e il CAPE (vedi tabelle **R7-R8**), e questo è forse il motivo per cui non sono disponibili in letteratura dati quantitativi per queste specie con cui poter fare dei confronti. E' possibile valutare che, partendo da propoli con le concentrazioni più alte dei quattro esteri (quelle del campione U3), se analizzate con il metodo di semplice diluizione usato per la determinazione degli acidi cinnamici (Parte sper., **6.2.1.1**), si avrebbero concentrazioni comprese tra il LOD e il LOQ per il BSAL e per il FECINN, inferiori al LOD per il FESAL e 1,5 volte sopra il LOQ per il BCINN (Parte sper., **6.2.1.3**). Sono tutte concentrazioni al limite, e un influenza anche piccola della presenza della matrice può spiegare il fatto che nei campioni reali questi picchi non siano determinabili. Questi risultati quindi confermano la necessità di pretrattare il campione per poter determinare questi campioni in HPLC.

Campione	L1	U1	U2	U3	R	G
Estere	C ($\mu\text{g/g}$)	C ($\mu\text{g/g}$)	C ($\mu\text{g/g}$)	C ($\mu\text{g/g}$)	C ($\mu\text{g/g}$)	C ($\mu\text{g/g}$)
BSAL	150	200	200	250	200	50
BCINN	80	110	180	150	110	130
FESAL	90	110	140	160	140	90
FECINN	10	15	10	40	17	25

*Tabella R7. Contenuto di esteri benzilici e feniletlici in campioni di propoli determinati per HPLC dopo il trattamento di 3 mL di ciascun EEP secondo lo schema descritto in figura **M13**, errore sperimentale su ciascun valore $\pm 15\%$*

La purificazione SPE applicata ai campioni di propoli si è dimostrata molto efficace nel clean-up degli EEP, modificando il profilo HPLC in modo che fosse possibile la rivelazione delle specie di interesse, cioè esteri di polarità medio bassa. Mentre gli esteri ricercati erano principalmente BSAL e BCINN, due esteri responsabili di reazioni allergiche, il metodo ha permesso di mettere in evidenza anche altri due esteri, FESAL e FECINN, la cui presenza in campioni di propoli non è mai stata riportata prima. Questo risultato permette di dire che il metodo messo a punto potrà essere utilizzato in futuro per la caratterizzazione HPLC delle componenti meno polari della frazione balsamica dei campioni di propoli, soprattutto per quelle specie che sono presenti in concentrazione tale da non poter essere determinati in soluzioni ottenute per diluizione diretta degli EEP.

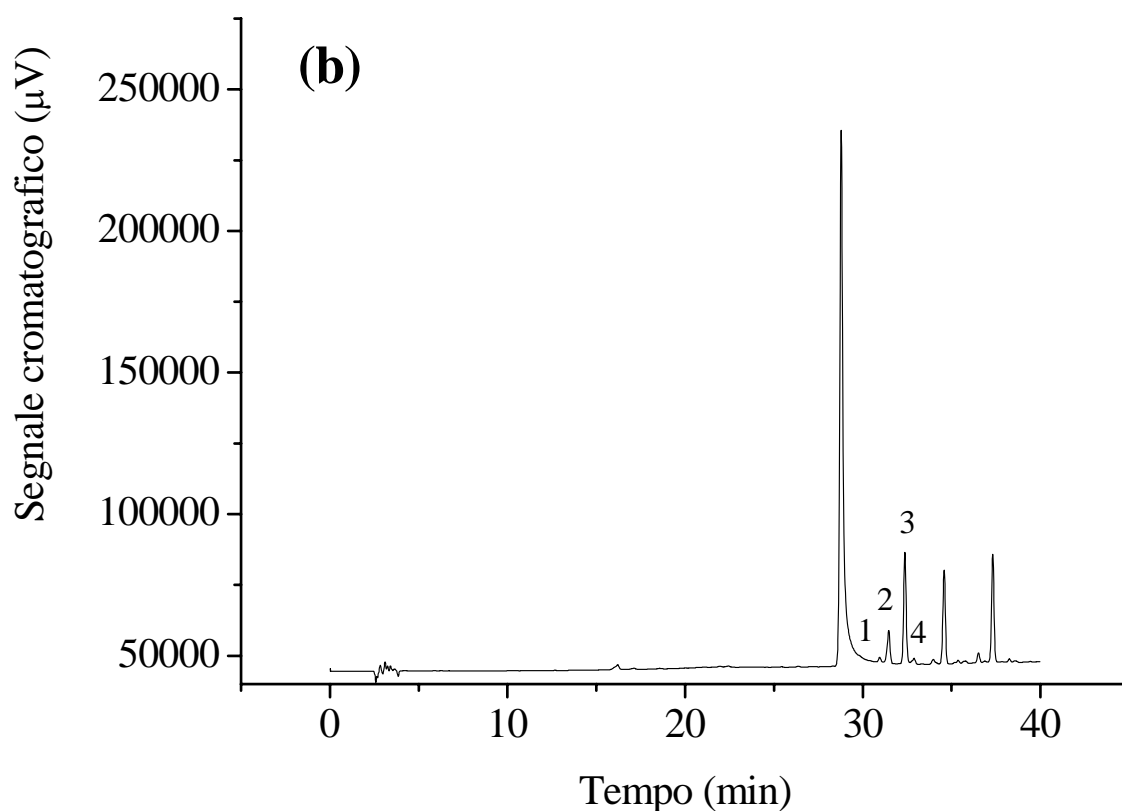
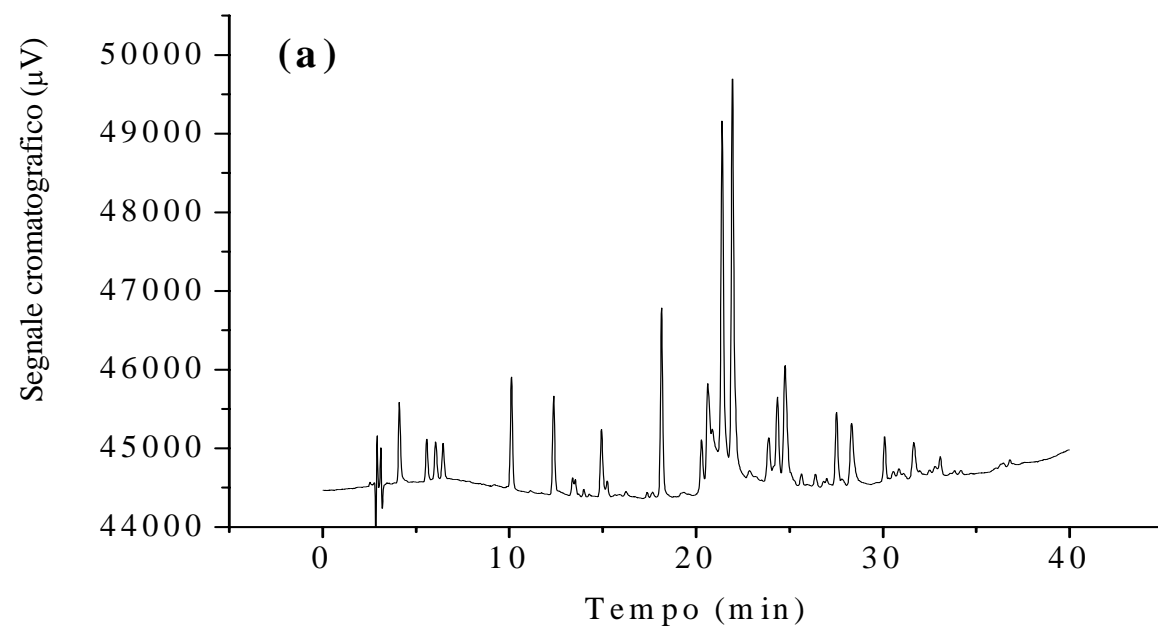


Figura R8. Cromatogrammi del (a) campione di propoli L1 tal quale diluita a 100 ppm (200 μ L in 10 mL di H_2O/ACN 3/1) determinato con il gradiente G1 (Parte sper. 6.2.1), $\lambda_{riv} = 293$ nm e (b) 3 mL della stessa soluzione dopo il trattamento descritto in figura M13, 1 BSAL, 2 BCINN, 3 FESAL, 4 FECINN

2.1.2 Determinazione di acidi cinnamici e CAPE

Il cromatogramma HPLC in figura **R9** ed **R10** è stato registrato iniettando EEP di propoli L1 diluiti in una miscela 75/25 H₂O/ACN (fase acquosa contenente 1 % in acido acetico), in modo che la concentrazione fosse circa 100 ppm (200 µL in matraccio da 10 mL; con loop di 20 µL, circa 2 µg di propoli iniettati), eluendo con il gradiente G1 sul cromatografo A, $\lambda_{riv} = 293$ nm (Figura **M13**, Parte sper., **6.2.1**). Le altre propoli esaminate hanno un profilo simile a quello in figura.

Mediante coiniezione con standard puri, è stato possibile determinare che erano presenti i picchi di acido caffeico, acido p-cumarico, acidi ferulico, acido t-cinnamico, che nel profilo sono ben visibili e risolti alla linea di base, anche se l'acido t-cinnamico non è perfettamente separato da un altro picco non caratterizzato (Figura **R10**). Allo stesso modo, è stato assegnato il picco del CAPE, ma come è possibile vedere dal cromatogramma, questo è molto vicino ad altri picchi molto intensi. Per poterlo integrare correttamente, è stato perciò necessario ricorrere alla deconvoluzione.

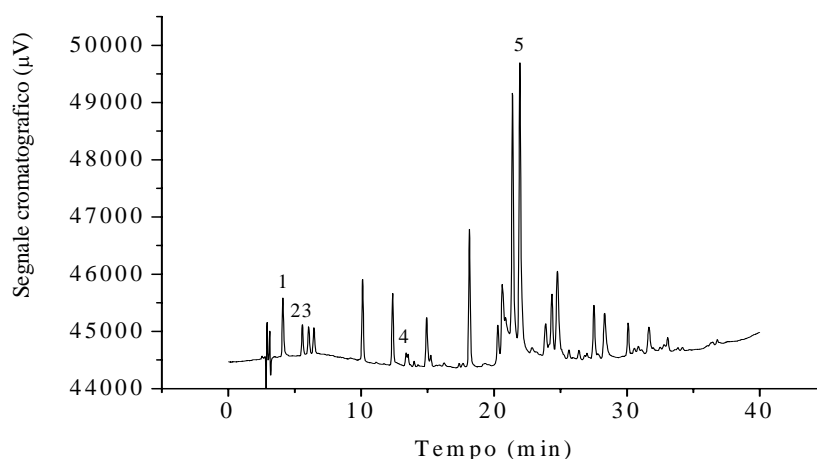


Figura R9. Cromatogramma HPLC della propoli L1 diluita (2 µg iniettati) su colonna Supelcosil C18 secondo il metodo a gradiente G1 (Parte sper. **6.2.1**), $\lambda_{riv} = 293$ nm 1. Acido caffeico ($t_{rit} = 4,11$ min), 2. Acido p-cumarico ($t_{rit} = 5,58$ min), 3. Acido ferulico ($t_{rit} = 6,05$ min), 4. Acido t-cinnamico ($t_{rit} = 13,98$ min) 5. CAPE ($t_{rit} = 21,94$ min). Picchi identificati per coiniezione con standard puri

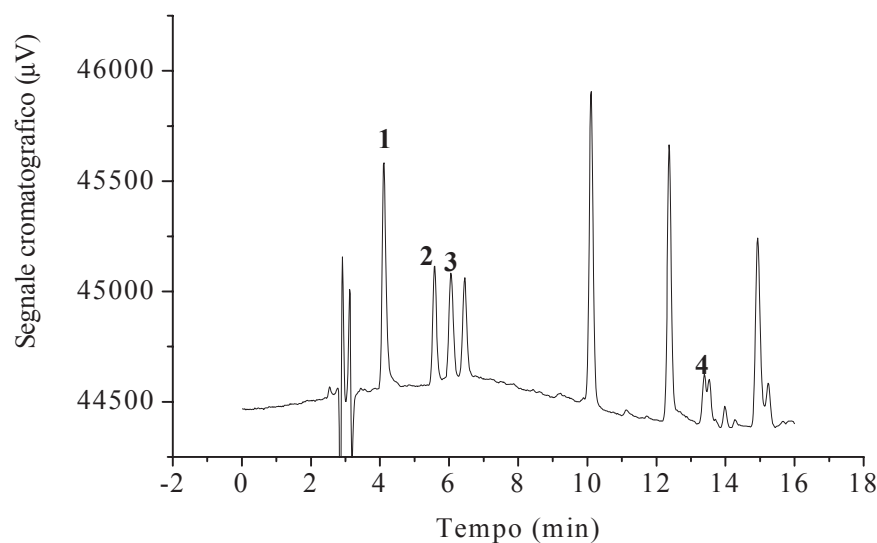


Figura R10. Particolare del cromatogramma della propoli L1 (Figura R9) su colonna Supelcosil C18 secondo il metodo G1 (Parte sper. 6.2.1), $\lambda_{riv} = 293 \text{ nm}$ 1. Acido caffeico, 2. Acido p-cumarico, 3. Acido ferulico, 4. Acido t-cinnamico.

	Acido caffeico	Acido p-cumarico	Acido ferulico	Acido t- cinnamico	Acido salicilico	CAPE
L1	7900	1470	1750	900	20	8100
U1	6500	1930	2300	1050	40	7100
U2	7900	3500	4200	240	20	7700
U3	10700	2400	2850	600	35	6500
R	7100	2700	3200	315	25	7100
G	5500	1700	2050	1550	160	2120
Media	7600	2300	2700	780	50	6400
SD	1800	750	900	500	55	2100

Tabella R8. Concentrazione in campioni di propoli solida di alcuni acidi cinnamic in $\mu\text{g/g}$ di propoli solida, di acido salicilico e CAPE, determinati mediante HPLC e con rette di calibrazione (Parte sper. 6.2.1.1) $\lambda_{riv} = 320 \text{ nm}$, $\lambda_{riv} = 305 \text{ nm}$ per l'acido salicilico. Incertezza sperimentale, $\pm 5 \%$ per acidi cinnamici e CAPE, $\pm 15 \%$ per l'acido salicilico

L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante la tracciatura di rette di taratura con standard puri (Parte sper. 6.2.1.1). I valori di concentrazioni delle specie analizzate sono in tabella R8 come contenuto in $\mu\text{g/g}$ nella propoli solida.

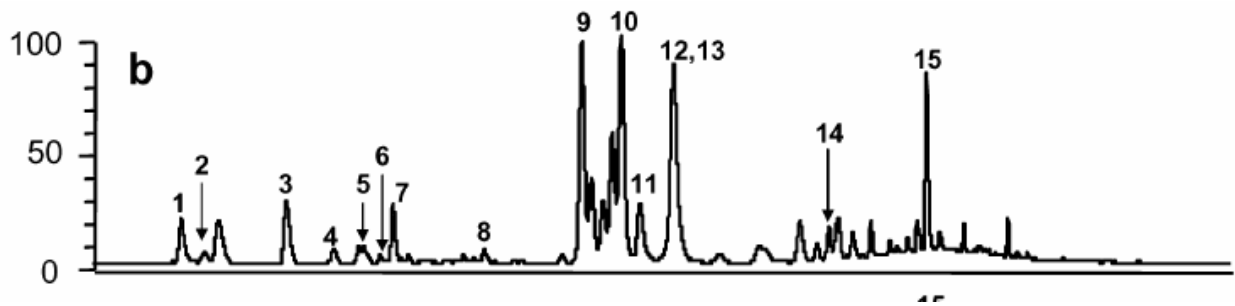


Figure 6. HPLC chromatograms of EEP (a–f) of Korean propolis from various geographic origins: a, Chilgok; b, Cheongju; c, Geochang; d, Muju; e, Pocheon; f, Sangju. The numbers in panels a–f represent the same compounds: 1, caffeic acid; 2, *p*-coumaric acid; 3, 3,4-dimethoxycinnamic acid; 4, pinobanksin 5-methyl ether; 5, apigenin; 6, kaempferol; 7, pinobanksin; 8, cinnamylideneacetic acid; 9, chrysin; 10, pinocembrin; 11, galangin; 12, pinobanksin 3-acetate; 13, phenethyl caffeate; 14, cinnamyl caffeate; 15, tectochrysin.

Figura R11. Cromatogramma HPLC di propoli di pioppo coreana, originaria della regione del Cheongju. Gli estratti sono stati eluiti su di una colonna SI C18, con un gradiente acqua-acetonitrile contenente 0,1 % di acido formico. Il cromatogramma è stato registrato con un PDA tra 190 e 600 nm. Quello mostrato è stato registrato a 260 nm. Riprodotto da [44], pag. 7290

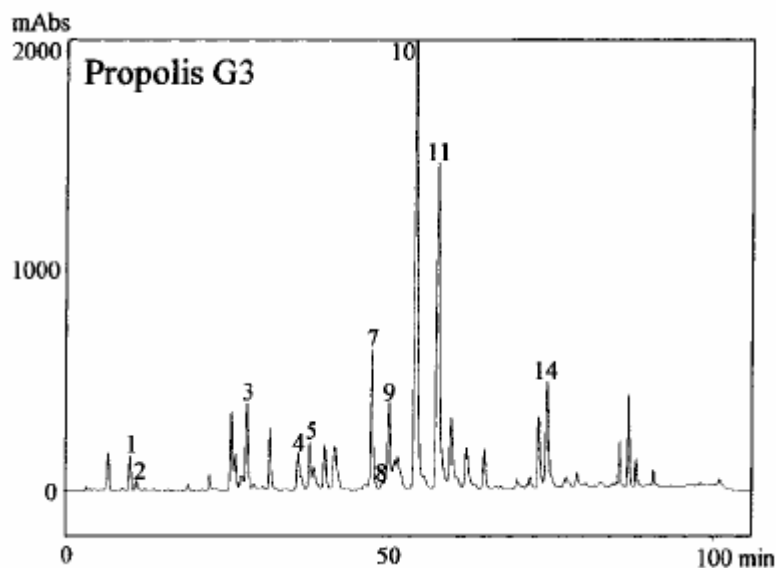


Figure 2. HPLC chromatograms of the ethanolic extracts of propolis and plant resins. 1, Coumaric acid; 2, ferulic acid; 3, pinobanksin; 4, kaempferol; 5, apigenin; 6, isosakuranetin; 7, pinocembrin; 8, dimethylallyl caffeic acid; 9, pinobanksin 3-acetate; 10, chrysin; 11, galangin; 12, kaempferide; 13, UV λ 268 nm; Rt = 66.15 min; 14, tectochrysin; 15, UV λ 231 nm; Rt = 80.25 min; 16, UV λ 223, 276 nm; Rt = 87.67 min; 17, UV λ 246 nm; Rt = 91.73 min; 18, UV λ 241, 274 nm; Rt = 97.26 min; 19, UV λ 247 nm; Rt = 99.58 min.

Figura R12: Cromatogramma HPLC di propoli di pioppo originaria del Brasile Meridionale. Gli estratti sono stati eluiti su di una colonna YMC-Pack ODS-A, con un gradiente acqua-metanolo. Il cromatogramma è stato registrato con un PDA a 268 nm. Riprodotto da Park [80], pag. 2504

La presenza di queste specie è una prima conferma che i campioni di propoli sono di pioppo. E' possibile confrontare qualitativamente i cromatogrammi con quelli riportati in letteratura. In figura R11 è riportato un cromatogramma di propoli di pioppo coreana, in figura R12

quello di una propoli di pioppo dal Brasile Meridionale. Il confronto di questi cromatogrammi con quello in figura **R9** mostra notevoli analogie. Nella parte iniziale è possibile trovare alcuni acidi organici in comune (acido ferulico, acido caffeico, acido p-cumarico), caratteristici della propoli di pioppo. E' possibile anche notare una analogia qualitativa con l'andamento delle intensità. Infatti, tutti hanno una parte centrale con i segnali più intensi (in cui c'è il CAPE in quello in figura **R11**, forse coperto in quello in figura **R12**), e una parte finale con molti picchi di intensità medio bassa.

L'analisi qualitativa e il confronto con altri cromatogrammi di propoli di pioppo riportati in letteratura hanno permesso di confermare l'osservazione tratta dall'analisi degli spettri UV-VIS (Ris., **1.2**), e cioè che nei campioni di propoli in esame la materia prima per la manifattura della frazione balsamica sia di pioppo.

I dati dell'analisi quantitativa sono più difficili da correlare con quelli riportati in letteratura. Campioni diversi, anche se provenienti da arnie vicine e che hanno la stessa origine botanica, possono contenere ciascun singolo componente in quantità anche molto diverse [29]. Le concentrazioni di acido caffeico e ferulico in un campione di propoli cinese, determinati per elettroforesi, erano di 674 e 226 µg/g rispettivamente [21]; le concentrazioni delle stesse specie, ma per HPLC, su quindici campioni di propoli uruguayana e cinese, erano di 700 ± 500 e 6400 ± 1900 µg/g (media \pm SD) rispettivamente [39]; le concentrazioni di acido cumarico e ferulico in un campione di propoli brasiliana di pioppo, determinati per HPLC, erano di 4800 e 1300 µg/g rispettivamente [80]. Anche i valori di letteratura sono perciò molto variabili, e quindi difficilmente utilizzabili per un confronto.

2.1.3 Determinazione di acido salicilico

L'aggiunta di acido salicilico standard alle soluzioni di propoli analizzate come descritto con il gradiente G1 faceva registrare un nuovo picco con $t_{rit} = 9,83$ min. Questa osservazione indicava che alla concentrazione usata per l'analisi HPLC non era possibile determinare questa specie. Poiché questo acido è presente almeno in alcuni campioni di propoli [8], si è reso necessario mettere a punto una nuova metodica per verificare la sua presenza.

Il principio di questo metodo è basato su una doppia azione, ed è sintetizzato nello schema a blocchi in figura **M13**. Il trattamento con cloroformio della fase acquosa a pH 5.5 serve a

semplificare il profilo, lasciando in soluzione l'acido salicilico. In queste condizioni, l'acido salicilico ($pK_{a1} = 3,01$) non può essere estratto in fase organica, sia perché è completamente ionizzato, sia perché è molto poco solubile in cloroformio (Dati da attività sperimentale Progetto PON Inagrimed, non pubblicato). L'estrazione con acetato di etile dalla fase acquosa acidificata a $pH = 1$ garantisce invece la massima estraibilità dell'acido salicilico. In queste condizioni l'acido è completamente protonato, ed è molto solubile nella fase organica scelta (Dati da attività sperimentale Progetto PON Inagrimed, non pubblicato). L'acetato di etile è quindi allontanato, ed il campione ricostituito in 240 μL di una miscela 75/25 H_2O/ACN (fase acquosa contenente 1 % in acido acetico) concentrando di un fattore 12,5 rispetto alla soluzione originale. L'analisi è stata eseguita mediante HPLC usando la metodica G1 e rivelando a 305 nm (Parte sper., **6.2.1**).

Tutti i campioni raccolti nell'inverno 2006 sono stati trattati (vedi punto), ed inoltre è stato preparato un bianco con 3 mL di etanolo. Un cromatogramma campione è riportato in figura **R13**, ed il particolare del picco è riportato in figura **R14**. La coiniezione con acido salicilico standard ha permesso di confermare la presenza dell'acido. Il picco ha una bassa intensità, ed è parzialmente sovrapposti perciò, per poterlo integrare, è stato necessario ricorrere alla deconvoluzione. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante rette di calibrazione, e correggendo per il recupero del processo di preparazione analitica (Parte sper. **6.2.1.2**).

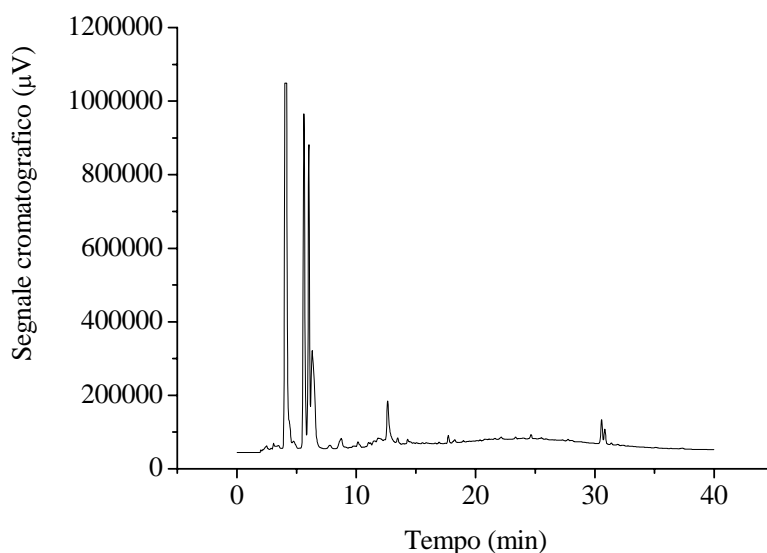


Figura R13. Cromatogramma di campioni di propoli U1 dopo il trattamento per la determinazione dell'acido salicilico, analizzata su colonna Supelcosil C18 secondo il metodo a gradiente G1 (Parte sper., **6.2.1**), $\lambda_{riv} = 305$ nm. Da confrontare con quello riportato in Figura **R9**

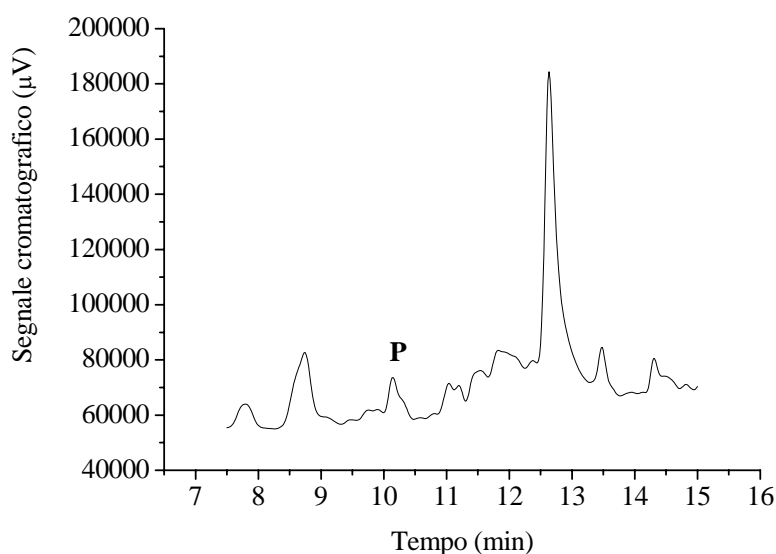


Figura R14. Particolare 7,5-15 minuti del cromatogramma riportato in figura **R13**. Il picco dell'acido salicilico è quello marcato con la lettera **P**, ed è stato messo in evidenza per coiniezione con acido salicilico puro.

Le quantità di acido salicilico sono molto più basse di quelle delle altre specie esaminate. Non è possibile fare comparazioni quantitative con dati di letteratura, perché l'acido salicilico non è parte dei protocolli di caratterizzazione che sono stati esaminati, forse proprio per la bassa concentrazione. Nei profili di composizione completi ottenuti mediante analisi GC-MS [29-30] su campioni di propoli derivatizzati, non è riportata la presenza di questo acido, anche se in uno dei due lavori [30] ci sono molti picchi non identificati attribuiti però ad acidi organici. E' possibile che l'acido salicilico provenga da reazioni di ossidazione dei flavonoidi, di cui l'acido salicilico è uno dei possibili prodotti [19], oppure da reazione di idrolisi degli esteri salicilici che potrebbero avvenire nell'ambiente acido che si ha nelle soluzioni di propoli

2.2 Caratterizzazione cromatografica degli EEP delle propoli raccolte nell'autunno 2007

La caratterizzazione chimica dei campioni di propoli raccolti nell'autunno 2007 (Parte sper., 4) è stato condotto con uno schema (figura **M15**) ottenuto introducendo alcune modifiche a quello già usato per la caratterizzazione delle propoli raccolte in inverno 2006 (Figura **M13**). Le differenze tra i due metodi possono essere così riassunti:

- per le analisi HPLC in gradiente, la colonna Supelcosil LC18 (250 x4,6, particelle da 5 μm) è stata sostituita con una colonna “narrow bore” Pursuit XRs C18 (150 x2,0, particelle da 3 μm) (Parte sper., **1.4**);
- è stato introdotto l’uso di due esteri, esil cinnamato ed esil salicilato, come standard interni per la determinazione quantitativa di BSAL e BCINN. Un controllo preliminare ha mostrato che non erano presenti nei campioni da esaminare;
- è stato introdotto uno step preliminare di estrazione con esano degli EEP da soluzione acquosa acida. Le soluzioni esaniche sono state analizzate mediante GC-MS. I risultati ottenuti con questa metodica sono stati usati come riferimento per quelli ottenuti mediante la purificazione SPE e successiva analisi HPLC;
- l’acquisizione di standard di molti flavonoidi ha permesso di tracciare un profilo di composizione più completo.

2.2.1 Messa a punto del metodo analitico GC-MS per BSAL e BCINN

La preparazione del campione per l’analisi GC-MS è stata messa a punto utilizzando il metodo delle aggiunte con gli EEP della propoli A1. Quattro porzioni da 15 mL di EEP di propoli **A1** a 5000 ppm sono stati sospesi in 90 mL di HCl 17 mM insieme con quantità diverse e crescenti di una soluzione etanolica standard di quattro esteri: BSAL, BCINN, HSAL e HCINN (dettaglio delle aggiunte in tabella **R9**). Un bianco è stato preparato estraendo 15 mL di etanolo puro.

	Aggiunta 1	Aggiunta 2	Aggiunta 3	Aggiunta 4
BCINN	3,93	7,70	11,6	15,4
BSAL	1,35	2,65	4,01	5,30
HCINN	4,56	8,92	13,5	17,8
HSAL	4,16	8,14	12,3	16,3

***Tabella R9.** Aggiunte di esteri standard in μg nella messa a punto dell’ estrazione con esano degli EEP di propoli A1 (15 mL di soluzione a 5000 ppm da HCl 17 mM), esteri in soluzione etanolica: 11,8 ppm in BSAL, 34,2 ppm in BCINN, 36,2 ppm in HSAL e 39,7 ppm in HCINN*

Le soluzioni sono state estratte con esano, concentrate al rotavapor e portate a volume con esano in matraccio da 25 mL. 5 mL di ciascuna soluzione sono state concentrate in presenza di 500 μL di n-ottano. Le soluzioni ottaniche sono state trasferite in vials con tappo di silicone

e pesate per determinarne il volume esatto, quindi sono state analizzate mediante GC-MS con rivelazione SIM (Appendice 2, figura R15). L'analisi quantitativa dei quattro esteri è stata eseguita mediante confronto con rette di calibrazione tracciate con soluzioni standard (Parte sper., 6.6.2.2.2).

In figura R16 sono riportate le correlazioni tra le quantità misurate e le quantità aggiunte di esteri esilici. L'interpolazione con i minimi quadrati è stata condotta con il vincolo che le rette passassero per l'origine. Si tratta di un'ipotesi ragionevole, perché questi esteri non sono presenti nella propoli, e quindi il metodo delle aggiunte deve dare un risultato pari a zero. Questa ipotesi è convalidata dalla bontà dei parametri di interpolazione (vedi tabella R10). Le stesse rette sono state tracciate ponendo in correlazione le quantità di esteri benzilici recuperate con quelle aggiunte (figura R17). Anche questi punti sono stati interpolati, ma senza il vincolo che la retta passasse per l'origine.

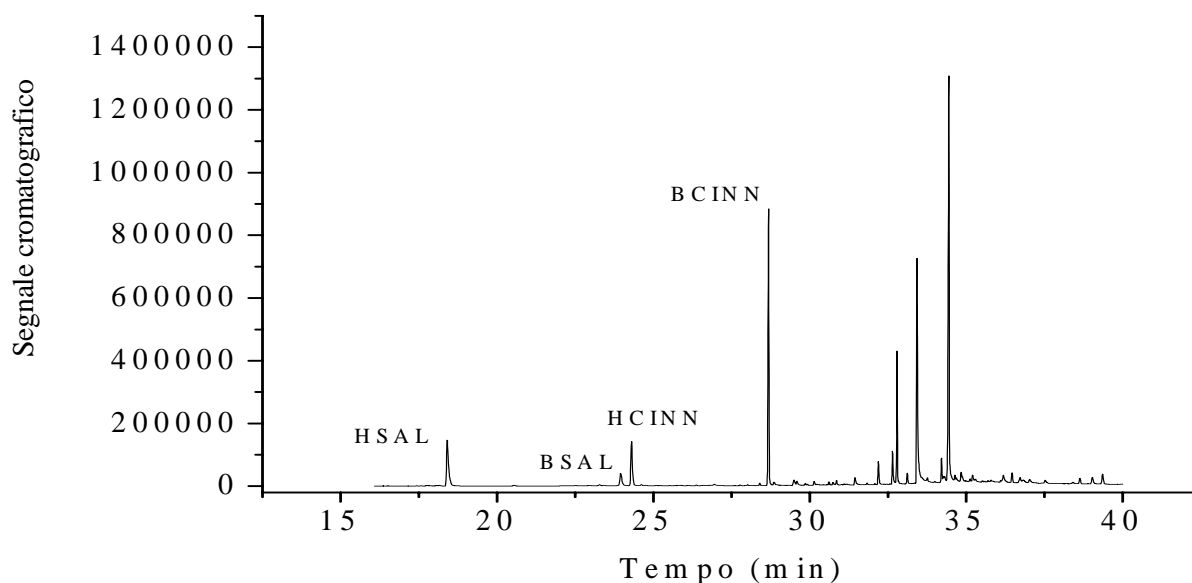


Figura R15. Cromatogramma GC-MS del campione di propoli L3 preparato da 15 mL di soluzione etanolica 5000 ppm dopo aggiunte degli standard interni HSAL e HCINN, come da schema riportato in figura M15 ed analizzato con GC-MS (Parte sper., 6.6.2.2.2)

I parametri di interpolazione delle rette delle aggiunte sono riportati in tabella R10. Da quelli degli esteri benzilici è stato possibile determinare le concentrazioni di BSAL e BCINN nella propoli solida A1, che sono risultate pari a 33 ± 1 e 127 ± 3 $\mu\text{g/g}$ rispettivamente. I valori sono stati anche usati per stimare i recuperi degli esteri benzilici, altrimenti incogniti. E' possibile notare come i recuperi di ciascun estere benzilico siano correlati con quelli del corrispondente estere esilico (vedi figura R18).

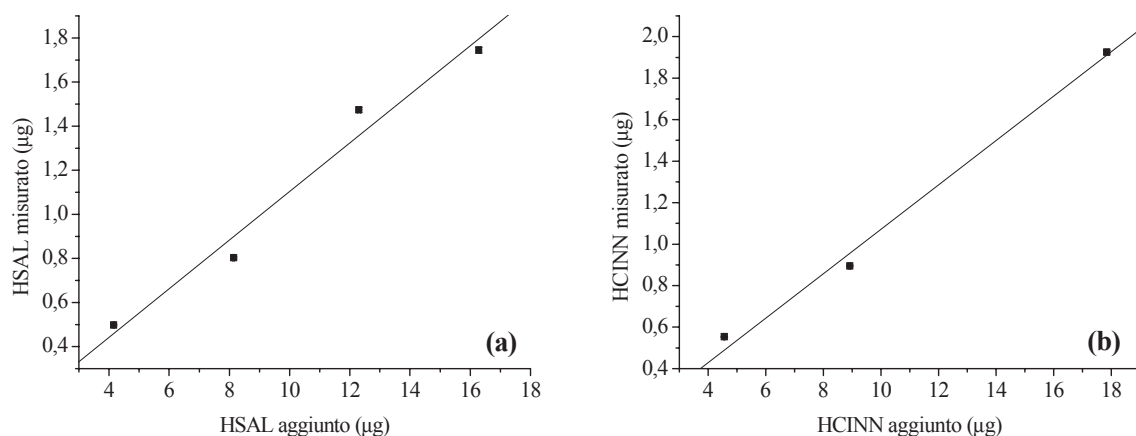


Figura R16. Grafico dei recuperi di **(a)** HSAL e **(b)** HCINN dopo estrazione con esano da soluzione acquosa acida della propoli A1 e analisi GC-MS (vedi Figura R19) in funzione delle quantità di esteri esilici aggiunti (vedi tabella R9). L'interpolazione è stata condotta con il vincolo che le rette passassero per l'origine

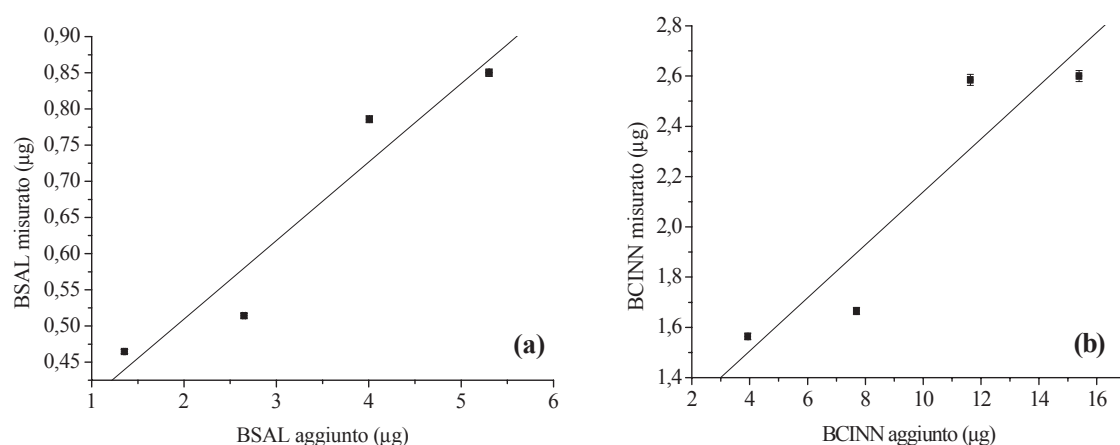


Figura R17. Grafico dei recuperi di **(a)** BSAL e **(b)** BCINN dopo estrazione con esano da soluzione acquosa acida della propoli A1 e analisi GC-MS (vedi Figura M15) in funzione delle quantità di esteri benzilici aggiunti (vedi tabella R9)

	Pendenza	Interc.	R
BSAL	0,10852	0,29254	0,9600
BCINN	0,10553	1,08401	0,92199
HSAL	0,11031	ND	0,98665
HCINN	0,10712	ND	0,99625

Tabella R10. Parametri delle interpolazioni delle correlazioni tra le quantità di esteri determinate mediante analisi GC-MS e quelle aggiunte (Tabella R9). I valori di intercetta delle rette di correlazione degli esteri esilici non sono state determinate perché le interpolazioni sono state condotte con il vincolo che l'intercetta fosse pari a zero

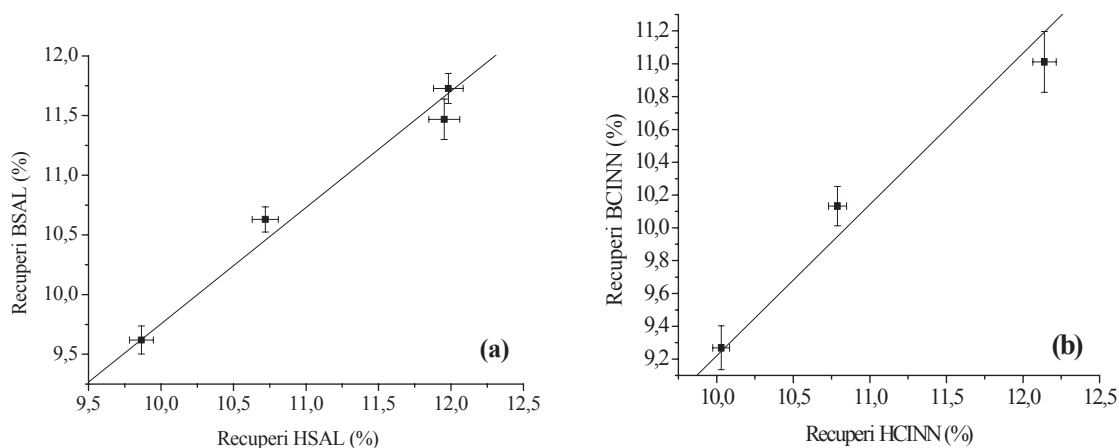


Figura R18. Correlazione tra i recuperi percentuali di (a) BSAL in funzione di HSAL e (b) BCINN in funzione di HCINN nei quattro esperimenti con le aggiunte. Recuperi degli esteri esilici determinati come rapporto tra la quantità determinata per GC-MS e quella aggiunta (vedi tabella R9). Pendenza e R per (a) 0,975 e 0,9894; per (b) 0,922 e 0,9880

I risultati ottenuti in queste prove indicano che la procedura analitica descritta in figura M14 è particolarmente adatta alla determinazione quantitativa di analisi di BSAL e BCINN. La buona correlazione tra le quantità aggiunte e le quantità recuperate infatti permette di concludere che il processo è assai ripetibile. L'ottima correlazione tra i recuperi degli esteri esilici e benzilici permette di usare i primi come standard interni per la determinazione dei secondi, senza dover ricorrere ulteriormente al metodo delle aggiunte. Inoltre, i valori delle interpolazioni dei recuperi riportati in tabella R10 e i valori di pendenza calcolati per le correlazioni recupero benzilico in funzione di esilico (Figura R18) mostrano che gli esteri benzilici ed esilici sono recuperati nella stessa proporzione, e quindi non c'è bisogno di ulteriori fattori correttivi.

2.2.2 Messa a punto dell'analisi mediante HPLC in fase inversa per la determinazione di BSAL e BCINN

Le soluzioni esaniche ottenute per estrazione degli EEP con aggiunta di standard dei quattro esteri BSAL, BCINN, HSAL ed HCINN, ed usate per l'analisi GC-MS (Parte sper., 6.6.2.2.2; Ris, 2.2.1), sono state usate come punto di partenza per verificare se fosse possibile usare la cromatografia liquida per la determinazione quantitativa di BSAL e BCINN usando HSAL e HCINN come standard interni. Lo schema della procedura analitica è riportato in figura M15. La purificazione SPE è stata condotta come descritto (Parte sper., 6.2.1.3). L'analisi HPLC è

stata condotta con il metodo **I3** (Tabella **M12**), ed un cromatogramma delle soluzioni di propoli risultanti è riportato in figura **R19**.

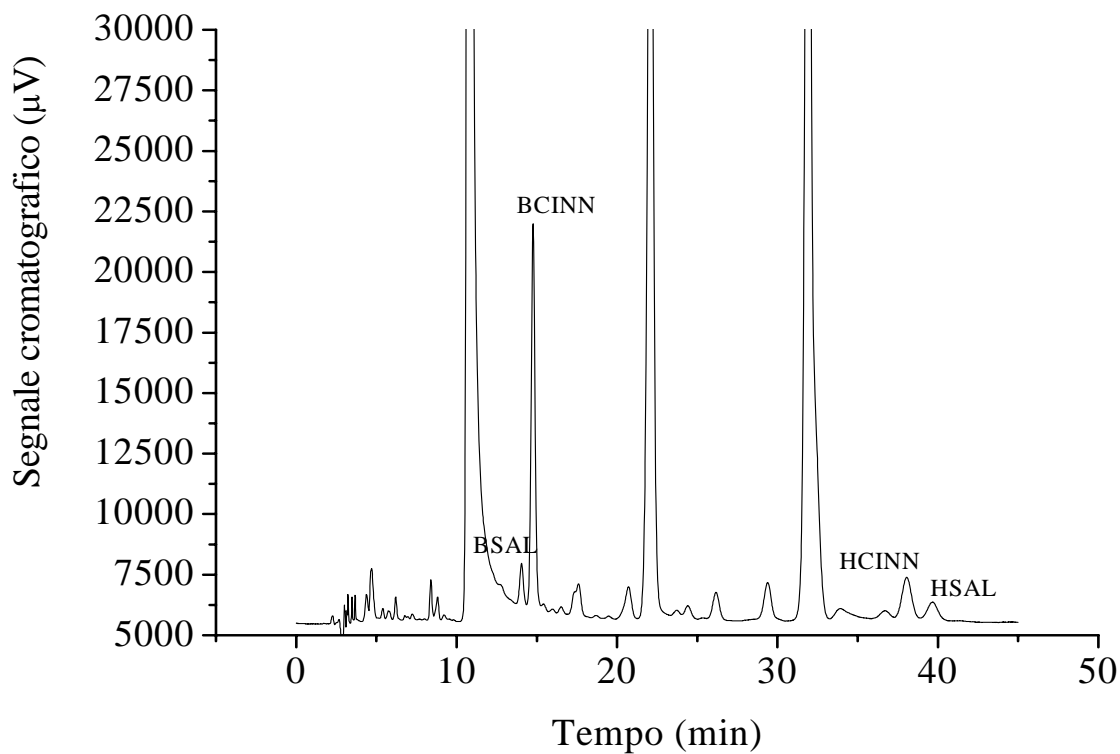


Figura R19. Cromatogramma del campione A1 registrato dopo il trattamento riportato in figura **M15** usando il metodo di eluizione **I3** (Tabella **M12**)

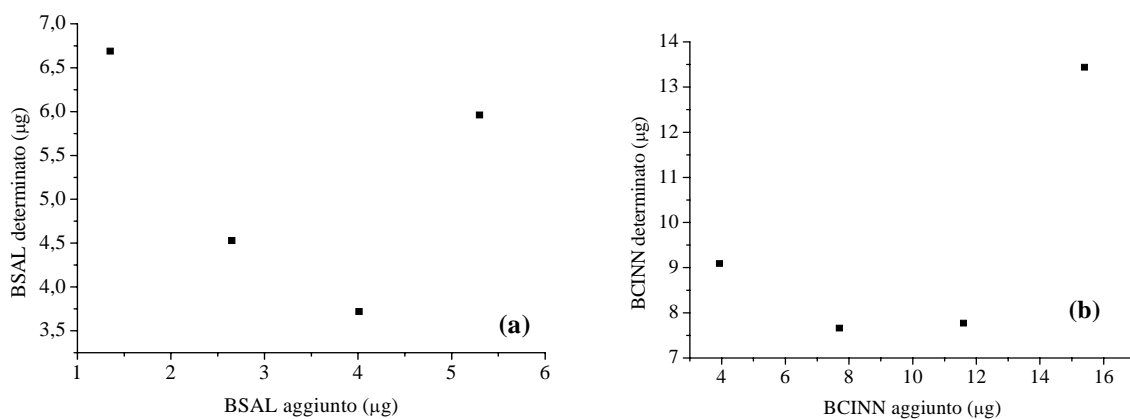


Figura R20. Quantità di (a) BSAL e (b) BCINN determinate per HPLC come da schema riportato in Figura **M14** in funzione delle quantità aggiunte (Tabella **R9**)

Si è tentato di ricavare la concentrazione analitica applicando il metodo delle aggiunte, ma è possibile vedere che i punti delle quattro prove non sono correlati (figura **R20**). Non è stato quindi possibile calcolare le quantità analitiche di BSAL e BCINN.

E' possibile calcolare i recuperi degli esteri esilici, in quanto la quantità aggiunta è l'unica effettivamente presente in soluzione. Sono stati stimati anche i recuperi degli esteri benzilici, assumendo che il risultato determinato con il metodo delle aggiunte mediante GC-MS per lo stesso campione con le stesse soluzioni sia corretto (Ris., **2.2.1**). Le correlazioni sono riportate in figura **R21**. I valori di recupero sembrano correlati. Sono stati riportati in grafico anche i recuperi percentuali di ciascun estere benzilico in funzione del recupero percentuale corrispondente estere esilico (Fig. **R22**).

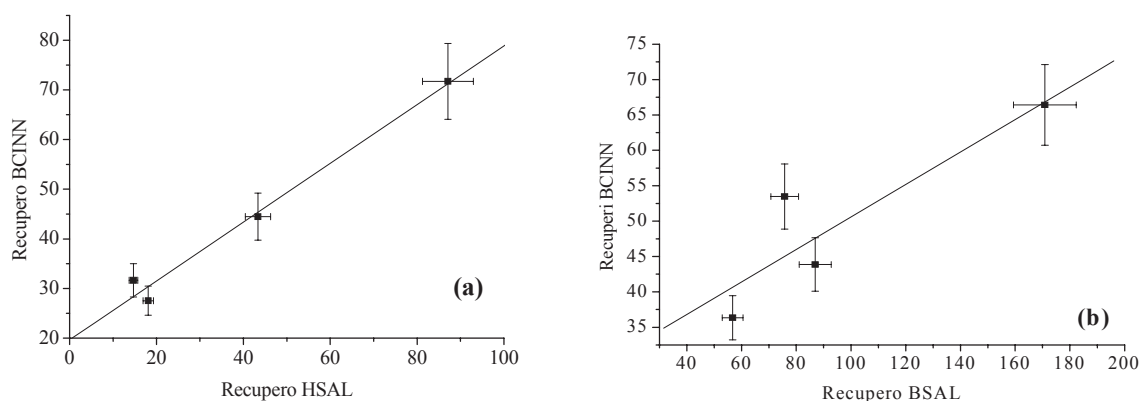


Figura R21. Recupero percentuale di (a) HCINN in funzione di HSAL e (b) BCINN in funzione di BSAL, per i campioni estratti da esano (Ris., **2.2.1**) trattati come da figura **M15** ed analizzati con HPLC. Le rese degli esteri benzilici sono state stimate usando i valori determinati mediante il metodo delle aggiunte con GC-MS (Ris., **2.2.1**)

E' possibile notare che la correlazione è presente, quindi sembrerebbe possibile ottenere i valori di recuperi incogniti degli esteri benzilici dai recuperi noti degli esteri esilici. Tuttavia, il metodo delle aggiunte non funziona adeguatamente (vedi figura **R20**), e questo è un indice di scarsa riproducibilità nel recupero dei singoli esteri. Inoltre, le rette di correlazione riportate in figura **R22** non sono passanti per l'origine, e questo le distingue nettamente da quelle ottenute in figura **R18** per lo stesso tipo di correlazione dopo la semplice estrazione da esano degli EEP ed analisi GC-MS. La presenza di una intercetta e la non unitarietà della pendenza indicano che i due tipi di esteri (esilici e benzilici) non si comportano nella stessa maniera nell'interazione con la colonna SPE. Questo potrebbe introdurre un ulteriore fattore di non

riproducibilità. La bontà e l'utilità di questa correlazione andrà dunque verificata confrontando i risultati ottenuti nell'analisi degli EEP dei campioni di propoli con questa metodica e l'analisi GC-MS.

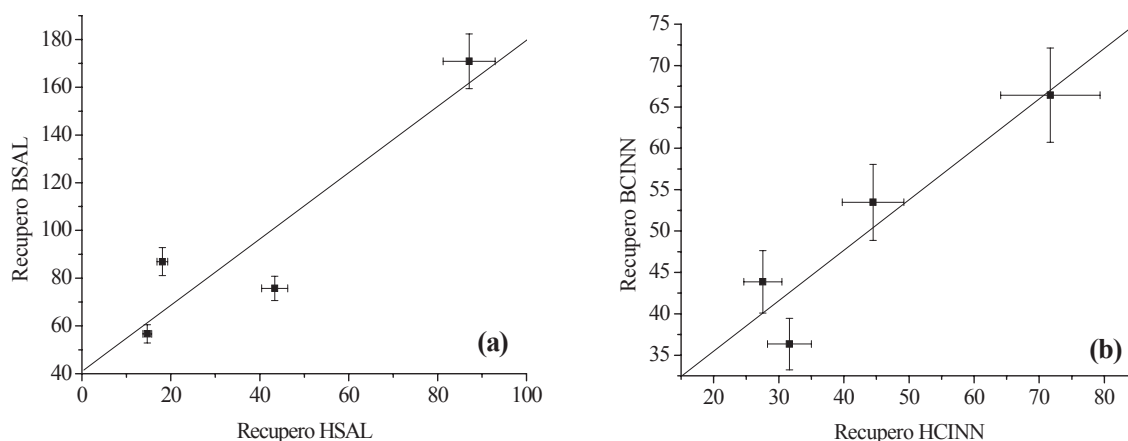


Figura R22. Recupero percentuale di (a) BSAL in funzione di HSAL e (b) BCINN in funzione di HCINN, per i campioni estratti da esano (Ris., 2.2.1) trattati come da figura M15 ed analizzati con HPLC. Le rese degli esteri benzilici sono state stimate usando i valori determinati mediante il metodo delle aggiunte con GC-MS. I parametri di correlazione sono per i salicilati $P = 1,387$, $I = 40,94\%$ e $R = 0,9192$; per i cinnamati $P = 0,610$, $I = 23,29\%$ e $R = 0,9358$

2.2.3 Analisi GC-MS e HPLC di campioni di propoli

Gli EEP dei campioni di propoli raccolti nell'autunno 2007 sono stati trattati secondo lo schema riportato in figura M15, ed analizzati mediante GC-MS, ed un bianco è stato preparato trattando 15 mL di etanolo puro. La procedura è la stessa usata per la messa a punto del metodo (Ris, 2.2.1), con la differenza che sia aggiungono quantità costanti dei soli standard interni da una soluzione etanolica (10,02 µg di HSAL e 19,83 µg di HCINN). 5 mL degli estratti esanici sono stati quindi trattati su colonna SPE ed analizzati con il metodo I3 (vedi figura M15; Ris., 2.2.1). I valori analitici GC-MS sono stati divisi per i recuperi sperimentali degli standard interni; i valori analitici HPLC sono stati preparati come da schema in figura M15 corretti per i recuperi degli standard interni. I valori sono stati riportati in tabella R11, come concentrazione nelle propoli solide in µg/g.

I valori ottenuti con i due metodi non sono comparabili. I risultati ottenuti in sede di messa a punto del metodo GC-MS (Ris., 2.2.1) risultano più convincenti di quelli ottenuti nella messa a punto del metodo HPLC (Ris., 2.2.2). L'ipotesi che nel processo di purificazione SPE si

introducano più fattori di non riproducibilità, sia nel recupero dei singoli esteri, sia nella correlazione dei recuperi degli esteri benzilici in funzione degli esilici (Figura **R22**), sembra quindi confermata (Ris., **2.2.2**). Poiché le curve di recupero degli esteri standard (Ris., **2.1.1.1**; figure **R4**, **R5**, **R6** ed **R7**) mostrano chiaramente che 7 mL di eluente dovrebbero essere sufficienti a recuperare quantitativamente gli esteri, è possibile che l'effetto matrice sia almeno in parte responsabile di questa perdita di riproducibilità. I composti più polari (flavonoidi e acidi organici) presenti nella propoli si adsorbono sulla silice alterandone le proprietà e modificando in maniera non prevedibile i volumi di eluizione dei quattro esteri. Il metodo GC-MS è quindi stato preferito per le analisi quantitative di BSAL e BCINN.

Propoli	BSAL			BCINN		
	GC-MS	HPLC	HPLC/GC	GC-MS	HPLC	HPLC/GC
A1	20	51	2,55	55	58	1,05
T1	40	46	1,15	75	82	1,09
T2	70	33	0,47	310	1175	3,79
L2	15	41	2,73	20	57	2,85
L3	80	34	0,43	1025	870	0,85

Tabella R11. Concentrazioni di BSAL e BCINN nei campioni di propoli solida in µg/g determinati sia mediante GC-MS sia mediante HPLC dopo purificazione SPE (vedi figura M15) (RSD per le prove GC-MS 15 % per BSAL e 10 % per BCINN; 20 % per le prove HPLC)

2.2.4 Determinazione per HPLC di flavonoidi e acidi cinnamici

I cromatogrammi HPLC in figura **R23** sono stati registrati iniettando EEP di propoli A1 diluiti in una miscela 80/20 H₂O/ACN contenente 0,1 % in acido formico, in modo che la concentrazione fosse 60 ppm, eluendo con il gradiente G2 su colonna Varian Pursuit XRs C18, $\lambda_{\text{riv}} = 250, 275, 293$ e 320 nm (tabella **M12**). Le altre propoli esaminate, cioè T1, T2, L2 ed L3, hanno un profilo molto simile a quello in figura.

La coiniezione con standard puri ha permesso di evidenziare la presenza di picchi assegnabili alle seguenti specie: acido caffeico, acido p-cumarico, acido ferulico, quercetina, apigenina, kaempferolo, crisina, galangina. La coiniezione di pinocembrina e CAPE mostrava che queste specie coeluivano. La coiniezione non ha potuto mettere in evidenza la presenza dei picchi delle seguenti specie: acido clorogenico, acido sinapico, acido o-cumarico, naringenina,

isosakuranetina, alcol cinnamico. Nelle figure **R24**, **R25** e **R26** sono visibili i particolari di tre parti del cromatogramma, comparati con i cromatogrammi degli standard puri.

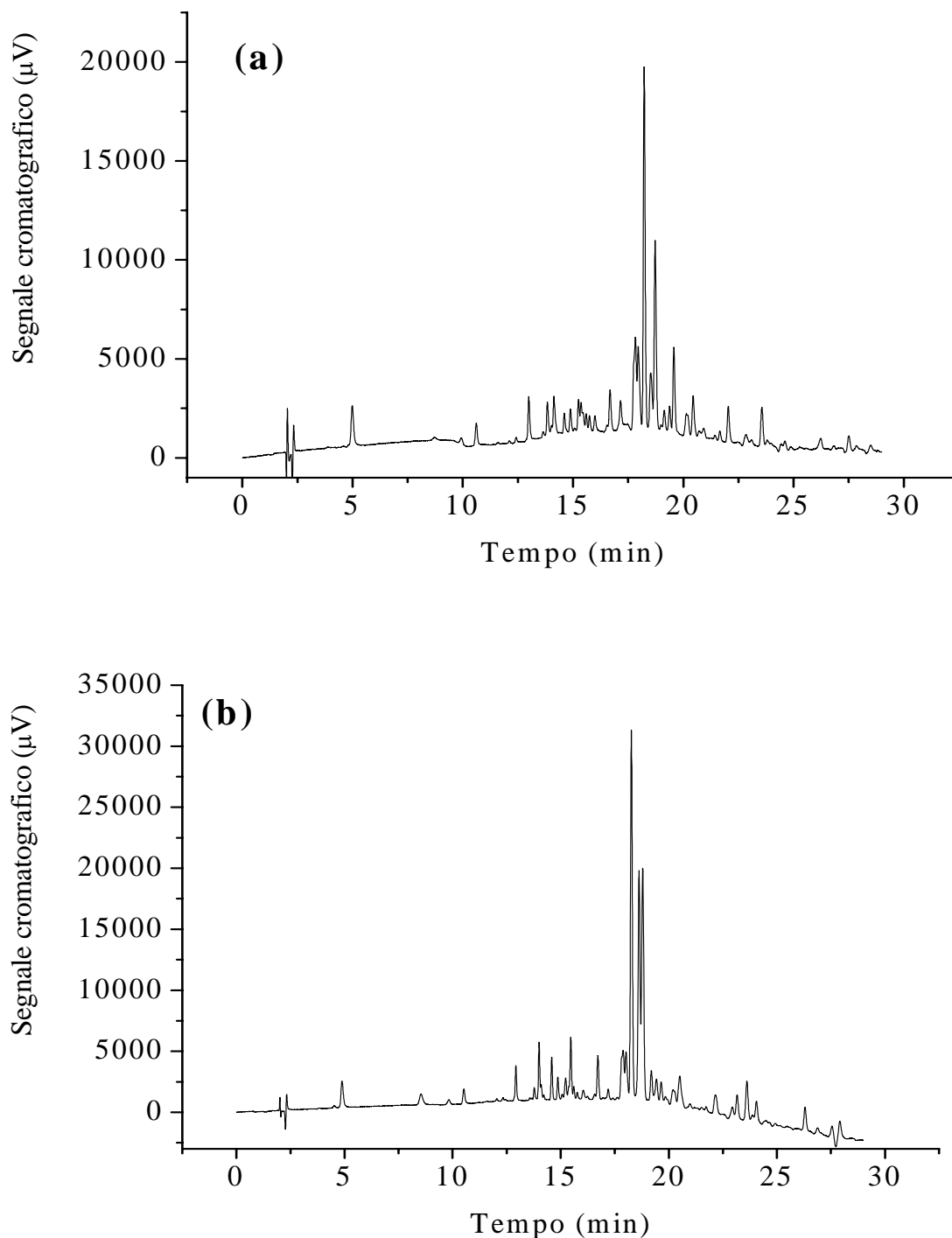


Figura R23. Profili cromatografici di EEP di propoli A1 diluiti in una miscela 80/20 H₂O/ACN contenente 0,1 % in acido formico, in modo che la concentrazione finale fosse 60 ppm (loop di 2 µL, circa 120 ng di propoli totali iniettati), su colonna Pursuit con il metodo G2 (tabella M12), rivelando a quattro lunghezze d'onda diverse: (a) 250 nm, (b) 275nm.

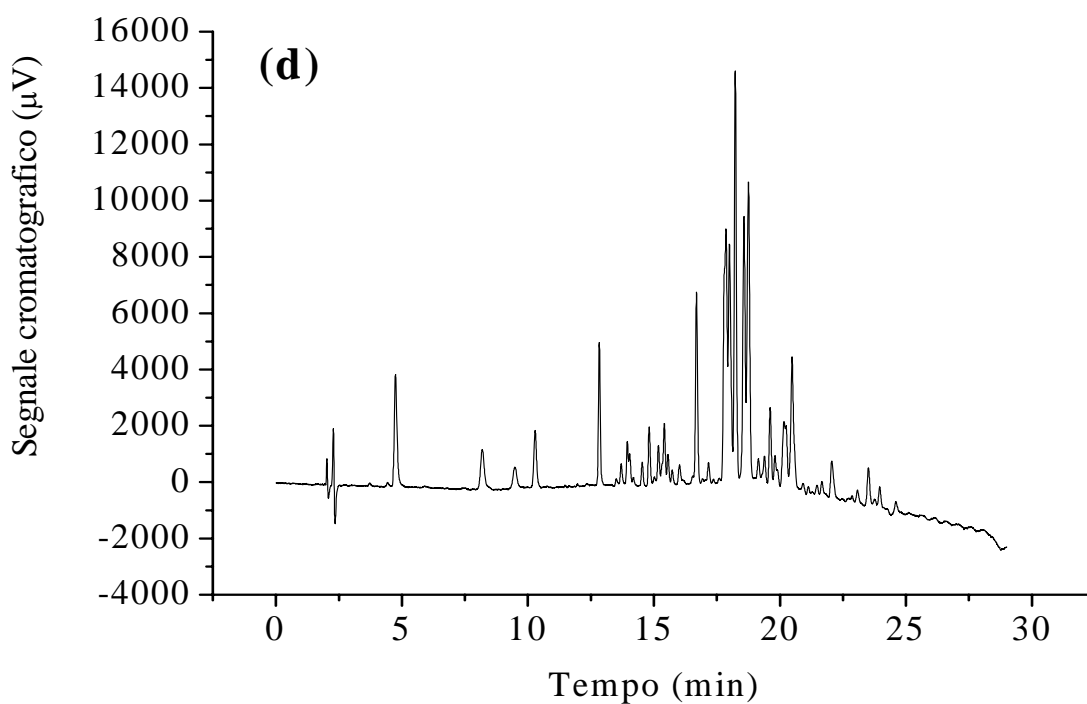
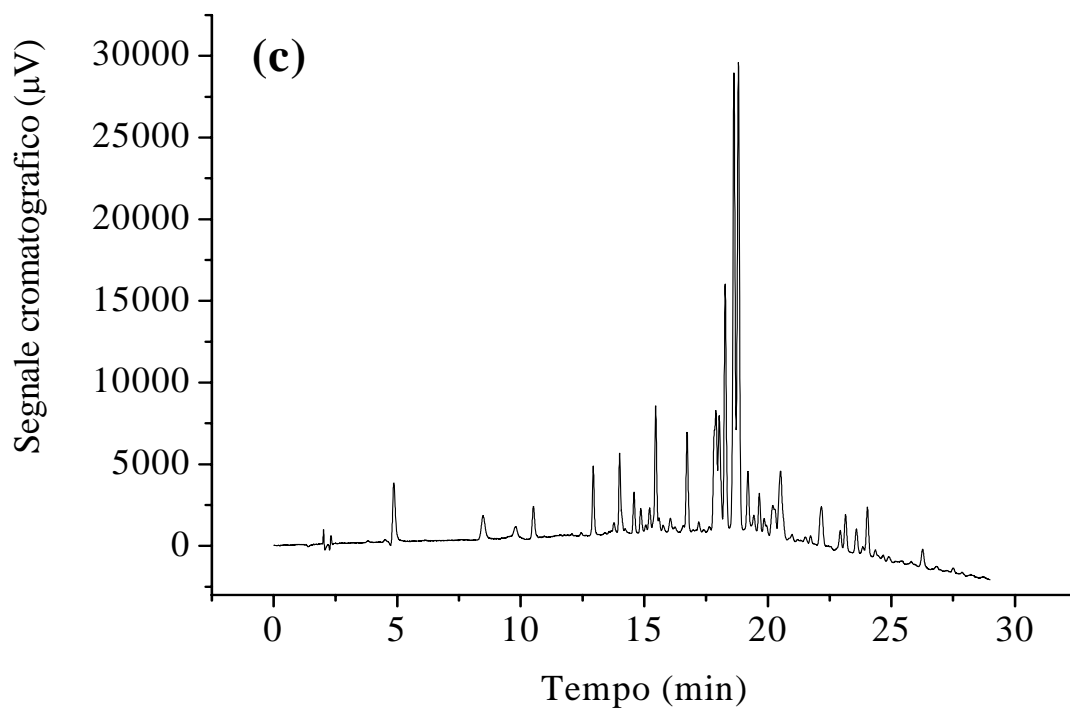


Figura R23. Continua da pag. 112, Profili cromatografici di EEP di propoli A1 diluiti in una miscela 80/20 H₂O/ACN contenente 0,1 % in acido formico, in modo che la concentrazione finale fosse 60 ppm (loop di 2 µL, circa 120 ng di propoli totali iniettati), su colonna Pursuit con il metodo G2 (tabella M12), rivelando a quattro lunghezze d'onda diverse: /c) 293 nm e (d) 320 nm

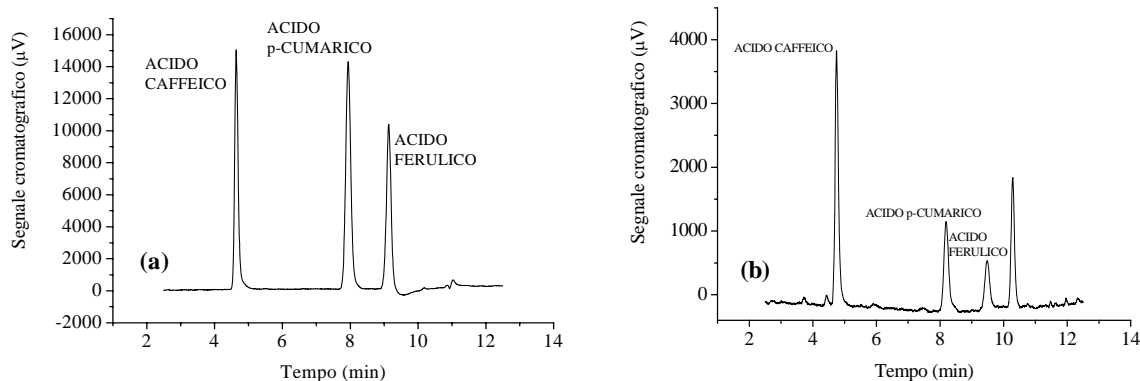


Figura R24. Particolare 2,5-12,5 minuti dei cromatogrammi (a) degli standard e (b) di EEP di propoli A1 (figura R23 (d)) registrati a 320 nm ed eluiti su colonna Pursuit con il metodo G2 (tabella M12). Sono visibili i picchi assegnati per coiniezione ad acido caffeico ($t_{rit} = 4,90$ min), acido p-cumarico ($t_{rit} = 8,54$ min), acido ferulico ($t_{rit} = 9,78$ min),

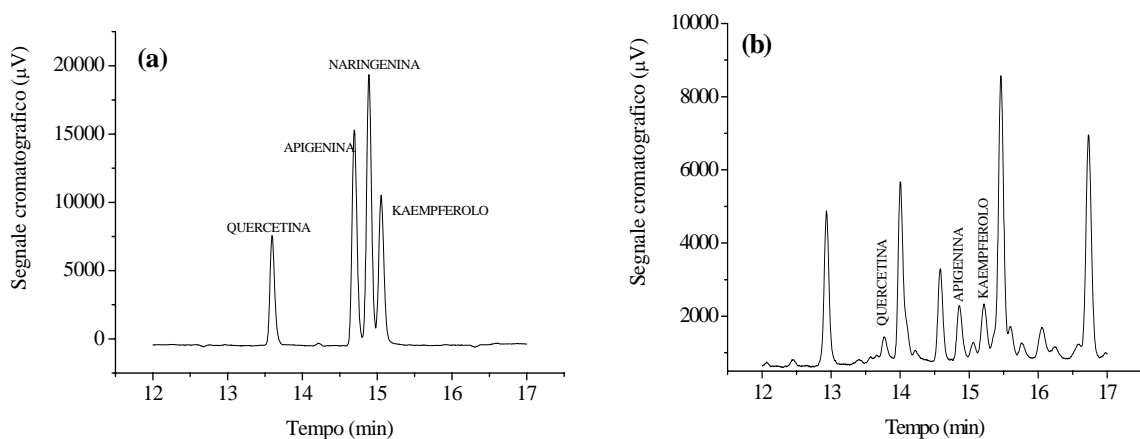


Figura R25. Particolare 12,0-17,0 minuti dei cromatogrammi (a) degli standard e (b) di propoli A1 (figura R23 (c)) registrati a 293 nm ed eluiti su colonna Pursuit con il metodo G2 (tabella M12). Sono in evidenza i picchi assegnati alla quercetina ($t_{rit} = 13,74$ min), apigenina ($t_{rit} = 14,83$ min), kaempferolo ($t_{rit} = 15,19$ min)

E' possibile vedere che si ottiene una buona separazione alla linea di base solo dei picchi degli acidi cinnamici, che escono nella parte iniziale del cromatogramma. Per l'integrazione di tutti gli altri picchi si è provveduto a effettuare la deconvoluzione prima di integrare.

Per confermare le assegnazioni fatte mediante coiniezione, è stata condotta un'analisi dei rapporti di intensità dei segnali di ciascuna specie nei campioni reali a differenti lunghezze d'onda. Tale analisi è descritta diffusamente in Appendice 4, ed è basata sulla misura dei rapporti di intensità dei picchi delle singole specie alle diverse lunghezze d'onda. I valori dei rapporti sono stati misurati con soluzioni standard, e quei valori sono stati usati come

confronto per i rapporti di intensità misurati sui picchi dei campioni reali. L'analisi statistica ha permesso di confermare l'assegnazione dei picchi dell'acido caffeico, acido p-cumarico, acido ferulico, quercetina ed apigenina. Il picco della galangina è invece risultato troppo contaminato e non utilizzabile. L'analisi ha infine mostrato che il picco della crisina è contaminato da una specie che però influenza in maniera significativa solo il segnale a 275 nm, e il picco del kaempferolo è contaminato da una specie che però influenza in maniera significativa solo il segnale a 293 nm. L'analisi dei segnali alle altre lunghezze d'onda hanno permesso di assegnare i picchi e di condurre l'analisi quantitativa.

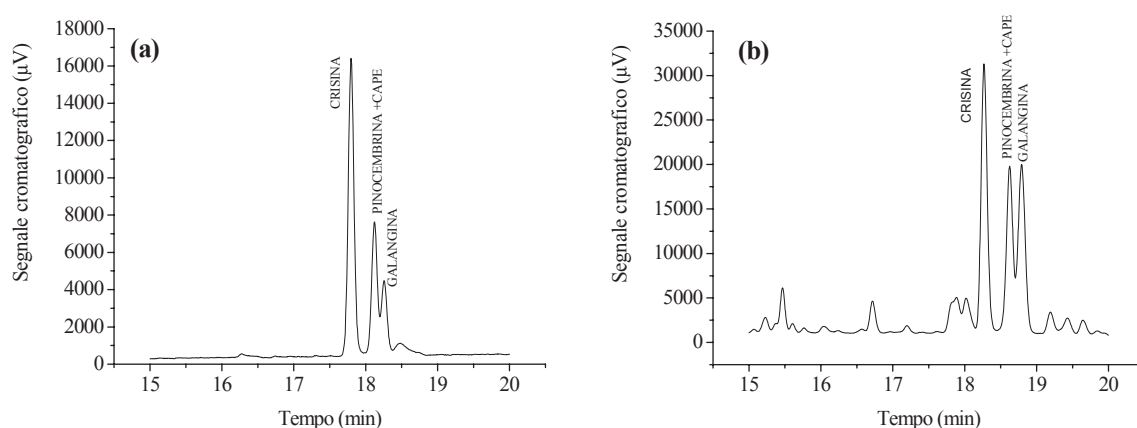


Figura R26. Particolare 15,0-20,0 minuti dei cromatogrammi (a) degli standard e (b) di EEP di propoli A1 (figura R23 (b)) registrati a 275 nm ed eluiti su colonna Pursuit con il metodo G2 (tabella M12). Sono in evidenza i picchi assegnati alla crisina ($t_{rit} = 18,18$ min), pinocembrina +CAPE ($t_{rit} = 18,51$ min), galangina ($t_{rit} = 18,70$ min)

	Acido caffeico	Acido p-cumarico	Acido ferulico	Quercetina	Apigenina	Kaempferolo	Crisina	BSAL	BCINN
A1	25000	2790	4200	8500	8000	8500	50000	20	55
T1	19000	2360	3100	4000	3500	3500	34000	40	75
T2	2600	1910	3500	600	1300	1400	6000	70	310
L2	22000	5440	5200	5200	5000	6000	39000	15	20
L3	6950	3640	3300	4900	1100	3300	30000	80	1025
Media	15000	3200	3900	4600	3800	4500	32000	45	300
SD	10000	1400	850	2800	2800	2700	16000	30	420

Tabella R12. Valori di concentrazione in $\mu\text{g/g}$ nelle propoli solide di alcune specie nei campioni di propoli raccolti in autunno 2007. I valori sono stati determinati per HPLC con il gradiente G2 (vedi metodi) dopo diluizione di soluzione etanolica di propoli a 60 ppm circa in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 4/1 acidificata 0,1 % con acido formico. I valori di BSAL e BCINN sono quelli riportati in tabella R11, determinati mediante GC-MS

L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante la tracciatura di rette di taratura con standard puri (Parte sper., **6.2.2.1**). I valori di concentrazioni delle specie analizzate sono in tabella **R12** come contenuto in µg/g nella propoli solida. I valori misurati di concentrazione per tutte le specie effettivamente quantificabili sono riportati in tabella **R12**. A causa della coeluzione, non è stato possibile determinare CAPE e pinocembrina (vedi Appendice **5**).

Il cromatogramma riportato in figura **R23** è stato confrontato con alcuni presenti in letteratura attribuiti con certezza al pioppo, e riprodotti in Figura **R11** e **R12**. E' possibile concludere quanto segue:

- i profili qualitativi risultano molto simili tra loro. A bassi tempi di ritenzione, sono visibili gli acidi cinnamici, subito dopo gli acidi sono visibili, a bassa intensità, proprio come nei nostri cromatogrammi, i flavonoidi più polari, come apigenina e kaempferolo; al centro i picchi più intensi, attribuibili tra l'altro a crisina, nonché a galangina, CAPE e pinocembrina (che non si è riusciti ad assegnare);
- in base a questi risultati è possibile confermare l'osservazione fatta preliminarmente in sede di esame degli spettri UV-VIS, e cioè che i campioni delle propoli esaminati fossero di pioppo;
- l'analisi della purezza di picco e della risoluzione dei diversi picchi mostra che la colonna XRs C18 Pursuit è molto adatta per l'analisi degli acidi cinnamici, che escono molto ben separati e risolti alla linea di base nella parte iniziale del gradiente. Al contrario, la colonna è risultata poco selettiva nei confronti delle specie a bassa polarità, che eluiscono poco risolte tra di loro. Per questo motivo, non è stato possibile la determinazione qualitativa e quantitativa di specie molto importanti per la caratterizzazione della propoli di pioppo, come galangina, pinocembrina e CAPE.

I valori quantitativi determinati saranno usati come riferimenti per la valutazione del funzionamento del trattamento della propoli con fase oleosa (Ris., **4**). Il confronto dei valori quantitativi determinati con altri di letteratura risulta problematico, perché i campioni di propoli sono molto variabili e spesso campioni anche raccolti in arnie molto vicine possono avere profili comparabili, ma con concentrazioni molto diverse [29]. Nei campioni esaminati nel corso della presente sperimentazione, originari dell'Italia Centrale, la crisina sembra il flavonoide predominante, l'acido caffeico l'acido cinnamico più importante. Se esaminiamo i valori di concentrazione di propoli giapponese di pioppo [43], la crisina è la specie prevalente

solo in alcuni dei quattordici campioni esaminati, mentre in altri è la pinocembrina, piuttosto che la tectocrisina. L'acido caffeico sembra essere prevalente rispetto agli altri acidi. Lo stesso si può registrare in campioni di propoli coreana [44], in propoli cinese ed uruguayana [5; 39]: l'acido caffeico prevale tra gli altri acidi, ma le concentrazioni relative degli altri flavonoidi sono molto diverse, e uno qualunque di quelli comuni nelle propoli può essere di volta in volta quello prevalente. Il confronto dei dati quantitativi sembra quindi mostrare una certa similitudine dei campioni esaminati con altri di propoli di pioppo, ma ha meno importanza di quello svolto sulla similitudine dei profili qualitativi di composizione, e offre meno potenzialità di mettere in evidenza correlazioni.

2.3 Caratterizzazione per contenuto di classi di composti e potere antiossidante dei campioni reali di propoli raccolti nell'autunno 2007

I campioni di propoli raccolti nell'autunno 2007 sono stati caratterizzati anche mediante il contenuto totale di flavoni e flavonoli, flavanoni e diidroflavonoli, fenoli totali, e ne è stato misurato il potere antiossidante; i valori misurati sono stati riportati in tabella **R13**. I flavoni e flavonoli sono espressi come mg/g di galangina, determinazione spettrofotometrica a 425 nm come complesso con AlCl_3 , 250 μL di EEP di propoli a 5000 ppm in matraccio da 25 mL, pari a circa 1250 μg di propoli; i flavanoni e diidroflavonoli sono stati espressi come mg/g di pinocembrina, determinazione spettrofotometrica a 486 nm come 2,4 dinitrofenil idrazone, 30 μL di EEP di propoli a 5000 ppm in matraccio da 10 mL, pari a circa 150 μg di propoli; i fenoli totali sono stati espressi come mg/g di una miscela 1:2 di galangina e pinocembrina, determinati spettrofotometricamente a 760 nm come specie di riduzione in soluzione di polianioni del tungsteno e del molibdeno in soluzione acida, 100 μL di EEP di propoli a 5000 ppm in matraccio da 25 mL, pari a circa 500 μg di propoli; potere antiossidante determinato come μg (Fe^{2+}) generati in soluzione acida a 40 °C per riduzione del Fe^{3+} per μg di propoli usata nel test, il Fe^{2+} determinato spettrofotometricamente a 593 nm come complesso con il TPTZ, 36 μL di EEP di propoli diluiti a circa 500 ppm, pari a circa 18 μg di propoli, in cella spettrofotometrica con 2,64 mL di tampone acetico contenente Fe^{3+} circa 1,7 mM, pari a circa 400 μmoli , e TPTZ. Tutte le correlazioni quantitative sono state fatte mediante rette di calibrazione (Appendice 1, tabella **A182**). I bianchi sono stati preparati trattando quantità equivalenti di etanolo o di idroalcolica, secondo la natura del campione. Le misure spettrofotometriche sono stati registrati contro questi bianchi.

Campione	Flavoli e flavonoli totali	Flavanoni e diidroflavonoli totali	Fenoli totali	Potere antiossidante
	C (mg/g)	C (mg/g)	C (mg/g)	$\mu\text{g}(\text{Fe-II})/\mu\text{g}$ (propoli)
A1	118	140	500	0,17
T1	80	95	380	0,150
T2	25	30	150	0,052
L2	108	110	450	0,16
L3	3,3	15,0	95	0,145

Tabella R13. I flavoni e flavonoli totali espressi come mg/g di galangina misurati spettrofotometricamente come complessi con AlCl_3 a 425 nm (250 μL di EEP di propoli a 5000 ppm, pari a circa 1250 μg di propoli); flavanoni e diidroflavonoli espressi come mg/g di pinocembrina, misurati spettrofotometricamente come 2,4 dinitrofenilidrazoni a 486 nm (30 μL di EEP di propoli a 5000 ppm, pari a circa 150 μg di propoli); i fenoli totali come mg/g di una miscela 1:2 di galangina/pinocembrina, misurati spettrofotometricamente come specie di riduzione di polianioni di molibdeno e tungsteno in soluzione acida (100 μL di EEP di propoli a 5000 ppm, pari a circa 500 μg di propoli). Potere antiossidante riportato come massa del Fe^{2+} , per massa di propoli effettivamente aggiunta, misurato spettrofotometricamente a 593 nm come Fe^{2+} -TPTZ formatosi per riduzione del Fe (III) in soluzione acida (36 μL di EEP di propoli diluiti a circa 500 ppm, pari a circa 18 μg) (Parte sper., 6.1.2; 6.1.3)

I valori determinati per i campioni esaminati possono essere confrontati con alcuni valori riportati in letteratura. I valori di fenoli totali, determinati sempre mediante il metodo Folin-Ciocalteu, ma usando acido gallico come riferimento, trovano valori 80-120 mg/g per campioni di propoli brasiliana [68], 100-280 mg/g per campioni di propoli uruguayana e cinese [5], una media di 217 mg/g per altri campioni di propoli uruguayana e cinese [39], 85-283 mg/g per campioni di propoli coreane [44], 50-200 mg/g per campioni di propoli giapponese [43]. I valori registrati sembrano compatibili con quelli misurati nella presente sperimentazione per campioni di propoli originari dell'Italia Centrale, che hanno comunque valori tendenzialmente più alti. E' possibile che questo dato dipenda almeno in parte dall'uso di acido gallico come riferimento nei lavori citati. Popova [38] asserisce infatti che l'uso di questo standard per la taratura del metodo di Folin-Ciocalteu, per l'analisi di campioni di propoli, tende a sottostimare il valore di fenoli totali. I valori misurati nel corso della presente sperimentazione, usando una miscela di pinocembrina e galangina (Parte sper., 6.1.2), potrebbero non essere completamente comparabili. I valori dei flavonoidi totali sono stati determinati, e trovati nell'ordine di 7-26 mg/g per campioni di propoli brasiliana [68], tra 3 e 6,6 mg/g per campioni di propoli uruguayana e cinese [5], 16-136 mg/g per campioni di propoli coreane [44], 18-113 mg/g per campioni di propoli giapponese [43]. Questi valori

sono stati determinati usando la quercetina come standard nel test di complessazione con $AlCl_3$, e nei rispettivi lavori sono riferiti a tutti i flavonoidi. Tuttavia, il test con $AlCl_3$ e rivelazione a 425 nm rivela soltanto flavoni e flavonoli [38], e quindi i valori dovrebbero essere confrontati con i dati registrati nella presente sperimentazione per i soli flavoni e flavonoli. Il paragone indica che i valori sono comparabili con gli altri campioni citati, tutti di pioppo. I dati di flavanoni e diidroflavonoli totali determinati come 2,4 dinitrofenil idrazoni non sono diffusi in letteratura. Una determinazione è stata condotta su cinque campioni di propoli cecoslovacca [37], il cui contenuto era di 36-64 mg/g. Questi valori sembrano compatibili con quelli misurati nel corso della presente sperimentazione.

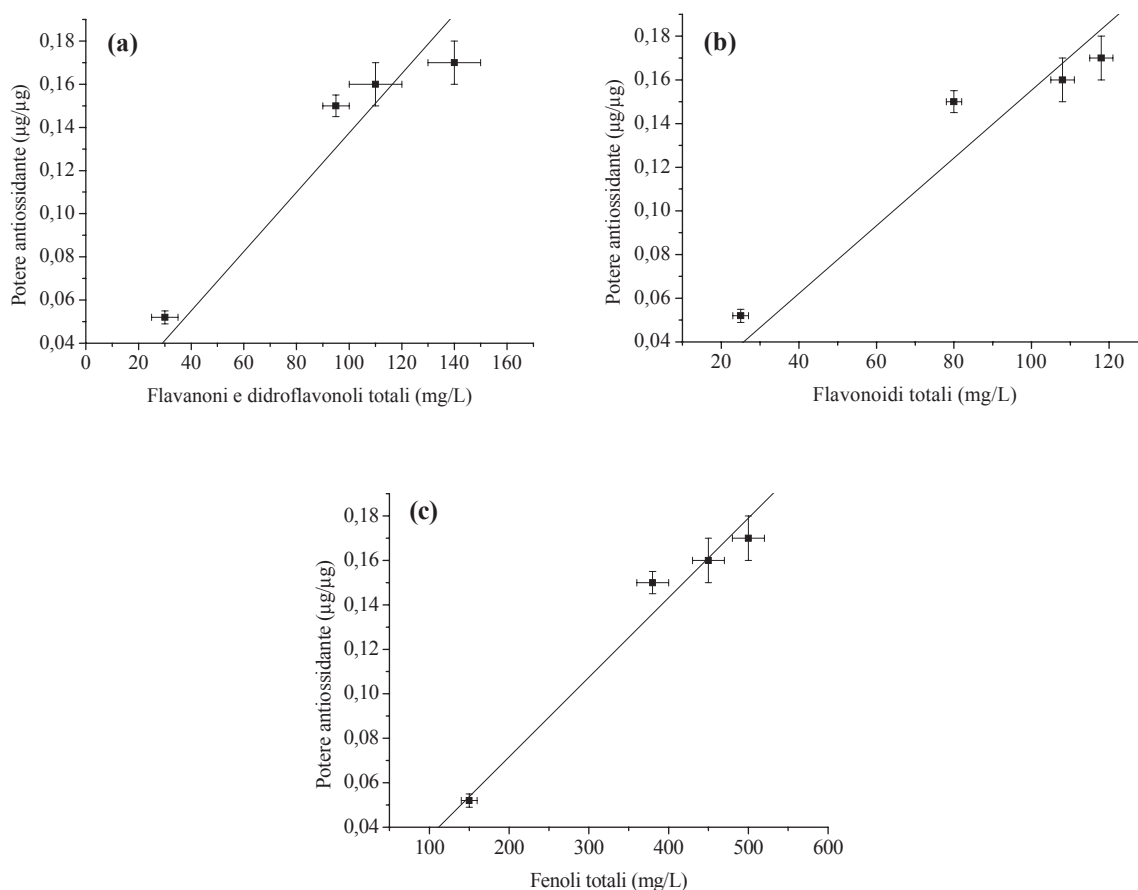


Figura R27. Correlazione tra il potere antiossidante e il contenuto di **(a)** flavanoni e diidroflavonoli totali, **(b)** flavoni e flavonoli totali, **(c)** fenoli totali (vedi tabella R13)

Sono stati anche correlati ciascuno dei tre parametri di composizione determinati con il valore del potere antiossidante (vedi figura R27). E' possibile notare come i valori siano ben correlati, con l'esclusione dei valori provenienti dal campione L3, che anche in questo caso mostra un profilo del tutto anomalo rispetto agli altri campioni (i punti misurati sulla propoli

L3 non sono stati riportati in figura **R27**). Questo risultato indica che la concentrazione di queste specie è correlabile al potere antiossidante della propoli, confermando un dato già molto diffuso in letteratura (Stato dell'arte, **1**).

Non è stato possibile determinare quantitativamente la pinocembrina, ma ne è stata stimata la quantità massima possibile nei campioni, assegnando a questa specie l'intero picco (Appendice **5**). E' possibile notare come tali valori siano sistematicamente inferiori a quelli determinati con la metodica spettrofotometrica per i flavonoli e diidroflavanoni, tranne che per la propoli L3. Questo dato ci indica che la pinocembrina non può essere considerata la specie preponderante di questa classe nei campioni da noi esaminati [38]. Tra queste specie, potrebbe essere compresa la pinostrobinina, ma anche dei diidrocalconi, che non è stato possibile determinare cromatograficamente nel corso della presente sperimentazione.

3. Trattamento della propoli con biossido di carbonio supercritico

Tutte le prove sperimentali sono state condotte con lo strumento HP 7860 T, usando le condizioni sperimentali riportate in tabella **M17**. Tutte le analisi cromatografiche degli estratti, delle soluzioni tal quali e dei residui di estrazione sono stati misurati con il gradiente **G4** (Parte sper., **7.1.2**).

3.1 Trattamento di esteri standard

Sono state condotte prove preliminari di estrazione di esteri BSAL e BCINN standard. Questi erano depositati su di un batuffolo di ovatta pretrattato con CO₂ supercritico, facendo gocciolare una quantità nota di una soluzione etanolica a titolo noto (50 µg di BCINN e 250 µg di BSAL le quantità totali trattate), e seccando il solvente con un sottile flusso di azoto. L'ovatta era collocata nella cella e sottoposta ad estrazione. Alla fine della prova gli estratti, eluiti dalla trappola, erano raccolti in un matraccio da 10 mL, portati a volume con etanolo, e la quantità recuperata di ciascun estere era determinata per via spettrofotometrica (277 nm per il BCINN; 305 nm per il BSAL; Appendice **1, 3.2**). I bianchi sono stati ottenuti estraendo un batuffolo su cui era stato fatto gocciolare etanolo puro; sono state fatte cinque estrazioni in bianco, e l'assorbanza registrata alle due lunghezze d'onda è stata mediata per dare un bianco finale da sottrarre alle assorbanze dei campioni reali. Queste prove sono servite a verificare

l'effettiva possibilità di estrarre gli esteri nel mezzo supercritico, e accertare il numero minimo di cicli di eluizione della trappola a stato solido necessari per recuperare gli esteri.

In tabella **R14** sono riportate le percentuali di recupero misurate a diverse quantità di CO₂, che mostrano come sia necessario estrarre per almeno 24 minuti alle condizioni scelte per poter recuperare quantitativamente gli esteri standard. Questa prova di estrazione è stata quindi ripetuta nove volte, trovando recuperi pari a **90,3 ± 3,2** e **97,1 ± 2,4** per BSAL e BCINN rispettivamente (media ± SD).

Tempo (min)	BSAL (%)	BCINN (%)
6	81,5	71,1
12	87,9	86,6
18	89,3	92,9
24	92,4	95,5

Tabella R14. Percentuali di recupero nell'estrazione supercritica (40 °C, 88 MPa, 0,40 g/mL, quantità variabili di CO₂) di esteri standard depositati su ovatta da soluzione etanolica (50 µg di BCINN e 250 µg di BSAL). La trappola è stata eluita con quattro porzioni (vial) da 1,5 mL. Tutte le analisi per via spettrofotometrica a 305 e 277 nm (Appendice 1, 3.2), bianchi per estrazione di etanolo puro

3.2 Trattamento di campioni di propoli a ciclo singolo

La propoli U3 additivata di esteri (Parte sper., **3.1**) è stata sottoposta a diversi trattamenti. Una prima prova è stata condotta depositando 100 µL di EEP a 5000 ppm su di un batuffolo di ovatta, ed allontanando il solvente sotto un flusso di azoto. Il batuffolo era posto nella cella ed estratto.

I campioni sono stati preparati per l'analisi HPLC (Parte sper., **7.1.2**). I valori percentuali di recupero di BSAL e BCINN sono stati determinati mediante HPLC, usando gli EEP tal quali come riferimento, e risultavano pari a **105 %** e **90 %** rispettivamente. Questi valori sono compatibili con quelli determinati per l'estrazione con esteri standard (Ris., **3.1**). La propoli depositata da etanolica su ovatta, quindi, non introduce un effetto matrice sull'estraibilità degli esteri. In figura **R28** e **R29** sono riportati i cromatogrammi determinati mediante HPLC della propoli additivata di esteri tal quale, degli estratti supercritici, e del residuo rimasta sull'ovatta.

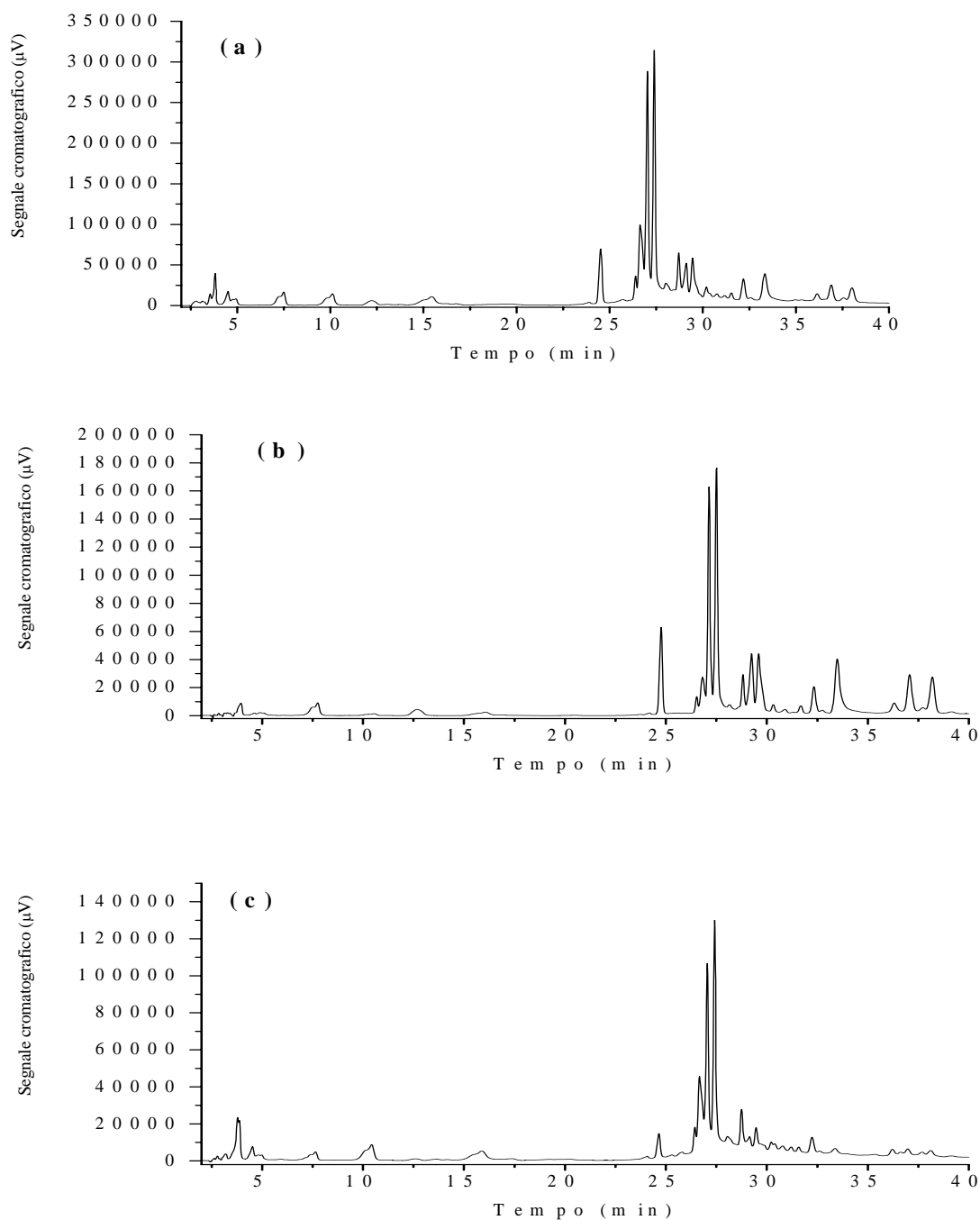


Figura R28. Profili HPLC (a) degli EEP di propoli U3 additivata con esteri tal quale, (b) degli estratti HPLC da propoli depositata su ovatta e (c) dal residuo dell'estrazione, 100 μL di EEP a 5000 ppm trattati. Gli EEP della propoli additivata di esteri (riferimento) estratti con gli ultrasuoni (Parte sper., 4), e preparati per l'analisi HPLC (Parte sper., 7.1.2), gli estratti supercritici in etanolo seccati e ripresi con 200 μL di $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %); l'ovatta residua trattata con etanolo, la soluzione etanolica seccata e il secco ripreso con 360 μL di $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %). Tutti i cromatogrammi registrati con il gradiente G4 (Parte sper., 7.1.2)

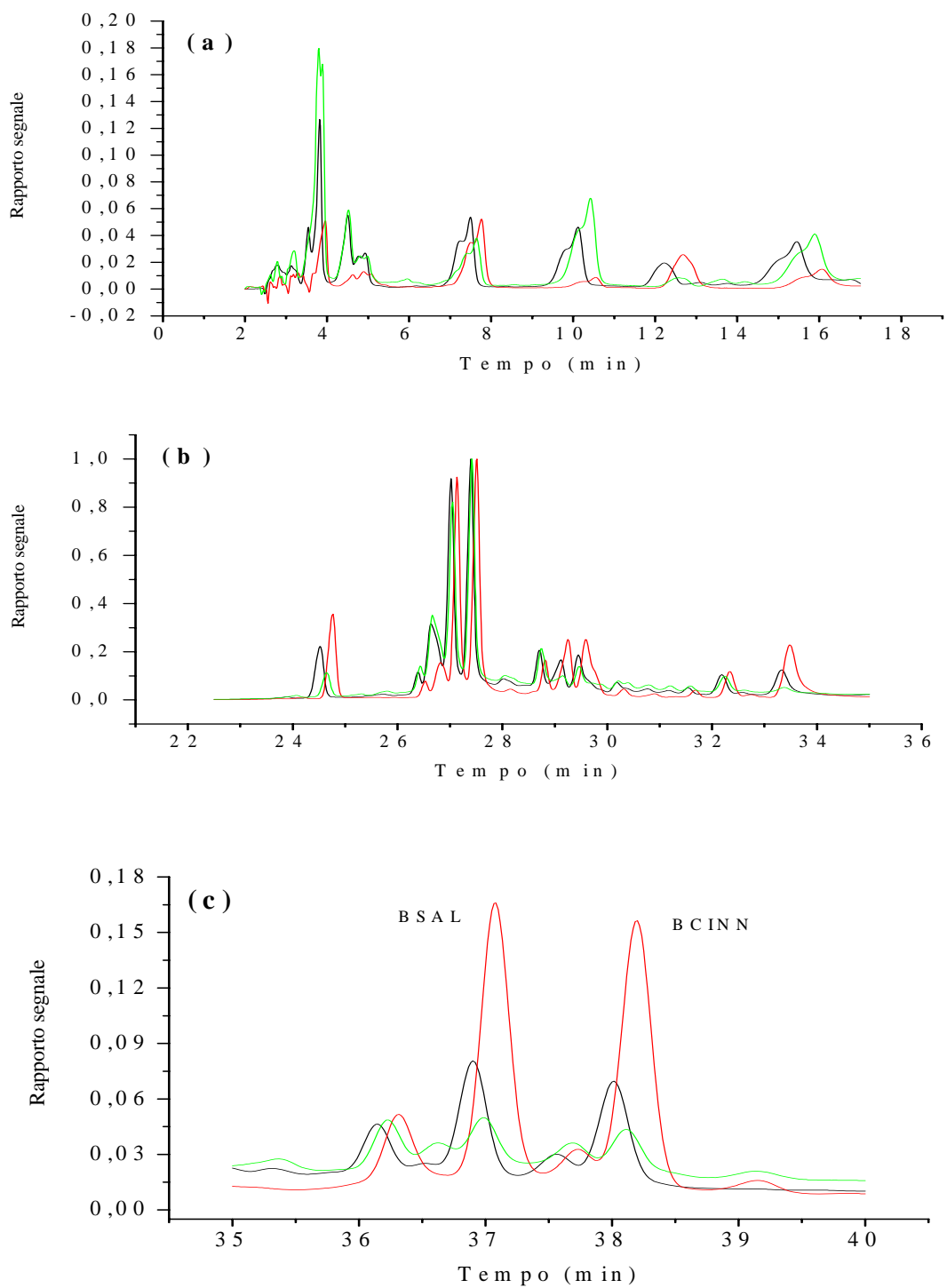


Figura R29. Comparazione dei profili HPLC degli EEP di campione U3 additivato con esteri tal quale (linea nera), degli estratti HPLC da propoli depositata su ovatta (linea rossa), e dal residuo di detta estrazione (linea verde), per i dettagli vedi figura R28. Tutti i cromatogrammi registrati con il gradiente G4 (Parte sper., 7.1.2): (a) tra 0 e 18 minuti, (b) tra 22 e 35 minuti, (c) tra 35 e 40 minuti. Ciascun cromatogramma è stato normalizzato ponendo pari ad uno il valore di massima intensità

L'analisi delle figure **R28** ed **R29** e dell'analisi quantitativa di BSAL e BCINN permette di trarre le seguenti conclusioni:

- i profili di composizione rimangono molto simili, quindi il mezzo supercritico è poco selettivo nei confronti delle diverse specie quando sono depositate sull'ovatta da una soluzione etanolica;
- il mezzo supercritico è comunque più selettivo rispetto alle specie con elevati tempi di ritenzione, cioè quelle meno polari;
- BSAL e BCINN sono estratti quantitativamente, come accade anche nel trattamento degli standard (Ris., **3.1**).

Il metodo risulta certamente selettivo nei confronti degli esteri, e riesce ad allontanarli quantitativamente. Tuttavia emerge chiaramente che la forma molto dispersa della propoli rende disponibili per l'estrazione quasi tutte le specie presenti, annullando le forze che danno coesione alla propoli. E' possibile immaginare quindi che a seguito del trattamento si avrebbe una perdita importante delle componenti benefiche della propoli.

Le valutazioni fatte sull'estrazione da propoli depositata su ovatta da EEP ci hanno indotto a realizzare anche delle prove di trattamento sulla propoli solida, per cercare di realizzare un processo più selettivo.

Sono state condotte estrazioni da propoli solida. Per tenere conto della maggiore difficoltà di trattare questa matrice, le estrazioni sono state condotte in ciclo unico per quarantotto minuti alle condizioni riportate in tabella **M17**. Sono state eseguite due estrazioni su quantità pari a 800 µg di propoli U3 additivata di esteri (Parte sper., **3.1**). Le soluzioni sono state preparate per l'analisi HPLC (Parte sper., **7.1.2**). Le quantità di BSAL e BCINN nelle soluzioni sono state determinate mediante HPLC, ed i recuperi erano pari a $53 \pm 3 \%$ e $25 \pm 3 \%$ per BSAL e BCINN rispettivamente (media \pm SD). Questi risultati sono molto diversi da quelli ottenuti per l'estrazione da propoli depositata su ovatta da EEP. Si possono trarre le seguenti conclusioni:

- nell'estrazione da propoli solida l'effetto matrice è molto importante, ed influenza il recupero quantitativo di BSAL e BCINN;
- nell'estrazione da propoli depositata gli effetti di solubilità in CO₂ sono prevalenti;

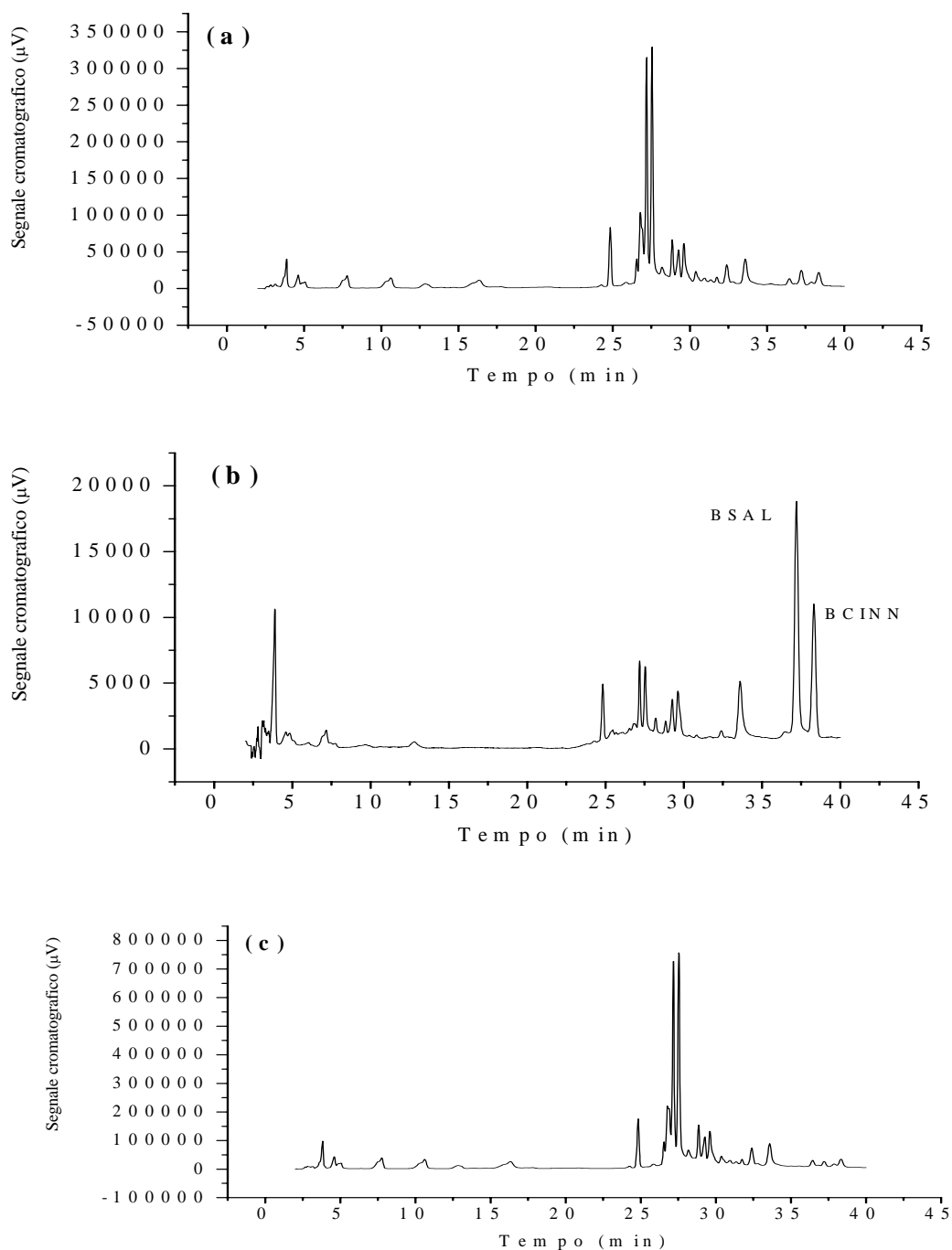


Figura R30. Profili HPLC (a) della propoli additivata di esteri sottoposta ad estrazione (riferimento, Parte sper., 7.1.2), (b) di estratto supercritico da propoli U3 additivata di esteri solida, e (c) della propoli solida residuo dell'estrazione (800 µg a prova), registrati con il gradiente G4 (Parte sper., 7.1.2). Gli EEP della propoli additivata di esteri (riferimento) estratti con gli ultrasuoni (Parte sper., 4), e preparati per l'analisi HPLC (Parte sper., 7.1.2); estratti riuniti in pallone da 25 mL, portati a secco nel rotavapor e ripresi con 150-300 µL di H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %); la propoli residua estratta con etanolo con gli ultrasuoni, la soluzione risultante portata a secco nel rotavapor e ripresi con 150-300 µL di H₂O/ACN 3:1 (fase acquosa acidificata con acido acetico 1 %) ed analizzata mediante HPLC.

- nell'estrazione da propoli solida le interazioni con la matrice e la sua permeabilità sono molto importanti ed influenzano il risultato dell'estrazione;
- mentre nel trattamento da propoli depositata BSAL e BCINN sono recuperati in maniera pressoché quantitativa, con una leggera prevalenza di BCINN, la matrice differenzia i due esteri, che vengono estratti con rese diverse.

La maggiore solubilizzazione di BSAL rispetto a BCINN dipende probabilmente dalla già discussa formazione nei salicilati di un ciclo a sei termini [93] (Ris., **2.1.1.1**), che indebolisce i legami di questo estere con il resto dei componenti della propoli solida. BCINN; al contrario, ha una funzionalità carbonilica che forma forti legami all'interno della matrice.

Sono stati confrontati i cromatogrammi degli estratti supercritici da propoli solida, degli EEP della propoli sottoposta ad estrazione e del residuo di estrazione (Figura **R30**). I cromatogrammi di tal quale e residuo sono piuttosto simili e questo indica che il trattamento della propoli solida estrae una parte piuttosto limitata di composti. Il profilo di composizione degli estratti conferma questa osservazione. Sono presenti pochi composti, e ha un'intensità molto bassa, e si può quindi concludere che l'estrazione è estremamente selettiva, e lascia nella propoli i composti di effetto benefico, come flavonoidi e fenoli, mentre la parte più apolare è quella più solubilizzata, anche se non quantitativamente.

Dei due processi esaminati, quello condotto sulla propoli solida è quello più interessante. La sua selettività infatti promette di fornire una propoli trattata con proprietà più simili a quella del tal prodotto tal quale. Il trattamento della propoli depositata conduce ad un recupero quantitativo di BSAL e BCINN, ma è molto meno selettivo, e quindi il prodotto finale dovrebbe avere qualità molto diverse e probabilmente inferiori a quelle della propoli tal quale. Infine, nella prospettiva dell'ingegnerizzazione del processo, il trattamento della propoli solida sembra più favorevole rispetto ad un processo che richiede la preventiva dissoluzione della propoli, seguito dall'allontanamento del solvente prima del trattamento finale.

3.3 Misure di estrazione di propoli solida in funzione del tempo

Alla luce delle conclusioni del punto precedente, si è deciso di verificare se fosse possibile estrarre quantitativamente gli esteri BSAL e BCINN dalla matrice solida. Sono quindi state eseguite misure in funzione del tempo, dividendo l'estrazione in più passi, e verificando la

(a)		BSAL		BCINN	
Passi	(mg	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)
CO₂)					
1850		4,0	0,40	2,5	0,06
3700		18,0	0,81	10,0	0,11
7400		16,0	0,37	11,0	0,06
12950		12,0	0,16	10,0	0,03
12950		8,0	0,01	7,0	0,02

(b)		BSAL	BCINN
Passi (mg CO₂)		Recupero (%)	Recupero (%)
1850		4,0	2,5
5550		22,0	13,0
12950		40,0	24,0
25900		50,0	35,0
38850		60,0	40,0

Tabella R15. Estrazione supercritica **Q1** di propoli solida (40 °C, 88 MPa, 0,40 g/mL per i tempi vedi Tabella **M18**). Recuperi percentuali degli esteri BSAL e BCINN determinati mediante HPLC ed efficienza del mezzo supercritico espresso in ng di estere estratto per mg di CO₂ passato. Nella tabella **(a)**, i valori per ciascun passo, nella tabella **(b)** i valori di recupero cumulativo. In grassetto i valori finali di recupero

(a)		BSAL		BCINN	
Passi	(mg	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)
CO₂)					
5550		20,0	0,61	9,0	0,066
5550		32,0	0,95	16,0	0,115
11100		20,0	0,30	15,0	0,053
22200		14,0	0,10	14,0	0,025
33300		10,0	0,05	12,0	0,015

(b)		BSAL	BCINN
Passi (mg CO₂)		Recupero (%)	Recupero (%)
5550		20,0	9,0
11100		50,0	25,0
22200		70,0	40,0
44400		85,0	55,0
77700		95,0	65,0

Tabella R16. Estrazione supercritica **O1** di propoli solida (40 °C, 88 MPa, 0,40 g/mL per i tempi vedi Tabella **M18**). Recuperi percentuali degli esteri BSAL e BCINN determinati mediante HPLC ed efficienza del mezzo supercritico espresso in ng di estere estratto per mg di CO₂ passato. Nella tabella **(a)**, i valori per ciascun passo, nella tabella **(b)** i valori di recupero cumulativo. In grassetto i valori finali di recupero

(a)		BSAL		BCINN	
Passi	(mg	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)
CO₂)					
5550		15,0	0,44	10,0	0,090
5550		34,0	1,00	17,0	0,150
11100		25,0	0,37	16,0	0,069
22200		18,0	0,14	16,0	0,035
33300		12,0	0,060	15,0	0,022

(b)		BSAL	BCINN
Passi (mg CO₂)		Recupero (%)	Recupero (%)
5550		15,0	10,0
11100		50,0	27,0
22200		75,0	45,0
44400		90,0	60,0
77700		105	75,0

Tabella R17. Estrazione supercritica O2 di propoli solida (40 °C, 88 MPa, 0,40 g/mL per i tempi vedi Tabella M18). Recuperi percentuali degli esteri BSAL e BCINN determinati mediante HPLC ed efficienza del mezzo supercritico espresso in ng di estere estratto per mg di CO₂ passato. Nella tabella (a), i valori per ciascun passo, nella tabella (b) i valori di recupero cumulativo. In grassetto i valori finali di recupero

(a)		BSAL		BCINN	
Passi	(mg	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)	Recupero (%)	E (ng_{estr}/mgCO₂)
CO₂)					
5550		28,0	0,85	10,0	0,090
11100		45,0	0,65	21,0	0,093
22200		22,0	0,17	18,0	0,039
33300		11,0	0,055	13,0	0,020
44400		5,0	0,018	10,0	0,0100

(b)		BSAL	BCINN
Passi (mg CO₂)		Recupero (%)	Recupero (%)
5550		28,0	10,0
16650		70,0	31,0
38850		95,0	50,0
72150		105	60,0
116550		110	70,0

Tabella R18. Estrazione supercritica C1 di propoli solida (40 °C, 121 MPa, 0,40 g/mL per i tempi vedi Tabella M18). Recuperi percentuali degli esteri BSAL e BCINN determinati mediante HPLC ed efficienza del mezzo supercritico espresso in ng di estere estratto per mg di CO₂ passato. Nella tabella (a), i valori per ciascun passo, nella tabella (b) i valori di recupero cumulativo. In grassetto i valori finali di recupero

quantità estratta ad ogni passo. Le condizioni di estrazione sono quelle in tabella **M17**, i tempi totali di estrazione, la massa trattata e la ripartizione dei tempi nei diversi passi sono riportati in tabella **M18**. I risultati nelle tabelle **R15**, **R16**, **R17** ed **R18**.

I dati dei recuperi percentuali riportati nelle tabelle **R15 (b)**, **R16 (b)**, **R17 (b)** ed **R18 (b)** sono stati riportati in grafico (figura **R31**). I valori di velocità (efficienza) di estrazione riportati nelle tabelle **R15 (a)**, **R16 (a)**, **R17 (a)** ed **R18 (a)** sono stati riportati in figura **R32** per BSAL e in figura **R33** per BCINN, e mostrano che l'efficienza del CO₂ supercritico nell'estrarre gli esteri diminuisce nel tempo secondo un comportamento che sembra esponenziale. Il primo punto di ogni grafico, però, è anomalo rispetto a tale modello di comportamento. E' possibile che si tratti di un effetto di permeabilità della matrice, che ritarda l'avvio del processo di estrazione.

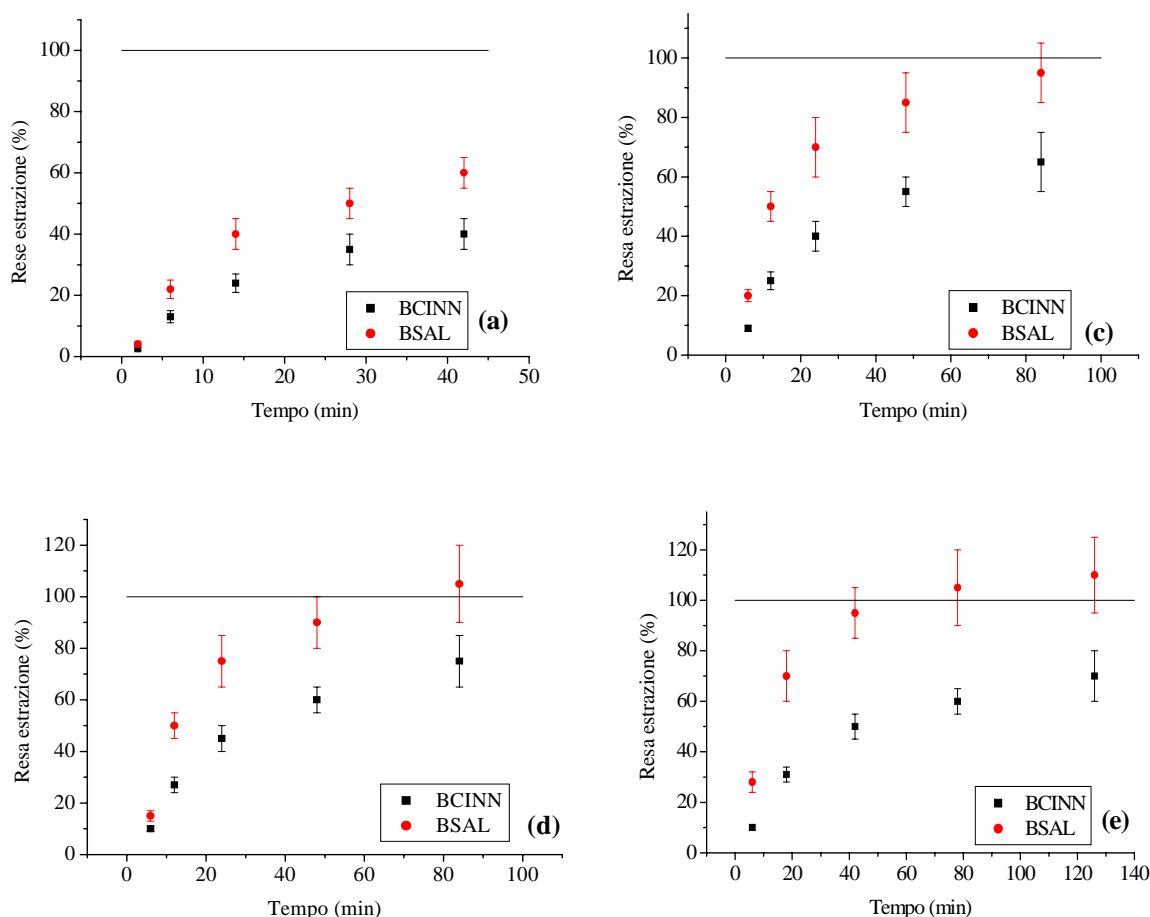


Figura R31. Grafici dei recuperi percentuali totali dei due esteri BSAL e BCINN nelle misure in funzione del tempo: (a) Q1, da valori in tabella 15 (b); (c) O1 da valori in tabella 16 (b); (d) O2 da valori in tabella 17 (b); (e) C1 da valori in tabella 18 (b).

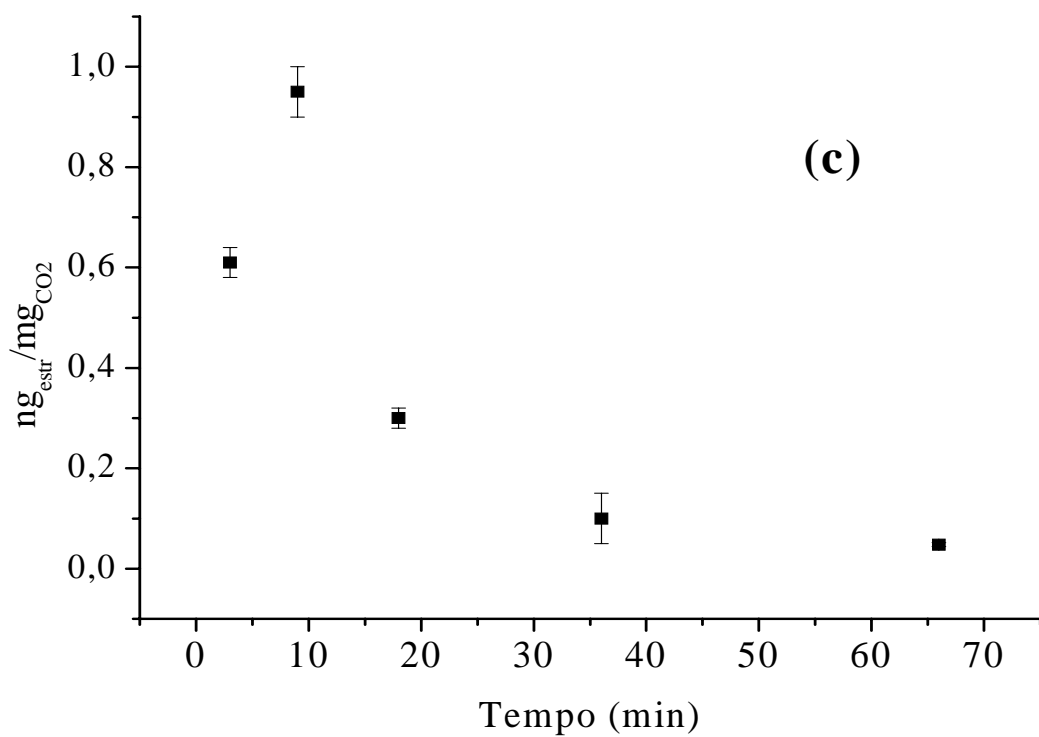
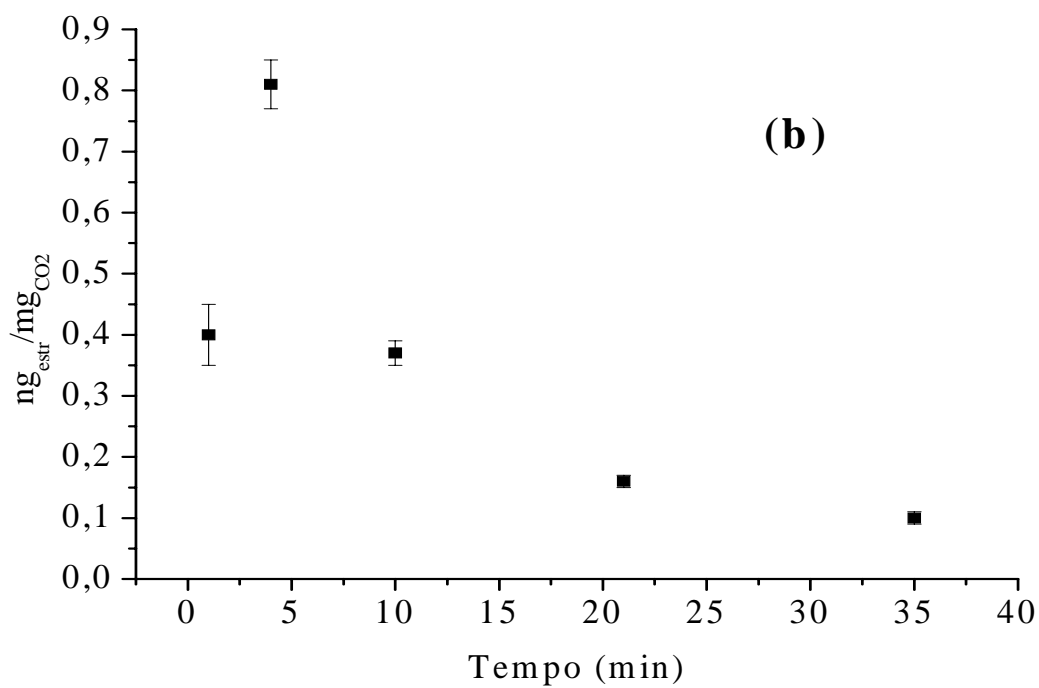


Figura R32. Grafici dei dati di efficienza di estrazione di BSAL in funzione del tempo: (b) Q1, da valori in tabella 15 (a); (c) O1 da valori in tabella 16 (a).

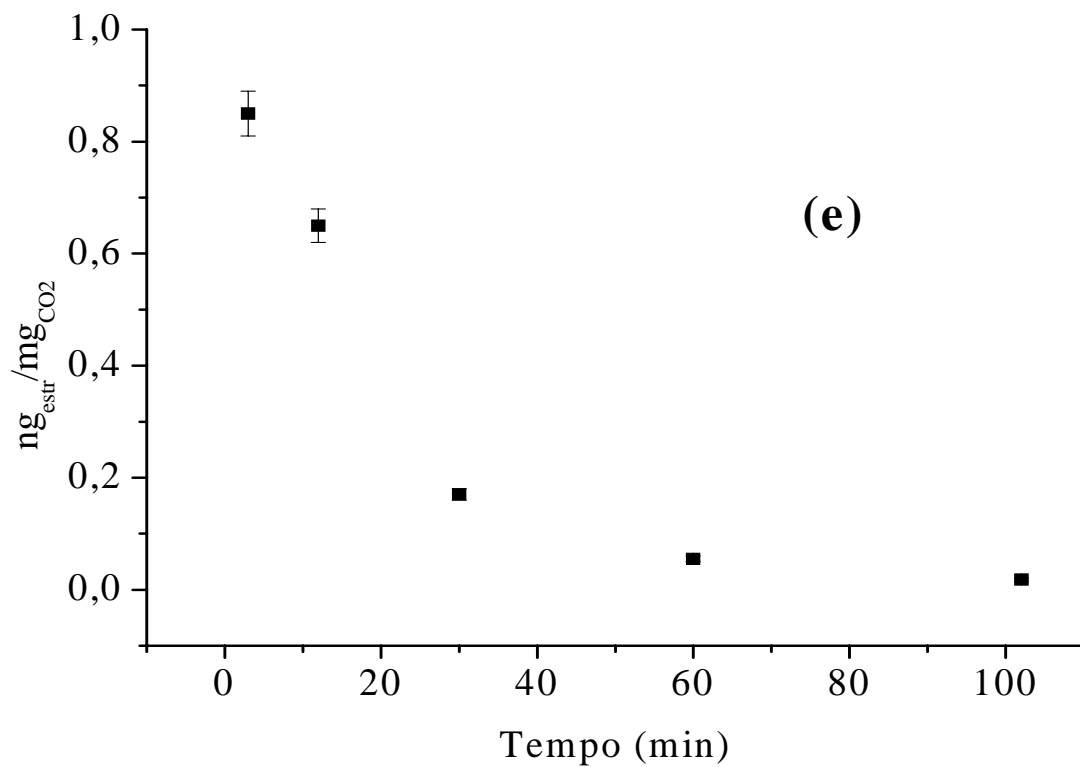
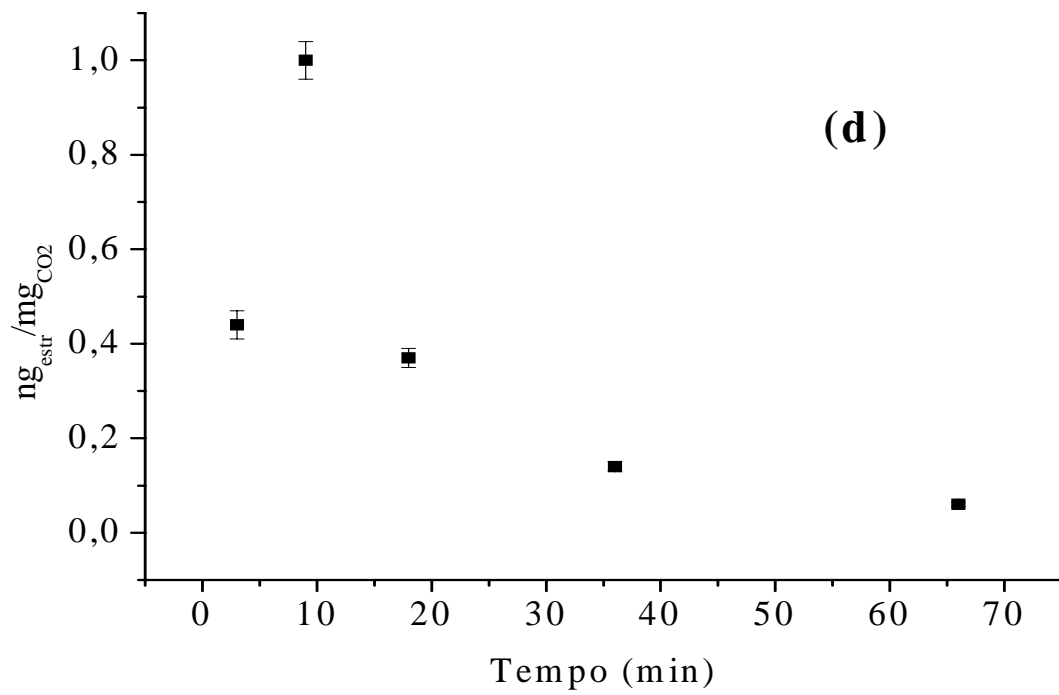


Figura R32 .Continua da pag. Grafici dei dati di efficienza di estrazione di BSAL in funzione del tempo: (d) O2 da valori in tabella 17 (a); (e) C1 da valori in tabella 18 (a).

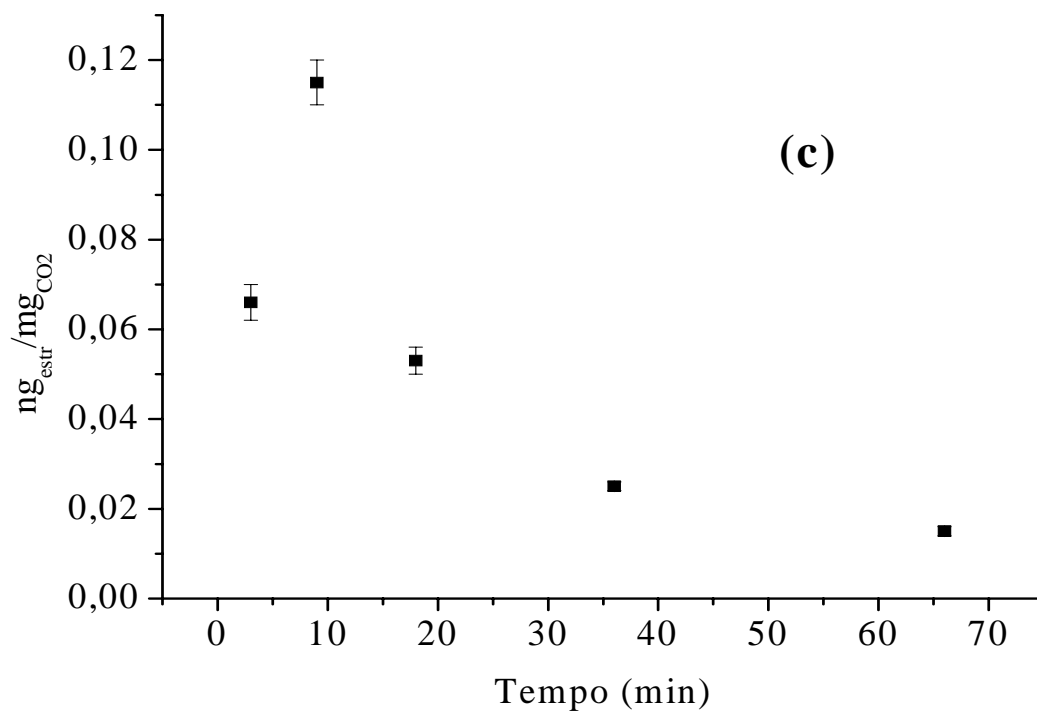
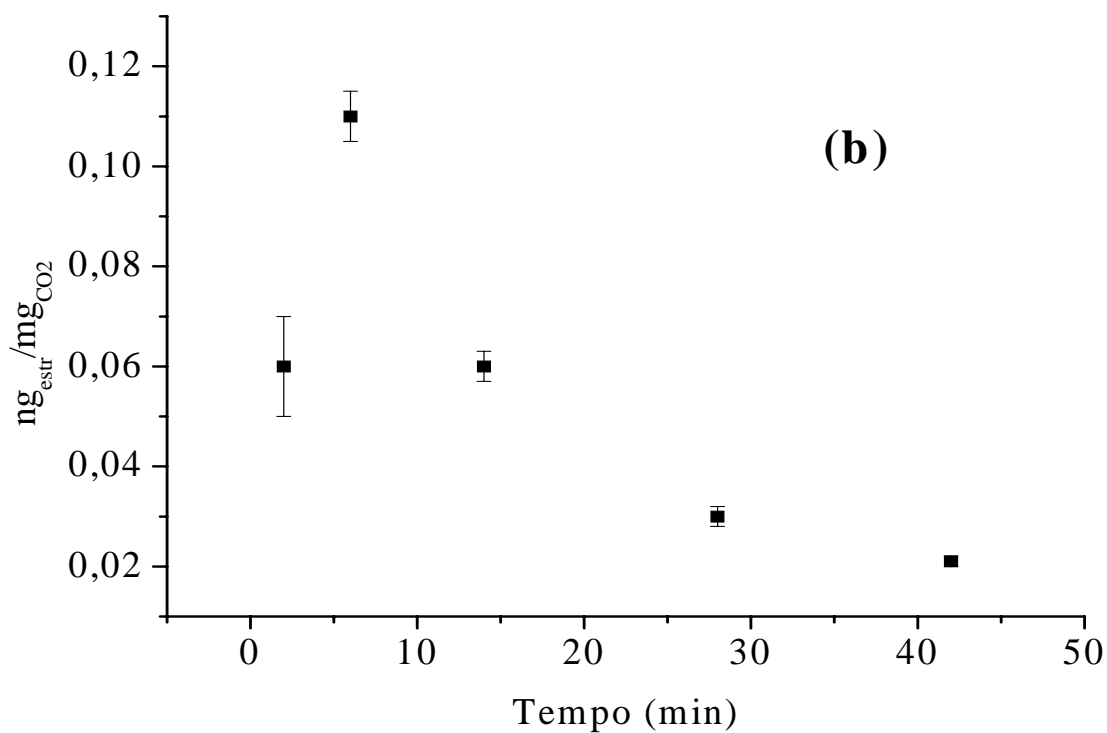


Figura R33. Grafici dei dati di efficienza di estrazione di BCINN in funzione del tempo: (b) Q1, da valori in tabella 15 (a); (c) O1 da valori in tabella 16 (a).

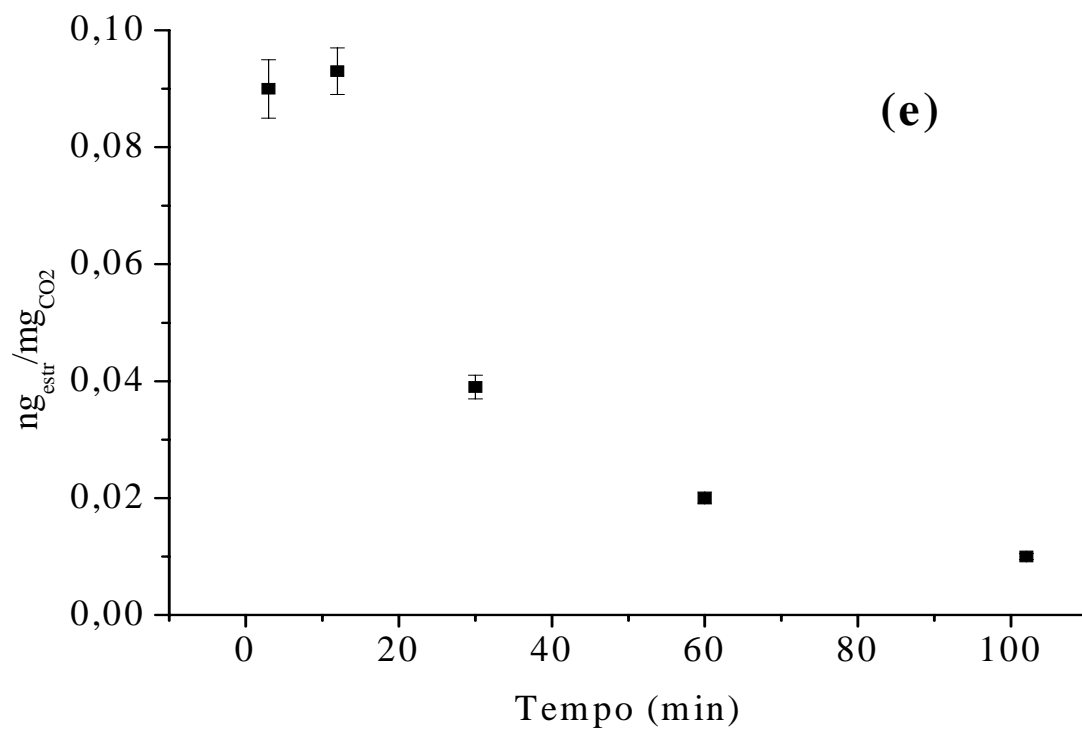
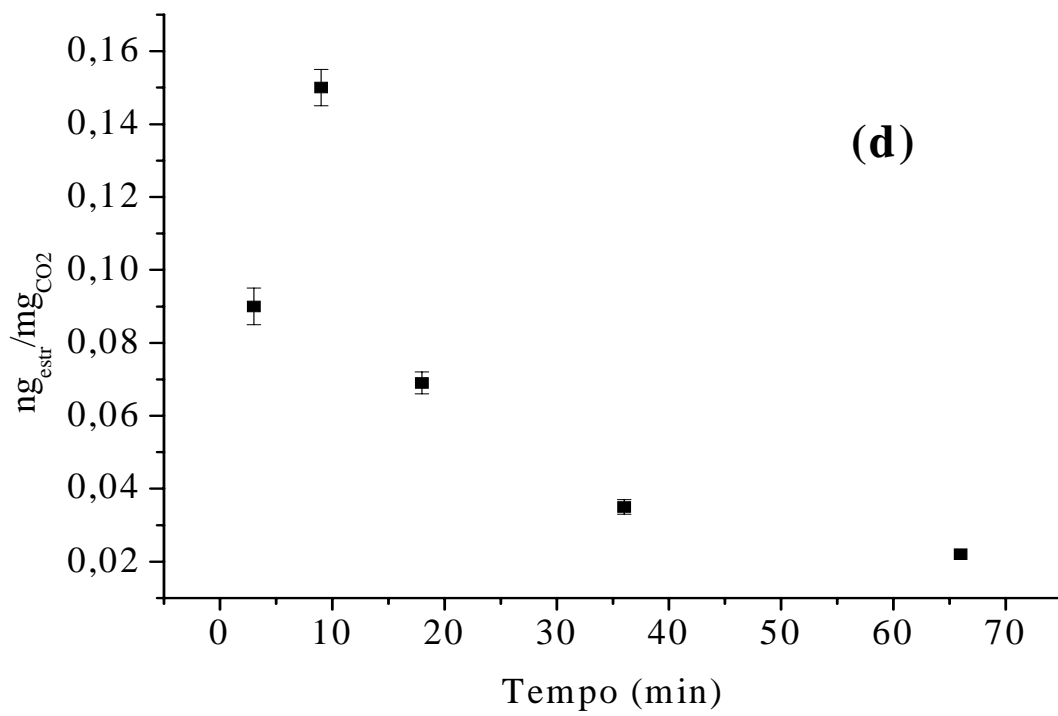


Figura R33. Continua da pag. Grafici dei dati di efficienza di estrazione di BCINN in funzione del tempo: (b) (d) O2 da valori in tabella 17 (a); (e) C1 da valori in tabella 18 (a).

Le curve di efficienza in funzione del tempo sono state interpolate con una funzione del tipo $E(t) = E_0 \cdot \exp(-kt)$ su quattro punti (figure **R32** ed **R33**), escludendo il primo. I risultati ottenuti sono stati riportati in tabella **R19**.

	BSAL		BCINN	
	E₀ (ng_{estr}/mg_{CO2})	k (min⁻¹)	E₀ (ng_{estr}/mg_{CO2})	k (min⁻¹)
Q1	1,28	0,0800	0,151	0,0579
O1	2,76	0,0894	0,199	0,0486
O2	3,86	0,108	0,250	0,0461
C1	1,69	0,0531	0,154	0,0293
Media	2,40	0,0825	0,189	0,0455
RSD	48	27	43	26

*Tabella R19. Parametri ottenuti dalla interpolazione con curva esponenziale $E(t) = E_0 \cdot \exp(-kt)$ i valori delle efficienze di estrazione del CO₂ supercritico nei confronti degli esteri, riportate nelle tabelle **R15 (b)**, **R16 (b)**, **R17 (b)** ed **R18 (b)** e riportati in grafico nelle figure **R32** ed **R33**. Interpolazione condotta su quattro punti, con l'esclusione del primo punto di ogni prova*

L'analisi dei dati ottenuti da queste misure permette di evidenziare quanto segue:

- il BSAL è recuperato quantitativamente, ma solo per tempi lunghi di trattamento;
- non è possibile, nell'arco di tempo usato nelle prove descritte, allontanare quantitativamente il BCINN dalla matrice, il valore massimo che si riesce a raggiungere è circa 75 %. Questo dato conferma l'effetto matrice su BCINN già descritto al punto precedente (Ris., **3.2**);
- è possibile interpolare le curve di velocità mediante curve esponenziali $E(t) = E_0 \cdot \exp(-kt)$, valutando sia una velocità iniziale E_0 sia una costante di tempo k . La velocità iniziale è un valore che non è mai raggiunto, perché i dati mostrano che all'inizio del processo l'estrazione è molto più lenta del previsto, probabilmente per un problema di diffusione del mezzo supercritico nella matrice. La velocità massima reale si raggiunge invece dopo un certo numero di minuti, ed è soltanto una frazione di quella calcolata dall'interpolazione;
- le interpolazioni possono permettere di valutare i tempi necessari per l'estrazione quantitativa di BCINN. Per esempio, nella cinetica C1, la velocità in un altro step da

48 minuti si ridurrebbe a circa il 20 % di quella dello step precedente di uguale durata, e quindi andrebbe ad estrarre un altro 2 % del totale di BCINN massimo. Negli step successivi, la velocità si ridurrebbe ulteriormente, e quindi la rimozione quantitativa di questo estere dalla propoli sembra problematica in tempi di processo ragionevoli.

4. Trattamento con fase oleosa

Al fine di andare incontro alle esigenze dell'ambiente agricolo, caratterizzato da un basso contenuto tecnologico, è stato messo a punto un metodo alternativo al processo proposto, basato sull'uso del CO₂ supercritico. Questo mezzo è basato sul trattamento degli EEP con una fase basata su di un olio alimentare. Questo mezzo di trattamento si presentava particolarmente adatto agli scopi del presente lavoro, per i seguenti motivi:

- l'immiscibilità con le fasi idroalcoliche, che rendeva la parte oleosa facilmente separabile dalle soluzioni di propoli trattate alla fine del processo;
- la possibile maggiore selettività nei confronti degli esteri da allontanare, BSAL e BCINN, rispetto alle altre componenti attive della propoli, flavonoidi e polifenoli. Questi ultimi sono infatti molto polari, ricchi di funzionalità ossidriliche e carboniliche, e sembrava quindi ragionevole che avessero un'affinità molto minore per una fase oleosa rispetto ad esteri di bassa polarità;
- l'olio di semi, proprio perché destinato all'uso alimentare, è un prodotto naturale, che non trasferisce sostanze estranee e/o potenzialmente tossiche nella soluzione trattata di propoli.

La difficoltà di separare una fase completamente oleosa (e quindi liquida) dall'idroalcolica ha spinto ad usare una miscela di cera d'api e olio di semi di mais. La miscela ottenuta con l'aggiunta anche solo di piccole percentuali di cera d'api all'olio di mais era solida a temperatura ambiente, ma mostrava un comportamento tixotropico: si sfaldava sotto l'azione dell'agitatore (Parte sper., 7.2) e permetteva una completa miscelazione delle fasi coinvolte nel trattamento, ma rimaneva compatta a riposo, permettendo di separare la soprastante fase idroalcolica per semplice decantazione. La fase usata nel trattamento aveva un contenuto di cera d'api pari al 2,5 % in peso.

Prove di centrifugazione di miscele ottenute dal trattamento con la fase oleosa di idroalcoliche contenenti diversi rapporti di EtOH/H₂O hanno evidenziato che, a percentuali elevate di contenuto di acqua, la fase idroalcolica aveva una densità superiore a quella della fase oleosa, e quindi sedimentava sul fondo della provetta. Questa separazione era sfavorevole, perché non avrebbe permesso di isolare facilmente la fase idroalcolica per la successiva caratterizzazione. Questo comportamento si manifesta per percentuali di acqua nell'idroalcolica superiore al 40 %. Usando miscele idroalcoliche con contenuto di acqua non superiore al 35 %, per centrifugazione la miscela risultante dal trattamento si separava in tre strati distinti (vedi figura **R34**, **R35** ed **R36**), e la fase idroalcolica era la soprastante; alle condizioni di centrifugazione possibili nel laboratorio, pari a 4000 rpm massimo, la separazione tra le fasi non era perfetta, e la fase idroalcolica separata era parzialmente emulsionata (Figura **R36**).

Sono state trattate soluzioni idroalcoliche di BSAL e BCINN (250 e 50 µg rispettivamente) a diverso contenuto percentuale di etanolo. Sono state quindi misurate le quantità residue nell'idroalcolica mediante spettrofotometria (Appendice **1**, **3.2**). Il grafico (vedi figura **R37**) mostra che il residuo degli esteri nell'idroalcolica aumenta all'aumentare della percentuale di etanolo. La scelta dell'idroalcolica da usare è stata fatta tenendo presente il vincolo posto della possibilità di separare la fase idroalcolica dopo la centrifugazione (vedi punto). Per le prove di trattamento della propoli è stata perciò scelta la miscela 65/35 EtOH/H₂O.

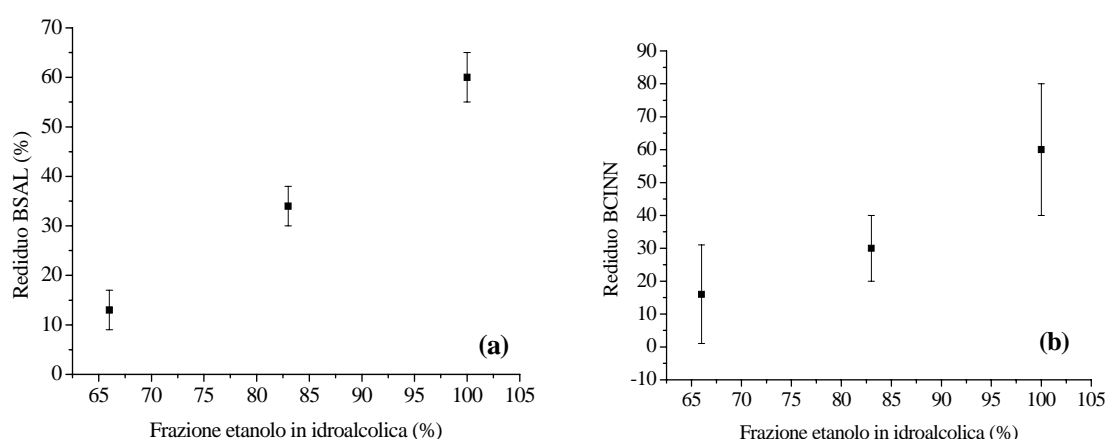


Figura R37. Valori dei residui percentuali di (a) BSAL e (b) BCINN (250 e 50 µg trattati rispettivamente) in EtOH/H₂O dopo trattamento con fase oleosa in funzione della composizione percentuale della fase idroalcolica come percentuale di etanolo. Valori determinati mediante spettrofotometria a 277 e 305 nm (Appendice **1**, **3.2**)

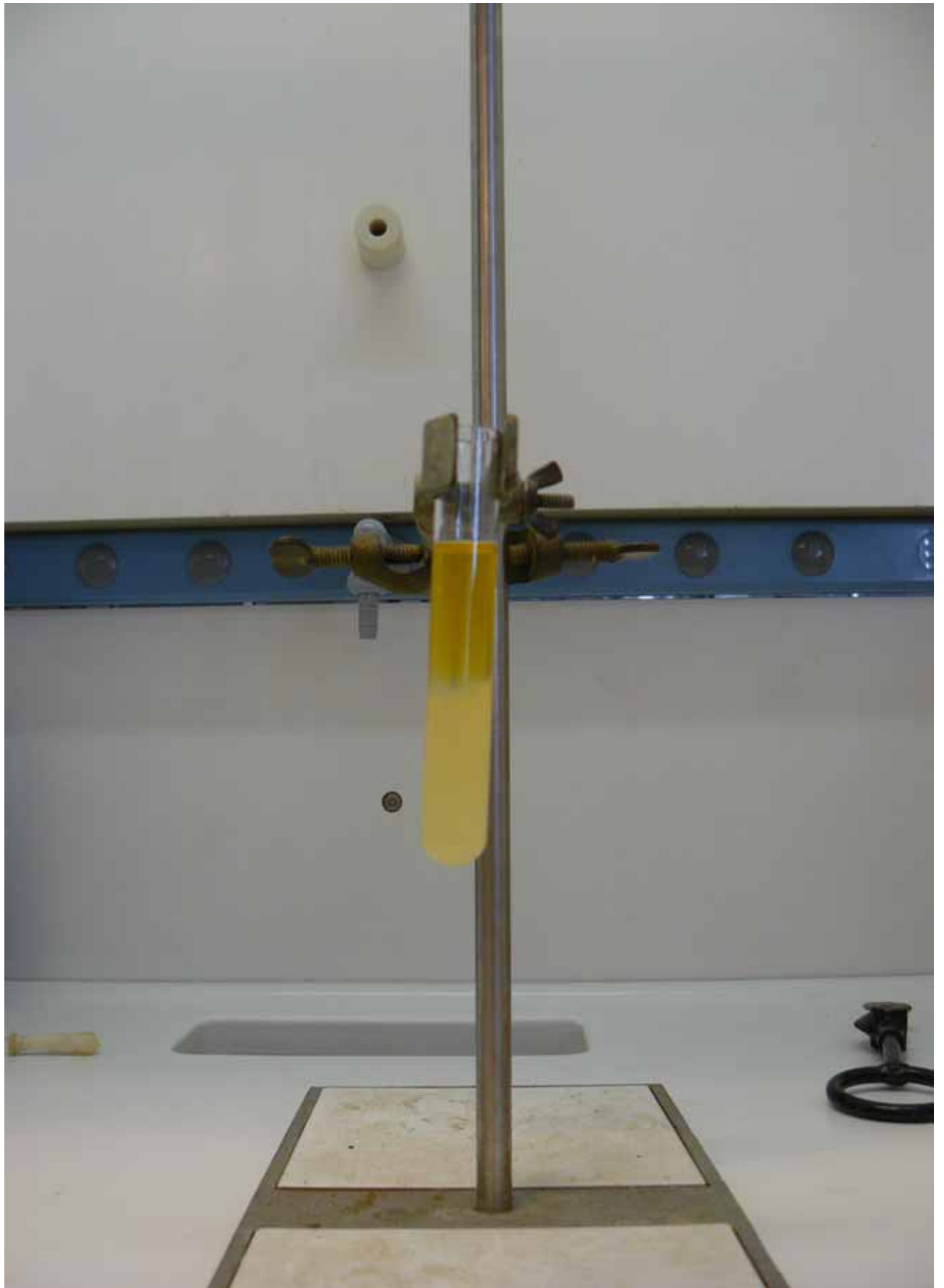


Figura R34. Soluzione idroalcolica di propoli e fase cerosa prima di effettuare il trattamento



Figura R35. Soluzione idroalcolica di propoli e fase cerosa miscelate dopo il trattamento

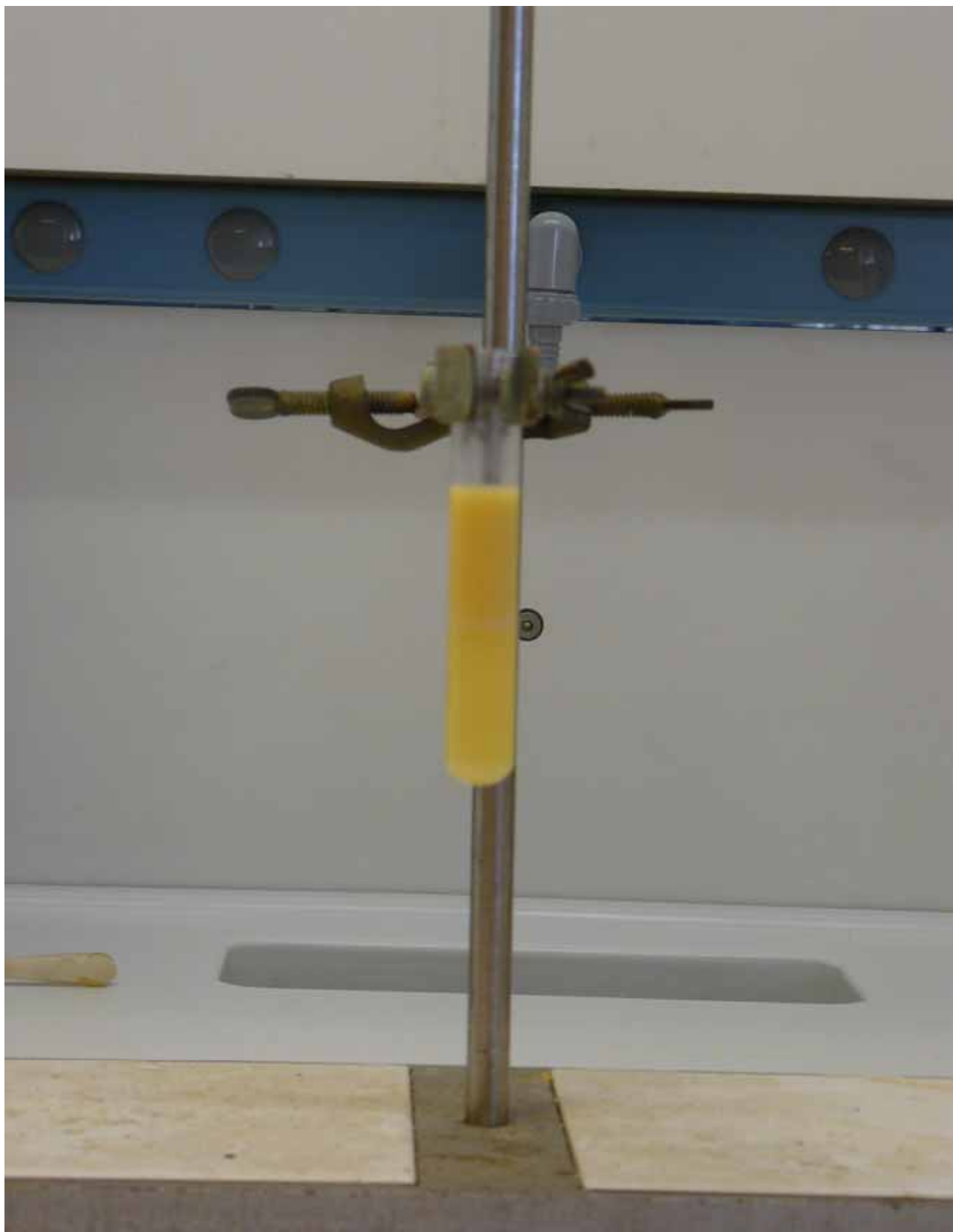


Figura R36. Separazione delle fasi soluzione idroalcolica di propoli e fase cerosa dopo il trattamento. E' possibile vedere la formazione di tre fasi: la soprastante idroalcolica, la sottostante cerosa e una fase intermedia, bianca, più compatta

Per le prove di trattamento con gli EEP, si procedeva come segue. In una provetta da centrifuga, 3,2 mL di EEP a 5000 ppm venivano diluiti con 1,8 mL di acqua e trattati in bagno ad ultrasuoni con 4,3 g (\pm 0,4, media e SD rispettivamente, su venti prove) di miscela dell'olio con 2,5 % di cera d'api (figura **M17**). Sono stati trattati gli EEP delle propoli A1, T1, T2, L2 ed L3, ed inoltre gli EEP della propoli **A1** sono state trattate tre volte (nel grafico, 1A1, 2A1 e 3A1). Le soluzioni idroalcoliche provenienti dal trattamento erano decantate in matracci da 10 mL, e portati a volume con etanolo, quindi diluite in una miscela H₂O/ACN 4/1, acidificata con 0,1 % di acido formico. Un bianco è stato preparato per trattamento di 3,2 mL di etanolo assoluto. Sono state analizzate con lo schema analitico usato per la caratterizzazione delle propoli raccolte nell'autunno 2007 (Figura **M15**) sia le soluzioni tal quali (da trattare) sia quelle trattate. Tutti i valori di concentrazione sono stati riportati come percentuale sul solido rispetto alle concentrazioni determinate per i campioni non trattati (Tabella **R20**), cioè la percentuale di ciascuna specie che rimane nella soluzione idroalcolica dopo il trattamento.

Specie	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3	Media	SD
A. caffeico	79,4	96,3	116	70,5	72,2	80,8	66,0	83,0	17,7
A. p-cumarico	70,5	94,3	96,3	64,8	63,4	67,8	64,0	74,4	14,5
Acido ferulico	40,3	60,2	48,6	62,8	53,7	73,9	63,0	57,5	11,0
Quercetina	35,0	85,9	103	7,04	84,2	53,3	ND	61,4	36,2
Apigenina	45,5	70,5	81,7	13,0	44,9	45,4	55,6	50,9	21,9
Kaempferolo	30,3	81,0	91,7	ND	32,2	32,7	62,3	55,0	27,2
Crisina	13,4	26,7	80,5	9,47	23,9	20,5	30,0	29,2	23,8
BSAL	10,7	11,3	16,9	6,66	11,0	2,98	5,53	9,30	4,61
BCINN	2,15	5,52	10,4	2,24	3,95	1,47	1,29	3,85	3,25

Tabella R20. *Quantità residue nella soluzione idroalcolica di ciascuna specie in ciascun campione trattato, espresse in percentuale rispetto al valore nel campione tal quale non trattato (quantità di riferimento in tabella **R12**). Tutti i valori determinati mediante HPLC come da schema analitico riportato in **Figura M15**, a meno di BSAL e BCINN che sono stati determinati mediante GC-MS sempre secondo lo stesso schema. Quantità trattata, 3,2 mL di EEP a 5000 ppm diluiti con 1,8 mL di acqua, soluzione finale a 10 mL*

I valori medi sono stati riportati in funzione del loro tempo di ritenzione sulla colonna C18 usata per l'analisi (figura **R38**). E' possibile notare come ci sia una buona correlazione tra i due valori. Questo risultato indica che i valori del K_D di ciascuna specie tra la fase mobile della colonna e la fase fissa C18 da una parte, e i valori di K_D per la ripartizione tra la fase idroalcolica e la fase oleosa usati nel nostro trattamento, sono correlati. E' un risultato che ha

una importante applicazione pratica: rende possibile stimare i residui di specie attraverso la misura del tempo di ritenzione sulla colonna Pursuit XR_s C18, piuttosto che attraverso la più complessa procedura di trattamento ed analisi descritta.

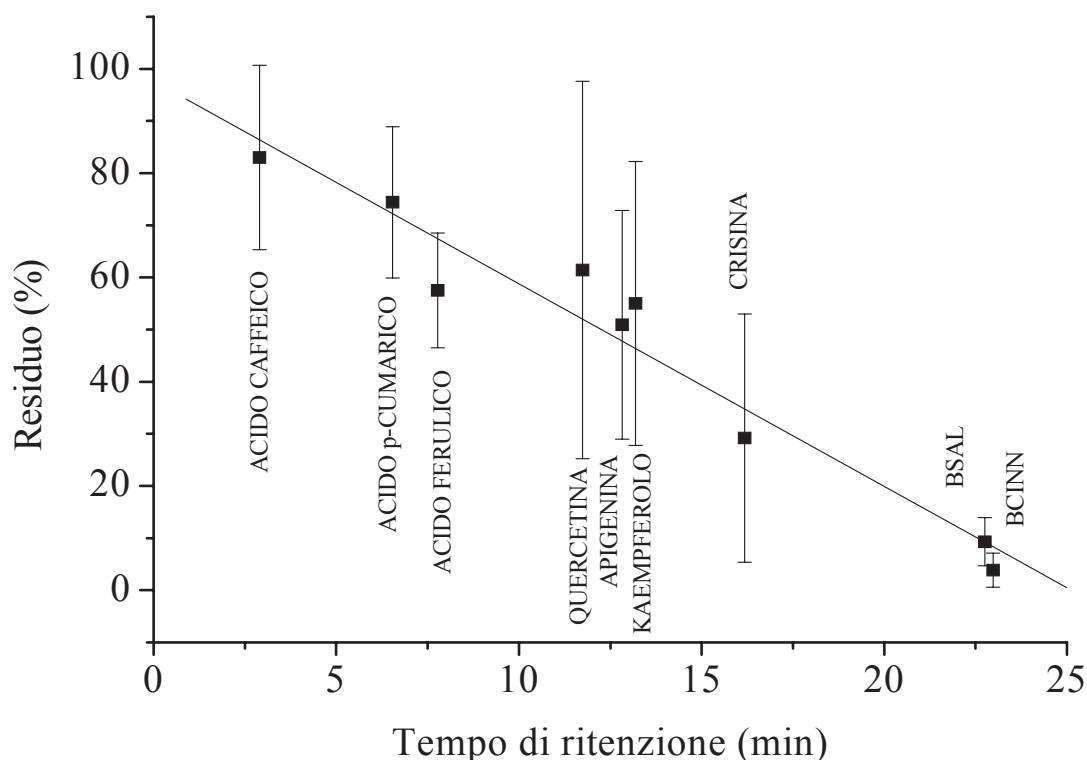


Figura R40. Correlazione tra i valori medi di residuo nella idroalcolica dopo trattamento con fase oleosa (vedi tabella R20) e i tempi di ritenzione nel gradiente analitico G2 su colonna Pursuit XR_s C18 (Tabella M12); valori di interpolazione $I = 97,7 \pm 5,2$, $P = 3,89 \pm 0,36 \text{ min}^{-1}$.

I residui di pinocembrina e CAPE, estrapolati dalla retta, dovrebbero essere dell'ordine del **33 %** circa. L'analisi dei cromatogrammi, registrati da Park [80] su colonna C18 e con un gradiente molto simile a quello usato nella presente sperimentazione (figura R12), mostra la presenza del picco del prenil caffeato tra i picchi di pinocembrina e crisina. Il fatto che queste due specie abbiano un ordine di uscita inverso rispetto a quella registrata con la nostra colonna indica come sia sempre difficile confrontare direttamente cromatogrammi registrati con fasi fisse diverse. Però, il cromatogramma di Park mostra all'incirca lo stesso ordine di uscita, con lo stesso tipo di organizzazione dei picchi che è registrato nella presente sperimentazione: acidi cinnamici a bassi tempi di ritenzione, apigenina e kaempferolo a tempi intermedi, crisina e galangina a tempi più lunghi. E' allora possibile immaginare che il prenil

caffeeato possa avere sulla nostra colonna un tempo di ritenzione intermedio tra la crisina e la pinocembrina, e che questa specie lasci perciò un residuo di circa il **34 %** nella idroalcolica trattata.

Dai dati raccolti in questa sperimentazione, si può dunque concludere quanto segue:

- i valori dei residui presentano una elevata deviazione standard. Questo elevato scattering dei valori è probabilmente dovuto alla difficoltà di separare correttamente le due fasi con il tipo di centrifuga disponibile in laboratorio;
- il processo risulta molto efficace nell'allontanare BSAL e BCINN dall'idroalcolica;
- la percentuale del residuo di altri allergeni, CAPE ed isomeri del prenil caffeeato, è soltanto stimabile, ma dovrebbe essere comunque bassa e dell'ordine del **33 %**. Tale valore è comunque molto simile a quello di alcuni flavonoidi, come per esempio la crisina.

L'analisi dei dati cromatografici ha chiarito il meccanismo di funzionamento del processo. E' difficile però valutare da tali valori se la soluzione etanolica di propoli risultante dal trattamento abbia o meno proprietà accettabili. Questo è molto importante, perché è stato discusso ampiamente nell'introduzione come le proprietà collettive della propoli siano più importanti di quelle di ciascun suo componente. Si è deciso perciò di caratterizzare le soluzioni provenienti dal trattamento mediante le prove spettrofotometriche mirate a determinare flavoni e flavonoli totali, flavanoni e diidroflavonoli totali, fenoli totali e potere antiossidante (Parte sper., **6.1.2; 6.1.3**).

Per i flavoni e flavonoli, 240 µL di soluzione trattata in matraccio da 10 mL; per i flavanoni e diidroflavonoli, 150 µL di soluzione trattata in matraccio da 10 mL; per i fenoli totali, 120 µL di soluzione trattata, pari a circa 250 µg di propoli, in matraccio da 25 mL; per il potere antiossidante 15-30 µL di soluzione trattata. Tutti i bianchi con eguale quantità di idroalcolica. Tutte le correlazioni quantitative sono state fatte mediante le rette di calibrazione (Parte sper., **6.1.2**; Appendice **1**, tabella **A182**). I valori analitici determinati sono stati usati per calcolare il valore di concentrazione nella propoli solida e di un valore di PO riferito alla quantità di propoli processata. I valori così calcolati sono stati riportati in tabella **R21** come valore percentuale rispetto al valore determinato per le propoli solide tal quali.

Campione	Flavoni e flavonoli (%)	Fenoli totali (%)	Flavanoni e diidroflavonoli (%)	Potere antiossidante (%)
1A1	21,1	19,6	13,0	39,2
2A1	46,1	35,5	31,6	63,1
3A1	47,9	39,7	39,2	61,3
T1	11,8	13,8	16,1	31,0
T2	56,0	38,4	79,5	51,6
L2	26,0	24,9	16,9	43,8
L3	81,2	68,9	30,3	39,2
Media	41,4	34,4	32,4	48,3
SD	23,8	18,1	22,9	12,7

Tabella R21. Valore percentuale del residuo di classi di composti e potere antiossidante in idroalcolica dopo trattamento con fase oleosa, calcolati come il rapporto tra i valori determinati per le soluzioni risultanti dal trattamento con olio e quelli negli EEP tal quali (Tabella R13). Le determinazioni sui campioni trattati sono state condotte come spiegato (Parte sper., 6.1.2; 6.1.3). Per i flavoni e flavonoli, 240 μ L di soluzione trattata in matraccio da 10 mL; per i flavanoni e diidroflavonoli, 150 μ L di soluzione trattata in matraccio da 10 mL; per i fenoli totali, 120 μ L di soluzione trattata in matraccio da 25 mL, pari a circa 250 μ g di propoli; per il potere antiossidante 15-30 μ L di soluzione trattata. Tutti i bianchi con eguale quantità di idroalcolica.

E' possibile fare le seguenti considerazioni:

- il potere antiossidante, l'unica quantità misurata direttamente relazionabile alle proprietà benefiche della propoli, rimane comunque la metà di quella originaria. Questo valore è intermedio e sembrerebbe indicare che tutte le specie danno un contributo a questa proprietà, sia le più idrofile che rimangono nell'idroalcolica, sia quelle più lipofile, che sono rimosse con elevate percentuali;
- la quantità residua nell'idroalcolica di flavoni e flavonoli è pari a circa al 40 %, ed è quindi piuttosto vicina a quella stimabile per la galangina dalla retta ($t_{rit} = 18,70$ min) in figura R40, pari al 32 % circa, e di quella della crisina, che abbiamo misurato pari al 30 %. La quantità superiore di residuo proviene da altri componenti presenti in quantità minori come apigenina, quercetina e kaempferolo (vedi tabella R15). E' chiaro comunque che il calo di concentrazione globale nella soluzione dopo il trattamento proposto dipende dal comportamento relativamente lipofilo dei due componenti principali;

- la quantità media residua di flavanoli e diidroflavanoni coincide con quella attesa e determinata dalla retta in figura **R40** per la pinocembrina, che dovrebbe essere nelle propoli di pioppo la specie più importante in questa classe di composti (Popova et al., **2004**). La misura confermerebbe il dato di letteratura, tuttavia abbiamo già notato come il contenuto della pinocembrina nei campioni determinato cromatograficamente sia decisamente inferiore al valore determinato per i flavonoli e diidroflavanoni totali. Il dato qui riportato indica che comunque tali specie si comportano come la pinocembrina nel trattamento con olio;
- il valore dei fenoli totali residui nelle idroalcoliche è sempre molto simile al valore atteso per galangina e per gli altri flavonoidi che escono a lunghi tempi di ritenzione. Anche questo dato sembra confermare l'osservazione di letteratura che i flavonoidi sono anche i principali fenoli contenuti nella propoli di pioppo [38].

Il trattamento proposto mostra aspetti positivi e negativi. Le specie allergeniche a bassissima polarità come BSAL e BCINN sono rimosse in proporzioni molto più elevate rispetto a tutte le altre specie, ed è possibile stimare che anche altri allergeni, come i caffeati, siano rimossi in proporzioni importanti, anche se comparabili con altre specie benefiche come crisina e galangina. Tuttavia, il metodo sembra soffrire del fatto che alcune delle specie responsabili delle proprietà della propoli di pioppo, soprattutto i flavonoidi crisina, galangina e pinocembrina, insieme con altre specie che non siamo stati in grado di determinare, hanno a loro volta mostrato una notevole lipofilia ed affinità per la fase oleosa, e sono quindi allontanate in importanti proporzioni. Inoltre, per poter più precisamente caratterizzare il metodo, rimangono diverse misure ancora da eseguire:

- la determinazione della quantità residua di caffeati permetterebbe di confermare il dato stimato dalla retta dei residui in funzione dei tempi di ritenzione (figura **R40**);
- mentre la quantità di allergeni rimossa sembrerebbe importante, test biologici sono necessari per convalidare la reale perdita di potere allergizzante;
- l'ingegnerizzazione del processo, soprattutto attraverso l'individuazione delle condizioni di centrifugazione adeguate a separare completamente le fasi, permetterebbe di ottenere dati più precisi.

Capitolo 4 Discussione dei risultati

L'analisi quantitativa delle specie preponderanti della propoli di pioppo, acidi cinnamici e flavonoidi, è stata condotta seguendo le indicazioni riportate in letteratura: eluizione HPLC in gradiente degli EEP diluiti in un solvente isotonico con quello di eluizione (Parte sper., **2.2.4**) [44; 47; 81]. L'assegnazione dei picchi è stata condotta preliminarmente mediante coiniezione con standard puri (Parte sper., **2.2.4**), e confermata mediante un'analisi statistica basata sul confronto dei rapporti di intensità dei picchi misurati a diversa lunghezza d'onda (Appendice 4). La coiniezione ha evidenziato che CAPE e pinocembrina coeluiscono. L'analisi statistica con il test di normalità k-s ha permesso di mettere in evidenza che uno dei picchi assegnati con la coiniezione, quello della galangina, era troppo contaminato per poter essere assegnato con certezza, e quindi poter essere usato per l'analisi quantitativa (Appendice 4); ha inoltre evidenziato contaminazioni sui picchi del kaempferolo e della crisina, che però erano significative solo ad alcune lunghezze d'onda, e ha permesso perciò di individuare la lunghezza d'onda, tra le quattro usate nella rivelazione, alla quale si registra il segnale più adatto all'analisi quantitativa (Appendice 4). L'analisi statistica condotta è stata quindi decisiva nel confermare le assegnazioni e ha permesso di evitare errori nell'analisi quantitativa. Tuttavia l'assegnazione dei picchi ha messo in evidenza il limite di questo tipo di analisi HPLC: risulta, infatti, inadatta ad ottenere un profilo completo di tutte le componenti della propoli. Le specie rivelate sono troppo numerose per poter essere tutte risolte alla linea di base, per cui molte specie coeluiscono ed alcuni picchi non sono quindi assegnabili né utili per l'analisi quantitativa. La colonna Varian Pursuit XRs C18 era stata scelta per l'analisi per due motivi: la fase C18 è quella più comunemente indicata in letteratura per l'analisi di estratti etanolici di propoli, e in particolare questo prodotto era indicato dal produttore come particolarmente adatta per la separazione di composti polari. Nonostante abbia mostrato un'ottima efficienza (circa 18.000 piatti), è risultata effettivamente capace di separare molto bene i composti più polari, gli acidi cinnamici, mentre le specie meno polari e più ritenute sono eluite in una finestra temporale piuttosto limitata con una risoluzione spesso insufficiente (figure **R23**, **R24**, **R25** ed **R26**). Una colonna meno ritentiva, per esempio una C8, potrebbe avere una selettività più adatta per la separazione della parte più lipofila della propoli.

I risultati della sperimentazione hanno indicato come, per la determinazione HPLC di componenti presenti in concentrazioni molto inferiori rispetto alle specie predominanti fosse

necessario un pretrattamento. Nei profili ottenuti per iniezione diretta degli EEP diluiti non è stato infatti possibile evidenziare la presenza di picchi attribuibili al BSAL, BCINN e all'acido salicilico. Poiché uno degli scopi della tesi era quello di verificare la possibilità di mettere a punto metodi specifici per la determinazione quantitativa di specie, presenti nella propoli in concentrazione molto inferiore rispetto ai composti più abbondanti, si è deciso di verificare se pretrattamenti mirati potessero permettere di determinare queste specie mediante HPLC e rivelazione UV. Il trattamento con cloroformio degli EEP sospesi in tampone fosfato (pH \approx 5) ha permesso di allontanare molte specie e concentrare l'acido salicilico dopo estrazione con acetato di etile (Ris., **2.1.3**). L'acido era effettivamente presente, anche se non rivelabile per semplice iniezione degli EEP diluiti, perché presente in quantità tali che con quella procedura la sua concentrazione analitica sarebbe al di sotto del LOD. La determinazione dell'acido salicilico e di altri acidi benzoici potrebbe essere importante in studi futuri, perché queste specie possono generarsi nelle soluzioni idroalcoliche di propoli da diversi processi chimici: ossidazione di alcuni flavonoidi [19] ed idrolisi di esteri (Stato dell'arte, **1**). L'esame dei profili HPLC delle soluzioni ottenute per purificazione su colonne SPE di silice ha evidenziato che tutte le specie a maggiore polarità (tempi di ritenzione bassi nel gradiente usato) erano state allontanate in maniera pressoché quantitativa. La successiva concentrazione ha permesso di evidenziare la presenza dei picchi di BSAL e BCINN, nonché di altri due picchi, che è stato possibile attribuire agli esteri FESAL e FECINN (Ris., **2.1.1.2**): tali esteri non erano mai stati trovati prima in campioni di propoli. Questi risultati hanno dimostrato che è possibile trattare gli EEP in modo da semplificare in maniera specifica i profili cromatografici e determinare componenti minoritarie che non possono altrimenti essere analizzate in HPLC, perché troppo diluite e/o coperte da altri picchi più intensi.

Il metodo per la determinazione di BSAL e BCINN mediante HPLC si è rivelato di utilità limitata per l'analisi quantitativa, con valori compresi tra il 50 % ed il 200% di quelli determinati mediante GC/MS per BSAL e tra l'80 % ed il 400 % per BCINN (Tabella **R11**). Questo problema sembra attribuibile alla scelta degli esteri esilici come standard interni. Tali standard interni interagivano probabilmente con la silice della colonna SPE in maniera diversa dagli esteri benzilici. E' anche possibile che la colonna di silice fosse sovraccaricata dalla propoli adsorbita, e che per questo la sua capacità ritentiva si alterasse in maniera non prevedibile. Quale che sia stata la causa, le correlazioni tra i recuperi degli esteri benzilici in funzione dei corrispondenti esteri esilici non è stata possibile. In futuro, sarà esaminata l'efficacia del 4-metil cinnamato di benzile come standard interno per il BCINN e del 3-metil

salicilato di benzile come standard interno per BSAL. E' stato invece possibile svolgere l'analisi quantitativa di BCINN e BSAL con il metodo GC-MS (Risultati **2.2.3**), che si è rivelato più efficace per due motivi: perché la preparazione del campione è più semplice, e non altera i rapporti tra gli esteri benzilici e gli standard interni; perché la rivelazione di massa in modalità SIM semplifica il profilo senza bisogno di altri pretrattamenti.

Il trattamento con olio di campioni di propoli è stato messo a punto immaginando che gli esteri BSAL e BCINN, a causa della loro bassa polarità, fossero ripartiti preferenzialmente in un estraente a base di olio di mais. I risultati hanno messo in evidenza che i due esteri allergenici BSAL e BCINN lasciano residui molto ridotti nella soluzione idroalcolica, inferiori a quelli di tutte le altre specie esaminate. I caffeati sono gli allergeni più importanti presenti nella propoli di pioppo, ed è stato possibile stimare che il residuo di questi esteri nella propoli trattata è dell'ordine di circa un terzo del totale di partenza (Ris., **4**). Il processo fornisce quindi una soluzione idroalcolica di propoli in cui più importanti allergeni sono in concentrazione molto inferiore rispetto a quella di partenza. I test spettrofotometrici per gruppi funzionali e le analisi HPLC mostrano tuttavia che la soluzione trattata è impoverita anche di molte componenti attive, e la quantità residua di alcuni dei più importanti flavonoidi nelle soluzioni trattate è pari a quella dei caffeati (Ris., **4**). Il processo sembra quindi promettente, ma altre prove saranno necessarie per verificare che la soluzione di propoli ottenuta abbia delle proprietà accettabili. Nell'ambito della presente sperimentazione è stata valutata la perdita di potere antiossidante, che in percentuale diminuisce meno della concentrazione dei flavonoidi e dei fenoli totali (Ris., **4**). Questa promettente indicazione dovrà essere completata dai risultati di prove di carattere non chimico, ma biologico e medico: capacità antibatterica, capacità residua di sensibilizzare e causare allergie. Questi test permetteranno di valutare se l'impoverimento delle componenti attive e la perdita di proprietà benefiche prevalgano rispetto alla perdita di potere allergizzante o viceversa. Inoltre, la valutazione dei risultati è stata resa difficoltosa dall'alta dispersione dei dati, che dipende probabilmente dall'imperfetta separazione delle fasi dopo il processo. La corretta messa a punto delle condizioni di centrifugazione dovrebbe permettere una buona separazione, e una più accurata valutazione dei risultati del processo.

Il trattamento con CO₂ supercritico è stato messo a punto immaginando che gli esteri BSAL e BCINN, a causa della loro bassa polarità, fossero estratti preferenzialmente da un mezzo supercritico a bassa densità rispetto a specie quali i fenoli e i flavonoidi. Il processo di

estrazione è stato condotto sia su propoli depositata da soluzione etanolica, sia su propoli solida (Ris., **3.2**). L'estrazione sul solido è risultata più selettiva, e questo è ovvio, dato che le specie depositate da soluzione etanolica sono certamente finemente suddivise, e le forze intermolecolari sono molto ridotte. La scelta di focalizzarsi sul trattamento del solido scaturisce quindi dalla maggiore selettività, ma è giustificata anche dalla logica di un eventuale futuro processo. Dissolvere la propoli in etanolo per poi allontanarlo prima del trattamento è un passaggio inutile, che aumenterebbe i costi senza portare benefici. Le estrazioni condotte hanno mostrato che è possibile allontanare quantitativamente BSAL dalla propoli solida, e che anche è possibile eliminare una frazione significativa di BCINN (Ris., **3.3**). L'estrazione dei caffeati non è stata rigorosamente valutata; tuttavia, alcuni calcoli svolti a posteriori indicano che la frazione di CAPE estratta nelle prove in funzione del tempo oscilla tra 1 e 2 % della quantità originale. Anche se la stima di questi valori fosse molto grossolana, la quantità di CAPE estratta risulterebbe certamente molto bassa. Questi risultati indicano che il processo supercritico è meno efficace rispetto a quello con fase oleosa. Il trattamento della propoli solida ha anche messo in evidenza che il mezzo supercritico ha bisogno di un tempo iniziale per diffondere nella matrice (Ris., **3.3**). Questo tempo è stato misurato nell'estrazione di quantità inferiori al mg di matrice, una quantità molto ridotta, che ha una superficie molto ampia rispetto al volume totale. Il trattamento di quantità maggiori di propoli, nello scale-up del processo, potrebbe amplificare il fenomeno. I campioni di propoli solida potrebbero quindi subire un trattamento non uniforme in tutte le sue parti, e in conseguenza di questo i tempi di processo potrebbero essere molto più lunghi di quanto valutato nelle prove in scala di laboratorio. L'eventuale ingegnerizzazione del processo dovrebbe certamente prendere in considerazione questo aspetto.

Sono stati stimati i costi dei due processi proposti, immaginando di trattare la propoli in lotti di 100 g. Per quanto riguarda il processo supercritico, poiché la quantità di propoli determinata occupa un volume di circa 40 mL, sarebbe necessario lavorare con un impianto con cella da 50 mL circa. Il costo di un impianto di tale capacità è stato stimato pari a circa € 17.000; il valore è stato calcolato secondo un algoritmo riportato in letteratura [94], e aggiornato al costo attuale della vita. Per il trattamento con olio, si lavorerebbe su 300-400 mL di soluzione etanolica con 400 g di olio in beker da 1000-1500 mL; gli apparati necessari sono un agitatore ad asta con motorino, un bagno ad ultrasuoni, ed una centrifuga di adeguata capacità. Il costo di queste apparecchiature è stimabile intorno ai € 10.000. Per quanto

riguarda i costi di esercizio, si sono considerati la potenza assorbita, il personale ed i materiali, con le seguenti ipotesi:

- per il trattamento con fase oleosa, la centrifuga assorbe 2 kW, l'agitatore 200 W e il bagno ad ultrasuoni 500 W; i tempi di lavorazione sono quelli trovati nelle prove preliminari di laboratorio; le quantità per il trattamento di 100 g di propoli è 400 g circa di fase oleosa; il tempo di lavorazione è 0,50 ore;
- per il trattamento supercritico, la potenza dell'impianto a CO₂ supercritico a cella da 50 mL è di circa 5 kW; i tempi di lavorazione sono quelli trovati in laboratorio, ma con un flusso quadruplo, cioè 4 mL/min per circa 300 g di CO₂ (Ris., 3.3); il tempo di lavorazione è 1,50 ore;
- il costo del kWh è di € 0,17;
- il personale ha un costo di € 4.000/mese al lordo;
- l'olio costa circa € 4 euro al litro all'acquisto e € 0,50 allo smaltimento (dal tariffario della regione Lombardia), il biossido di carbonio N20 ha un costo di 1,66 €/kg.

	Supercritico (€/hg)	Olio (€/hg)
Consumo energetico	1,20	0,06
Personale	40	13
Materiali	0,50	2,25
Totale	41,70	15,31

***Tabella D1.** Costi stimati per i processi di trattamento della propoli mediante biossido di carbonio supercritico e mediante fase oleosa, secondo le ipotesi riportate nel presente paragrafo, in euro per 100 g di propoli trattata*

E' possibile concludere quanto segue:

- la differenza dell'investimento iniziale è importante;
- nel campo delle ipotesi di costo di esercizio formulate, il costo del personale è preponderante, e poiché il processo supercritico è più lungo, esso risulta più costoso, e potrebbe diventarlo ancora di più, se nello scale-up emergesse la necessità di allungare ulteriormente i tempi del processo;
- nel caso del trattamento con olio, immaginiamo di ammortare la parte macchinari in quattro anni, con rate annuali quindi da € 2500/anno, ipotizziamo un surplus di guadagno di € 7 per confezione di 10 mL rispetto alla propoli non trattata, quindi per

totale di 40 confezioni per etto di propoli trattata per un surplus di guadagno di € 280 per etto di propoli trattata; la soluzione della disequazione $280*x > 2500 + 15,31*x$, dove x è il lotto da un etto da processare, è soddisfatta per $x > 10$. E' quindi necessario processare e commercializzare circa 1 kg di propoli per iniziare a guadagnare;

- la stessa disequazione impostata per il processo supercritico indica un processamento minimo di 1,8 kg per poter cominciare a guadagnare, quasi il doppio di quelli necessari per il trattamento con olio;

Concludendo, sulla base dei precedenti risultati, il processo basato sulla fase oleosa fornisce una propoli dove gli allergeni sono stati allontanati più efficacemente, e quindi questo processo sembra certamente da preferire rispetto a quello che impiega la CO₂ in fase supercritica.

Bibliografia

- [1] Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F.R., *Proceedings of the Royal Society London B*, **1987**, 232, 249-72
- [2] Ghisalberti E.L., *Bee World*, **1979** (2), 59-84
- [3] Hausen B.M., *Dermatitis*, **2005**, 16 (3), 127-129
- [4] Hausen B.M., Wollenweber E., Senff H., Post B., *Contact Dermatitis*, **1987**, 17, 163
- [5] Bonvehi J.S., Ventura Coll F., Escolà Jordà R., *JAOCS*, **1994**, 71 (5), 529-32
- [6] Burdock G.A., *Food and Chem. Toxic.*, **1998**, 36, 347-63
- [7] Kadota S., Banskota A.H., Tezuka Y., *Phytother. Res.*, **2001**, 15, 561-71
- [8] Marcucci M. C., *Apidologie*, **1995**, 26, 83-99
- [9] Bunney M.H., *Br. J. Derm.*, **1968**, 80, 17
- [10] Fernández S.G., Alemán E.A., Figueroa B.E.G., Fagoaga E.G., Rivera J.M.O., Purroy A.I.T., *Contact Dermatitis*, **2004**, 50, 320-2
- [11] Ginanneschi M., Acciai M.C., Sertoli A., Bracci S., *Contact Dermatitis*, **1989**, 21, 267-9
- [12] Giusti F., Miglietta R., Pepe P., Seidenari S., *Contact Dermatitis*, **2004**, 51, 255-8
- [13] Hausen B.M., Wollenweber E., Senff H., Post B., *Contact Dermatitis*, **1987 b**, 17, 170-7
- [14] Hausen B.M., Wollenweber E., *Contact Dermatitis*, **1988**, 19, 296-303
- [15] Menniti-Ippolito F., Mazzanti G., Vitalone A., Fiorenzuoli F., Santuccio C., *Drug Safety*, **2008**, 31 (5), 415-23
- [16] Tosti A., Caponeri G.M., Bardazzi F., Melino M., Veronesi S., *Contact Dermatitis*, **1985**, 12 (4), 227-8
- [17] Walgrave S.E., Warshaw E.M., Glesne L.A., *Dermatitis*, **2005**, 16 (4), 209-15
- [18] SCCNPF, Fragrance allergy in consumers, SCCNPF/0017/98 Final, December **1999**, EC, Bruxelles
- [19] Havsteen B.H., *Pharmacology & Therapeutics*, **2002**, 96, 67-202
- [20] Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 41, 1220-34
- [21] Cao Y.H., Wang Y., Yuan Q., *Chromatographia*, **2004**, 59 (1-2), 135-40
- [22] Dos Santos Pereira A., Pinto A.C., Cardoso J.N., de Aquino Neto F.R., de Souza Ramos M.F., Dellamora Ortiz G.M., Pereira dos Santos E., *J. High Resol. Chromatogr.*, **1998**, 21, 396-400
- [23] Medana C., Carbone F., Aigotti R., Appendino G., Baiocchi C., *Phytochem. Anal.*, **2008**, 19, 32-9

- [24] Pietta P.G., Gardana C., Pietta A.M., *Fitoterapia*, **2002**, 73 (Suppl. 1), S7-S20
- [25] Volpi N., *Electrophoresis*, **2004**, 25, 1872-78
- [26] Volpi N., Bergonzini G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 42, 354-61
- [27] Eberlin M.N., Sawaya A.C.H.F., Tomazela D.M., Cunha I.B.S., Bankova V.S., Marcucci M.C., Custodio A.R., *Analyst*, **2004**, 129, 739-44
- [28] Greenaway W., May J., Whatley F.R., *J. Chromat. A*, **1989**, 472, 393-400
- [29] Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F.R., *Bee World*, **1990**, 71 (3), 107-18
- [30] Greenaway W., May J., Scaysbrook T., Whatley F.R., *Z. Naturforsch.*, **1991**, 46C, 111-21
- [31] Mondello L., Sciarrone D., Casilli A., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30, 1905-11
- [32] Reverchon E., De Marco I., *J. Supercrit. Fluids*, **2006**, 38, 146-66
- [33] Hossain M.M., Atti della seconda conferenza GPE-EPIC, Venezia **2009**
- [34] Bianchi, E.M., *Apiacta*, **1995**, 56-62
- [35] Nikolaev A.B., in "La propolis", Ed. Apimondia, Bucarest **1975**, pagg. 8-10
- [36] Walker P., Crane E., *Apidologie*, **1987**, 18 (4), 327-34
- [37] Nagy M., Grancai D., *Pharmazie*, **1996**, 51 (2), 100-1
- [38] Popova M., Bankova V., Butovska D., Petkov V., Nikolova-Damyanova B., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Bogdanov S., *Phytochem. Anal.*, **2004**, 15, 235-40
- [39] Bonvehi J.S., Ventura Coll F. *Z. Naturforsch.*, **2000**, 55C, 778-84
- [40] Nucci R., Briante R., Febbraio F., *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 6975-81
- [41] Bankova V., *J. Ethnopharm.*, **2005**, 100, 114-17
- [42] Da Silva J.F.M., De Souza M.C., Matta S.R., De Andrade M.R., Vidal F.V.N., *Food Chem.*, **2006**, 99, 431-5
- [43] Hamasaka T., Kumazawa S., Fujimoto T., Nakayama T., *Food Sci. Technol. Res.*, **2004**, 10 (1), 86-92
- [44] Kumazawa S., Ahn M.R., Hamasaka T., Bang K.S., Nakayama T., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 7286-92
- [45] Kumazawa S., Ueda R., Hamasaka T., Fukumoto S., Fujimoto T., Nakayama T., *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 7722-25
- [46] Kumazawa S., Ahn R.M., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F., Nakayama T., *Food Chem.*, **2007 b**, 101, 1383-92
- [47] Park Y.K., Isla M.I., Paredes-Guzman J.F., Nieva Moreno M.I., Koo H., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 1166-72

- [48] Vattuone M.A., Moreno M.I.N., Isla M.I., Sampietro A.R., *J. Ethnopharm.*, **2000**, 71, 109-14
- [49] Kim K.M., Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim J.M., *LWT*, **2006**, 39, 756-61
- [50] Bankova V.S., De Castro S.L., Marcucci M.C., *Apidologie*, **2000**, 31, 3-15
- [51] Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Sforcin J.M., Frete X., Kujumgiev A., Maimoni Rodella R., Popov S., *Z.Naturforsch.*, **1998**, 54C, 401-5
- [52] Kadota S., Banskota A.H., Tezuka Y., Prasain J.K., Matsushige K., Saiki I., *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 890-900
- [53] Midorikawa K., Banskota A.H., Tezuka Y., Nagaoka T., Matsushige K., Message D., Huertas A.A.G., Kadota S., *Phytochem. Anal.*, **2001**, 12, 366-73
- [54] Bankova V., Kujumgiev A., Marcucci M.C., Serkedjieva Y., Christov R., Popov S., *Z. Naturforsch.*, **1995**, 50C, 167-172
- [55] Lin J.K., Chen C.N., Shy H.S., Wu C.L., *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 503-6
- [56] Lin J.K., Chen C.N., Wu C.L., *Cancer Letters*, **2007**, 245, 218-31
- [57] Lin J.K., Weng M.S., Liao C.H., Chen C.N., Wu C.L., *J. Food Agric. Chem.*, **2007 b**, 55, 5289-98
- [58] Tomás-Barberán F.A., Garcia-Viguera C., Vit-Olivier P., Ferreres F., Tomás-Lorente F., *Phytochem.*, **1993**, 34 (1), 191-96
- [59] Rastrelli L., Piccinelli A.L., Fernandez M.C., Cuesta-Rubio O., Hernández I.M., *J. Nat. Prod.*, **2005 b**, 68, 931-34
- [60] Rastrelli L., Piccinelli A.L., Fernandez M.C., Cuesta-Rubio O., Hernández I.M., De Simone M., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 9010-16
- [61] Rastrelli L., Piccinelli A.L., Fernandez M.C., Cuesta-Rubio O., Hernández I.M., Rosado A., *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 7502-09
- [62] Ghisalberti E.L., Jefferies P.R., Lantari R., Matisons J., *Experientia*, **1978**, 34 (2), 157-58
- [63] Wollenweber E., Buchmann S.L., *Z. Naturforsch.*, **1997**, 52C, 530-35
- [64] Salatino A., Negri G., Marcucci M.C., Salatino M.L.F., *Apidologie*, **1998 b**, 29, 305-14
- [65] Salatino A., Negri G., Marcucci M.C., Salatino M.L.F., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2000**, 11 (5), 453-7
- [66] Salatino A., Custodio A.R., Ferriera M.M.C., Negri G., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, 14 (3), 354-7
- [67] Tulloch A.P., *Chem. Phys. Lipids*, **1971**, 6, 235-65
- [68] Salatino A., Woisky R.G., *J. Apicult. Res.*, **1998**, 37 (2), 99-105

- [69] Park Y.K., Ikegaki M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62 (11), 2230-32
- [70] Park Y.K., Ikegaki M., Alencar S.M., *Mensagem Doce*, **2000**, 58, 2-7
- [71] Johnson K.S., Eischen F.A., Giannasi D.E., *J. Chem. Ecol.*, **1994**, 20 (7), 1783-91
- [72] Stahl E., Quirin K.W., Gerard D., Dense gases for extraction and refining, Springer Verlag, **1988**, pag 103
- [73] Moreira E.S.A., Santos F.A., Bastos E.M.A., Uzeda M., Carvalho M.A.R., Farias L.M., Braga F.C., *J. Ethnopharm.*, **2002**, 80, 1-7
- [74] Wang B., Lien Y., Yu Z., *Food Chem.*, **2004**, 86, 237-243
- [75] Catchpole O.J., Grey J.B., Mitchell K.A., Lan J.S., *J. Supercrit. Fluids*, **2004**, 29, 97-106
- [76] Bankova V., Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Christov R., Popov S., *J. of Ethnopharm.*, **1999**, 64, 235-40
- [77] Bankova V., Christov R., Stoev G., Popov S., *J. Chromatogr.*, **1992 b**, 607, 150-53
- [78] Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F.R., *Flav. Fragr. J.*, **1989 b**, 4, 173-175
- [79] Bankova V.S., Dyulgerov A., Popov S., Evstatieva L., Kuleva L., Pureb O., Zamjansan Z., *Apidologie*, **1992**, 23, 79-85
- [80] Park Y.K., Alencar S.M., Aguiar C.L., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2502-6
- [81] Park Y.K., Paredes-Guzman J.F., Aguiar C.L., Alencar S.M., Fujiwara F.Y., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1100-3
- [82] Markham K.R., Mitchell K.A., Wilkins A.L., Daldy J.A., Lu Y., *Phytochemistry*, **1996**, 42 (1), 205-11
- [83] Park Y.K., Alencar S.M., de Aguiar C.L., Scamparini A.R.P., Gonzáles M., Molina M.A.A., *Mensagem Doce*, **2001**, 59, 2-10
- [84] Kumazawa S., Hayashi K., Kajiya K., Ishii T., Hamasaka T., Nakayama T., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4777-82
- [85] König B., *Bee World*, **1985**, 66 (4), 136-9
- [86] Watson D.G., Peyfoon E., Zheng L., Lu D., Seidel V., Johnston B., Parkinson J.A., Fearnley J., *Phytochem. Anal.*, **2006**, 17, 323-31
- [87] De Hoffmann E., Stroobant V., *Mass Spectrometry: principles and applications*, Wiley, **2005**, pag. 23
- [88] Huang D., Ou B., Prior R.L., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 1841-56
- [89] Strain J.J., Benzie I.F.F., *Anal. Biochem.*, **1996**, 239, 70-76
- [90] Vogel, *Chimica Organica Pratica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, Seconda edizione italiana, dalla quarta edizione inglese, **1988**, pag. 879

- [91] Pouchert C.J., *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*, I ed., **1985**, The Aldrich Chemical Company, Vol. 2 pag.287 D
- [92] NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 05)
- [93] Kwon Y., *Theochem*, **2000**, 532, 227-37
- [94] Moresi M., Sinesi S., *Analisi preliminare dei costi di produzione dell'oleoresina di lauro nobile da SFE*, in "Fluidi supercritici-applicazioni agroalimentari" pag. 156-164, Raissa CNR- Sottoprogetto 4, Milano **1993**
- [95] Davis R., Frearson M., *Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons, **1987**

Abbreviazioni

- ABTS**- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido solforico)
- ACN**- acetonitrile
- AcOEt**- acetato di etile
- BCINN**- benzil cinnamato
- BSAL**- benzil salicilato
- CAPE**- feniletil caffeato
- DMSO**- dimetil solfossido
- DPPH**- 2,2 diphenyl 1-picrylhydrazine
- ECINN**- etil cinnamato
- EEP**- estratti etanolici di propoli
- ESAL**- etil salicilato
- EtOH**- etanolo
- FECINN**- feniletil cinnamato
- FESAL**- feniletil salicilato
- GC-MS**- gas cromatografia con rivelatore di massa
- HCA**- analisi di classificazione gerarchica
- HCINN**- esil cinnamato
- HSAL**- esil salicilato
- HT-HRGC**- gas cromatografia ad alta risoluzione ed alta temperatura
- MCINN**- metil cinnamato
- MSAL**- metil salicilato
- MeOH**- metanolo
- PAD**- rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi
- PCA**- analisi delle componenti principali
- RSD**- deviazione standard relativa
- RPHPLC**- cromatografia liquida ad alta risoluzione in fase inversa
- RPHPTLC**- cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione in fase inversa
- SCCNPF**- Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products intended for consumers, un comitato dell'Unione Europea
- SD**- deviazione standard dalla media
- TPTZ**- 2,4,6- tri(2-piridil)-s-triazina
- UV-VIS** intervallo spettrale dell'ultravioletto (200-400 nm) e del visibile (400-700 nm)

Appendice 1: Coefficienti di estinzione UV

I coefficienti di estinzione UV sono stati determinati a tre diverse lunghezze d'onda con lo spettrofotometro Gilson UV-7500 per le seguenti specie: acido salicilico, acido acetilsalicilico, acido vanillico, acido veratrico, acido t-cinnamico, acido o-cumarico, acido p-cumarico, acido caffeico, acido ferulico, acido sinapico, metil salicilato, etil salicilato, esil salicilato, benzil salicilato, feniletil salicilato, metil cinamato, etil cinamato, benzil cinnamato, feniletil cinnamato, galangina, pinocembrina, crisina, isosakuranetina, naringenina, apigenina, kaempferolo, quercetina, alcol benzilico, 2 fenil etanolo, alcol cinnamico, acetofenone, feniletil caffeato, acido clorogenico, complesso Fe^{2+} -TPTZ. Tali coefficienti erano utili per:

- analisi quantitativa delle specie;
- controllo di eventuali degradazioni di soluzioni standard, attraverso la valutazione dei rapporti di banda (Parte sper., 2);
- localizzazione del massimo per l'ottimizzazione dell'analisi HPLC con la rivelazione UV.

Le posizioni dei massimi di assorbimento, i valori dei coefficienti di estinzione e dei rapporti di banda sono riportati nelle tabelle seguenti

1. Coefficienti di estinzione

1.1 Acidi benzoici

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
290	0,0183	0,0003	2550	50
305 (Max)	0,0294	0,0001	4060	20
320	0,0161	0,0001	2220	20

Tabella A101. Coefficienti di estinzione UV dell'acido salicilico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
215	0,0344	0,0002	6200	50
226 (Max)	0,0496	0,0002	8950	50
240	0,0139	0,0001	2500	20

Tabella A102. Coefficienti di estinzione UV dell'acido acetilsalicilico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
280	0,0285	0,0002	4790	30
290 (Max)	0,0336	0,0003	5650	50
300	0,0225	0,0005	3800	100

Tabella A103. Coefficienti di estinzione UV dell'acido vanillico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
275	0,0229	0,0002	4150	50
288 (Max)	0,0287	0,0002	5250	50
300	0,0185	0,0005	3400	100

Tabella A104. Coefficienti di estinzione UV dell'acido veratrico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

1.2 Acidi cinnamici

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
260	0,1115	0,0005	16500	50
275 (Max)	0,1430	0,0005	21200	100
290	0,0894	0,0004	13250	50

Tabella A105. Coefficienti di estinzione UV dell'acido t-cinnamico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
310	0,0425	0,0005	7000	100
323 (Max)	0,0552	0,0001	9060	20
335	0,0470	0,0005	7700	100

Tabella A106. Coefficienti di estinzione UV dell'acido o-cumarico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
320	0,088	0,001	14450	150
306 (Max)	0,131	0,002	21500	300
290	0,127	0,002	20800	300

Tabella A107. Coefficienti di estinzione UV dell'acido p-cumarico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
305	0,0806	0,0003	14500	50
320 (Max)	0,0938	0,0002	16900	30
335	0,0632	0,0001	11390	20

Tabella A108. Coefficienti di estinzione UV dell'acido caffeico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
305	0,0796	0,0003	15450	50
320 (Max)	0,0978	0,0003	19000	50
335	0,0653	0,0004	12700	50

Tabella A109. Coefficienti di estinzione UV dell'acido ferulico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
306	0,0675	0,0005	15100	100
316 (Max)	0,0770	0,0003	17250	50
326	0,075	0,002	17000	500

Tabella A110. Coefficienti di estinzione UV dell'acido sinapico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

1.3 Esteri salicilici

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
294	0,0205	0,0001	3125	15
304 (Max)	0,0272	0,0001	4130	20
314	0,0222	0,0001	3375	15

Tabella A111. Coefficienti di estinzione UV del metil salicilato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
298	0,0213	0,0001	3540	20
308 (Max)	0,0267	0,0001	4440	20
318	0,0209	0,0001	3470	20

Tabella A112. Coefficienti di estinzione UV dell'etil salicilato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
297	0,01590	0,00005	3530	10
307 (Max)	0,02065	0,00005	4590	10
317	0,01680	0,00005	3730	10

Tabella A113. Coefficienti di estinzione UV dell'esil salicilato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
277	0,003480	0,000001		
295	0,0143	0,0001	3270	20
305	0,0205	0,0001	4670	30
315	0,0192	0,0001	4370	20

Tabella A114. Coefficienti di estinzione UV del benzil salicilato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
277	0,00387	0,00002		
295	0,0152	0,0001	3490	20
305	0,02070	0,00005	4730	10
315	0,01815	0,00005	4150	10

Tabella A115. Coefficienti di estinzione UV del benzil salicilato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
295	0,01355	0,00005	3290	10
305	0,01935	0,00005	4690	10
315	0,0179	0,0001	4350	20

Tabella A116. Coefficienti di estinzione UV del fenilettil salicilato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
295	0,01400	0,00005	3400	10
305	0,01900	0,00005	4600	20
315	0,01630	0,00005	3950	10

Tabella A117. Coefficienti di estinzione UV del fenilettil salicilato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

1.4 Esteri cinnamici

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
263	0,1085	0,0005	17600	100
273 (Max)	0,1305	0,0005	21200	100
283	0,1145	0,0005	18600	100

Tabella A118. Coefficienti di estinzione UV del metil cinnamato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: acetone)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
260	0,1015	0,0003	17900	50
270 (Max)	0,1240	0,0005	21900	100
280	0,1075	0,0003	18950	50

Tabella A119. Coefficienti di estinzione UV dell'etil cinnamato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
265	0,0905	0,0005	13650	150
277	0,0950	0,0005	22620	200
290	0,0575	0,0005	21500	200
305	0,00495	0,0005		

Tabella A120. Coefficienti di estinzione UV del benzil cinnamato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
265	0,0796	0,0002	18950	50
277	0,0988	0,0002	23550	50
290	0,0772	0,0002	18400	50
305	0,0255	0,0005		

Tabella A121. Coefficienti di estinzione UV del benzil cinnamato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
255	0,0590	0,0005	14900	100
271 (Max)	0,0920	0,0005	23200	100
285	0,0660	0,0005	16700	100

Tabella A122. Coefficienti di estinzione UV del fenilettil cinnamato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
265	0,0758	0,0001	19100	50
277	0,0921	0,0002	23250	50
290	0,0700	0,0002	17650	50

Tabella A123. Coefficienti di estinzione UV del fenilettil cinnamato in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

1.5 Flavonoidi

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
277	0.0392	0.003	11000	1000
267	0.0659	0.002	18000	500
257	0.050	0.001	13500	500

Tabella A124 Coefficienti di estinzione UV della galangina in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
300	0.0490	0.0005	12500	100
290	0.0685	0.0005	17600	200
280	0.0511	0.0002	13100	50

Tabella A125. Coefficienti di estinzione UV della pinocebrina in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
260	0.099	0.002	25000	500
269	0.124	0.003	31500	500
280	0.085	0.003	21500	500

Tabella A126. Coefficienti di estinzione UV della crisina in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
280	0,051	0,001	14500	300
290	0,061	0,001	17600	300
300	0,044	0,001	12500	200

Tabella A127. Coefficienti di estinzione UV della isosakuranetina in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
280	0,055	0,002	15000	500
290	0,067	0,002	18000	500
300	0,047	0,001	12500	500

Tabella A128. Coefficienti di estinzione UV della naringenina in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
259	0,054	0,002	14500	500
269	0,070	0,002	19000	500
279	0,049	0,002	13000	500

Tabella A129. Coefficienti di estinzione UV dell'apigenina in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
257	0,052	0,002	15000	500
267	0,059	0,002	17000	500
277	0,032	0,001	9000	500

Tabella A130. Coefficienti di estinzione UV del kaempferolo in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
246	0,055	0,001	17000	500
256	0,074	0,002	22500	500
266	0,055	0,001	16500	500

Tabella A131. Coefficienti di estinzione UV della quercetina in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

1.6 Vari

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
593	0,397	0,002	22200	100

Tabella A132. Coefficienti di estinzione UV del complesso Fe (II)- TPTZ in in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) per mole di chelato ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) riferito alla massa di Fe²⁺ (solvente, tampone acetico)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
248	0,000885	0,000005	95.5	0.5
258 (Max)	0,00156	0,00001	169	1
268	0,000640	0,000005	69.0	0.5

Tabella A133. Coefficienti di estinzione UV dell'alcol benzilico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
268	0,0009256	0,0000003	113.10	0.05
258 (Max)	0,001530	0,000005	187	1
248	0,000926	0,000002	113.2	0.2

Tabella A134. Coefficienti di estinzione UV del 2-feniletanolo in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
260	0,0853	0,0004	11450	50
250 (Max)	0,1247	0,0004	16750	50
240	0,1026	0,0004	13750	50

Tabella 135. Coefficienti di estinzione UV dell'alcol cinnamico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
225	0,057	0,001	6850	150
238 (Max)	0,107	0,001	12850	150
250	0,024	0,001	2900	100

Tabella A136. Coefficienti di estinzione UV dell'acetofenone in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: esano)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
340	0,0604	0,0002	17200	100
330	0,0662	0,0003	18900	100
320	0,0584	0,0003	16600	100

Tabella A137. Coefficienti di estinzione UV del CAPE in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	ϵ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (ppm ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\Delta\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
320	0.0490	0.0005	17400	200
330	0.0545	0.0005	19300	200
340	0.0485	0.0005	17200	200

Tabella A138. Coefficienti di estinzione UV dell'acido clorogenico in concentrazione molare (M⁻¹ cm⁻¹) ed in grammi/L (ppm⁻¹ cm⁻¹) (solvente: etanolo)

2. Rapporti di banda

2.1 Acidi benzoici

Lambda (nm)	R	ΔR
290/305	0.62	0.01
320/305	0.550	0.005
320/290	0.88	0.02

Tabella A139. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido salicilico (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
215/226	0.695	0.005
240/226	0.280	0.005
240/215	0.405	0.005

Tabella A140. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido acetilsalicilico (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
280/290	0.85	0.01
300/290	0.68	0.02
300/280	0.79	0.02

Tabella A141. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido vanillico (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
275/288	0.795	0.005
300/288	0.64	0.01
288/275	0.80	0.02

Tabella A142. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido veratrico (solvente: etanolo)

2.2 Acidi cinnamici

Lambda (nm)	R	ΔR
260/275	0.775	0.005
290/275	0.625	0.005
290/260	0.805	0.005

Tabella A143. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido t-cinnamico (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
310/323	0.770	0.005
335/323	0.85	0.01
310/335	0.90	0.01

Tabella A144. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido o-cumarico (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
320/306	0.67	0.02
290/306	0.97	0.03
320/290	0.68	0.02

Tabella A145. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido p-cumarico (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
305/320	0.860	0.005
335/320	0.675	0.005
335/305	0.785	0.005

Tabella A146. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido caffeico (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
305/320	0.815	0.005
335/320	0.665	0.005
335/305	0.820	0.005

Tabella A147. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido ferulico (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
306/316	0.875	0.005
326/316	0.97	0.03
306/326	0.90	0.03

Tabella A148. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido sinapico (solvente: etanolo)

2.3 Esteri salicilici

Lambda (nm)	R	ΔR
294/304	0.755	0.005
314/304	0.815	0.005
294/314	0.925	0.005

Tabella A149. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del metil salicilato (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
298/308	0.795	0.005
318/308	0.780	0.005
318/298	0.98	0.01

Tabella A150. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'etil salicilato (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
317/307	0.815	0.005
297/307	0.770	0.005
297/317	0.945	0.005

Tabella A151. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'esil salicilato (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
295/305	0,70	0,01
315/305	0,94	0,01
295/315	0,74	0,01

Tabella A152. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del benzil salicilato (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
295/305	0.735	0.005
315/305	0.875	0.005
295/315	0.840	0.005

Tabella A153. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del benzil salicilato (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
295/315	0,900	0,005
295/305	0,700	0,005
315/305	0,930	0,005

Tabella A154. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del feniletil salicilato (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
295/305	0.735	0.005
315/305	0.860	0.005
295/315	0.860	0.005

Tabella A155. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del feniletil salicilato (solvente: etanolo)

2.4 Esteri cinnamici

Lambda (nm)	R	ΔR
263/273	0.830	0.005
283/273	0.875	0.005
263/283	0.945	0.005

Tabella A156. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del metil cinnamato (solvente: acetonitrile)

Lambda (nm)	R	ΔR
260/270	0.820	0.005
280/270	0.865	0.005
260/280	0.945	0.005

Tabella A157. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'etil cinnamato (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
265/277	0,95	0,01
290/277	0,61	0,01
290/265	0,64	0,01

Tabella A158. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del benzil cinnamato (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
265/277	0.805	0.005
290/277	0.780	0.005
290/265	0.970	0.005

Tabella A159. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del benzil cinnamato (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
265/271	0,640	0,005
285/271	0,72	0,01
255/285	0,90	0,01

Tabella A160. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del fenilettil cinnamato (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
265/277	0.825	0.005
290/277	0.760	0.005
290/265	0.925	0.005

Tabella A161. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del fenilettil cinnamato (solvente: etanolo)

2.5 Flavonoidi

Lambda (nm)	R	ΔR
277/267	0.6	0.1
257/267	0.75	0.05
277/257	0.8	0.1

Tabella A162. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, della galangina (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
300/290	0.71	0.01
280/290	0.74	0.01
300/280	0.96	0.01

Tabella A163. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, della pinocembrina (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
260/269	0.80	0.03
280/269	0.68	0.04
280/260	0.85	0.04

Tabella A164. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, della crisina (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
280/290	0,82	0,02
300/290	0,71	0,02
300/280	0,86	0,03

Tabella A165. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'isosakuranetina (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
280/290	0,83	0,03
300/290	0,71	0,03
300/280	0,85	0,03

Tabella A166. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, della naringenina (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
259/269	0,75	0,05
279/269	0,70	0,03
279/259	0,90	0,05

Tabella A167. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'apigenina (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
257/267	0,90	0,05
277/267	0,54	0,03
277/257	0,61	0,03

Tabella A168. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del kaempferolo (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
246/256	0,75	0,03
266/256	0,74	0,03
266/246	0,99	0,03

Tabella A169. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, della quercetina (solvente: etanolo)

2.6 Vari

Lambda (nm)	R	ΔR
248/258	0.565	0.005
268/258	0.410	0.005
268/248	0.725	0.005

Tabella A170. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'alcol benzilico (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
268/258	0.605	0.003
248/258	0.605	0.003
268/248	0.999	0.002

Tabella A171. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del 2-feniletanolo (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
260/250	0.685	0.005
240/250	0.825	0.005
260/240	0.830	0.005

Tabella A172. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'alcol cinnamico (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
225/238	0.53	0.02
250/238	0.22	0.01
250/225	0.42	0.03

Tabella A173. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acetofenone (solvente: esano)

Lambda (nm)	R	ΔR
340/330	0.910	0.005
320/330	0.88	0.01
320/340	0.97	0.01

Tabella A174. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, del CAPE (solvente: etanolo)

Lambda (nm)	R	ΔR
340/330	0.89	0.01
320/330	0.90	0.01
340/320	0.99	0.01

Tabella A175. Rapporti dei coefficienti di estinzione UV, misurati a diverse lunghezze d'onda, dell'acido clorogenico (solvente: etanolo)

3. Formule numeriche di calcolo per la concentrazione in ppm

3.1 Formule numeriche per il calcolo di concentrazione di specie singole

Nelle tabelle seguenti sono riportate le formule numeriche usate per il calcolo della concentrazione in ppm. Le formule per il calcolo sono nella forma $C \text{ (ppm)} = k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$, dove A è l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda riportata in tabella, k_1 è pari ad $1/\epsilon \text{ (ppm}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$ a quella stessa lunghezza d'onda, k_2 è pari a $\Delta A/\epsilon$, ed è pari a $\Delta \epsilon/\epsilon^2$. $E_{rel} (0,5)$ è l'incertezza relativa in cui si incorre, usando la formula proposta per il calcolo, quando l'assorbanza della soluzione è pari a 0,5 unità di assorbanza.

Specie	λ (nm)	Solvente	k_1 (ppm)	k_2 (ppm)	k_3 (ppm)	$E_{rel} (0,5)$ (%)
Acido salicilico	305	ACN	34,0	0,16	0,12	1,3
Acido acetilsalicilico	226	ACN	20,16	0,104	0,081	1,4
Acido vanillico	290	EtOH	29,78	0,373	0,270	3,4
Acido veratrico	288	EtOH	34,81	0,324	0,189	2,4

Tabella A176. Coefficienti delle formule empiriche del tipo $C \text{ (ppm)} = k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$ per risalire alla concentrazione in ppm dalla lettura di assorbanza A alla lunghezza d'onda riportata e nel solvente indicato per alcuni acidi benzoici. $E_{rel} (0,5)$ indica l'errore relativo che si commette usando la formula quando si misura un'assorbanza pari a 0,5

Specie	λ (nm)	Solvente	k_1 (ppm)	k_2 (ppm)	k_3 (ppm)	E_{rel} (%)	(0,5)
Acido cinnamico	t- 275	ACN	6,98	0,034	0,03	1,4	
Acido cumarico	o- 323	EtOH	18,11	0,068	0,046	1,0	
Acido cumarico	p- 306	ACN	7,64	0,13	0,10	4,7	
Acido caffeico	320	ACN	10,7	0,024	0,021	0,64	
Acido ferulico	320	ACN	10,2	0,033	0,03	0,94	
Acido sinapico	316	EtOH	12,99	0,046	0,043	1,0	

Tabella A177. Coefficienti delle formule empiriche del tipo C (ppm) = $k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$ per risalire alla concentrazione in ppm dalla lettura di assorbanza A alla lunghezza d'onda riportata e nel solvente indicato per alcuni acidi benzoici. E_{rel} (0,5) indica l'errore relativo che si commette usando la formula quando si misura un'assorbanza pari a 0,5

Specie	λ (nm)	Solvente	k_1 (ppm)	k_2 (ppm)	k_3 (ppm)	E_{rel} (%)	(0,5)
MSAL	304	ACN	36,81	0,272	0,171	1,9	
ESAL	308	Esano	37,45	0,2	0,15	1,5	
HSAL	307	Esano	48,43	0,205	0,162	1,2	
BSAL	305	Esano	48,78	0,1	0,34	1,1	
BSAL	305	EtOH	48,36	0,1	0,4	1,2	
FESAL	305	Esano	51,68	0,1	0,52	1,4	
FESAL	305	EtOH	52,63	0,14	0,11	0,74	

Tabella A178. Coefficienti delle formule empiriche del tipo C (ppm) = $k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$ per risalire alla concentrazione in ppm dalla lettura di assorbanza A alla lunghezza d'onda riportata e nel solvente indicato per alcuni esteri salicilici. E_{rel} (0,5) indica l'errore relativo che si commette usando la formula quando si misura un'assorbanza pari a 0,5

Specie	λ (nm)	Solvente	k_1 (ppm)	k_2 (ppm)	k_3 (ppm)	E_{rel} (%)	(0,5)
MCINN	273	ACN	7,67	0,049	0,034	1,7	
ECINN	270	Esano	8,06	0,045	0,036	1,6	
BCINN	277	Esano	10,53	0,22	0,084	5,0	
BCINN	277	EtOH	10,12	0,02	0,05	0,89	
FECINN	271	Esano	10,87	0,012	0,059	0,76	
FECINN	277	EtOH	10,86	0,024	0,024	0,66	

*Tabella A179. Coefficienti delle formule empiriche del tipo C (ppm) = $k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$ per risalire alla concentrazione in ppm dalla lettura di assorbanza A alla lunghezza d'onda riportata e nel solvente indicato per alcuni esteri ciunnamici. E_{rel} (0,5) indica l'errore relativo che si commette usando la formula quando si misura un'assorbanza pari a 0,5*

Specie	λ (nm)	Solvente	k_1 (ppm)	k_2 (ppm)	k_3 (ppm)	E_{rel} (%)	(0,5)
Galangina	267	EtOH	15,18	0,66	0,468	11,78	
Pinocembrina	290	EtOH	14,57	0,22	0,127	3,89	
Crisina	269	EtOH	8,065	0,24	0,171	8,07	
Isosakuranetina	290	EtOH	16,30	0,456	0,316	7,53	
Naringenina	290	EtOH	15,00	0,598	0,441	10,91	
Apigenina	269	EtOH	14,33	0,501	0,462	10,22	
Kaempferolo	267	EtOH	16,97	0,650	0,607	11,24	
Quercetina	256	EtOH	13,46	0,385	0,344	8,28	

*Tabella A180. Coefficienti delle formule empiriche del tipo C (ppm) = $k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$ per risalire alla concentrazione in ppm dalla lettura di assorbanza A alla lunghezza d'onda riportata e nel solvente indicato per alcuni flavonoidi. E_{rel} (0,5) indica l'errore relativo che si commette usando la formula quando si misura un'assorbanza pari a 0,5*

Specie	λ (nm)	Solvente	k_1 (ppm)	k_2 (ppm)	k_3 (ppm)	E_{rel} (0,5) (%)
Fe (II)- TPTZ	593	Tampone acetico	2,52	0,012	0,012	1,4
Alcol benzilico	258	Esano	641	8,8	4,1	3,4
2- fenil etanolo	258	Esano	654	3,54	2,79	1,5
Alcol cinnamico	250	Esano	8,018	0,038	0,027	1,3
Acetofenone	238	Esano	9,35	0,14	0,12	4,3
CAPE	330	EtOH	15,11	0,03	0,06	0,79
Acido clorogenico	330	EtOH	18,30	0,165	0,145	2,6

*Tabella A181. Coefficienti delle formule empiriche del tipo C (ppm) = $k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$ per risalire alla concentrazione in ppm dalla lettura di assorbanza A alla lunghezza d'onda riportata e nel solvente indicato per alcune specie e per il complesso chelato Fe (II)_TPTZ (Parte sper., 6.1.3). E_{rel} (0,5) indica l'errore relativo che si commette usando la formula quando si misura un'assorbanza pari a 0,5*

Specie	λ (nm)	Solvente	k_1 (ppm)	k_2 (ppm)	k_3 (ppm)	E_{rel} (0,5) (%)
Folin-Ciocalteau	760	Acqua	15,80	0,186	0,352	4,6
Flavanoni diidrossiflavonoli	e 486	MeOH	13,65	0,208	0,589	7,4
Flavoni flavonoli	e 425	MeOH	17,10	0,10	0,11	1,8

*Tabella A182. Coefficienti delle formule empiriche del tipo C (ppm) = $k_1 * A \pm (k_2 + k_3 * A)$ per risalire alla concentrazione in ppm dalla lettura di assorbanza A alla lunghezza d'onda riportata e nel solvente indicato per la determinazione di classi di composti (Parte sper., 6.1.2). E_{rel} (0,5) indica l'errore relativo che si commette usando la formula quando si misura un'assorbanza pari a 0,5*

3.2 Formule numeriche per il calcolo di concentrazione di due specie in miscela

Le seguenti formule sono state ricavate risolvendo un sistema di due equazioni in due incognite, prendendo letture alle due lunghezze d'onda 1 e 2 per la determinazione delle due specie a e b in miscela. Le due equazioni sono $A_1 = \epsilon_{a1} * C_a + \epsilon_{b1} * C_b$, e $A_2 = \epsilon_{2a} * C_a + \epsilon_{2b} * C_b$. Le due incognite sono le due concentrazioni.

BSAL +BCINN in etanolo ($\lambda_1 = 305$ nm e $\lambda_2 = 277$ nm)

$$C_{\text{cinn}} (\text{ppm}) = [A_{277} - A_{305} (0,187 \pm 0,002)] / [(94,0 \pm 0,3) * 10^{-3}];$$

$$C_{\text{sal}} (\text{ppm}) = [A_{305} - A_{277} (0,258 \pm 0,005)] / [(19,7 \pm 0,1) * 10^{-3}].$$

BSAL +BCINN in esano ($\lambda_1 = 305$ nm e $\lambda_2 = 277$ nm)

$$C_{\text{cinn}} = [A_{277} - A_{305} * (0,170 \pm 0,001)] / [(94,2 \pm 0,5) * 10^{-3}];$$

$$C_{\text{sal}} = [A_{305} - A_{277} * (0,052 \pm 0,001)] / [(20,3 \pm 0,5) * 10^{-3}].$$

Appendice 2: Analisi degli spettri di massa degli esteri BSAL, BCINN, HSAL ed HCINN

1. Analisi degli spettri di massa di BSAL, BCINN ed HSAL per l'analisi GC/MS

La determinazione di BSAL e BCINN è stata condotta mediante GC/MS, usando come standard interni HSAL ed HCINN (Parte sper., 6.6.2.2.2). Si è scelto, per la rivelazione, di usare solo alcuni frammenti caratteristici, per poter semplificare il profilo cromatografico ed evitare potenziali interferenze (Parte sper., 6.6.2.2.2). L'analisi degli spettri di massa di soluzioni standard di BCINN, BSAL ed HSAL, ottenuti mediante rivelazione di tutta la corrente ionica, ha rivelato un'ottima coincidenza con gli spettri di massa riportati nella libreria elettronica [92] (vedi figure A201, A202 e A203). Gli spettri sono stati interpretati come segue:

- BSAL mostra uno spettro piuttosto semplice, con un frammento $m/z^+ = 228$ a bassa intensità che corrisponde al peso molecolare, un picco $m/z^+ = 91$, il più intenso, che corrisponde al catione benzilico, ed un picco a $m/z^+ = 65$, corrispondente al radicale catione ciclopentadienile, che si forma dal radicale salicilico per decarbossilazione e successiva eliminazione di CHO radicale dall'anello fenolico;
- BCINN mostra un picco a bassa intensità $m/z^+ = 238$ che corrisponde al peso molecolare, un frammento $m/z^+ = 131$ che corrisponde alla generazione del frammento RCO^+ , con eliminazione del corrispondente alcol come radicale, il frammento a $m/z^+ = 91$, che come per il BSAL è il più intenso e corrisponde alla generazione del catione benzilico, il frammento $m/z^+ = 103$ è il catione fenil propenoico, generato dal catione RCO^+ per perdita di monossido di carbonio, e da cui, per successiva perdita di acetilene, si genera il catione $m/z^+ = 77$, che è il radicale benzilico;
- HSAL mostra un frammento $m/z^+ = 222$ corrispondente al peso molecolare di bassa intensità, un picco $m/z^+ = 138$ corrispondente alla perdita di esene (riarrangiamento di Mc Lafferty), un picco corrispondente a $m/z^+ = 120$ che è il picco più intenso e corrisponde alla perdita di 1-esanolo, e infine un picco a $m/z^+ = 92$, che corrisponde al frammento generato dalla perdita del CO dal frammento precedente..

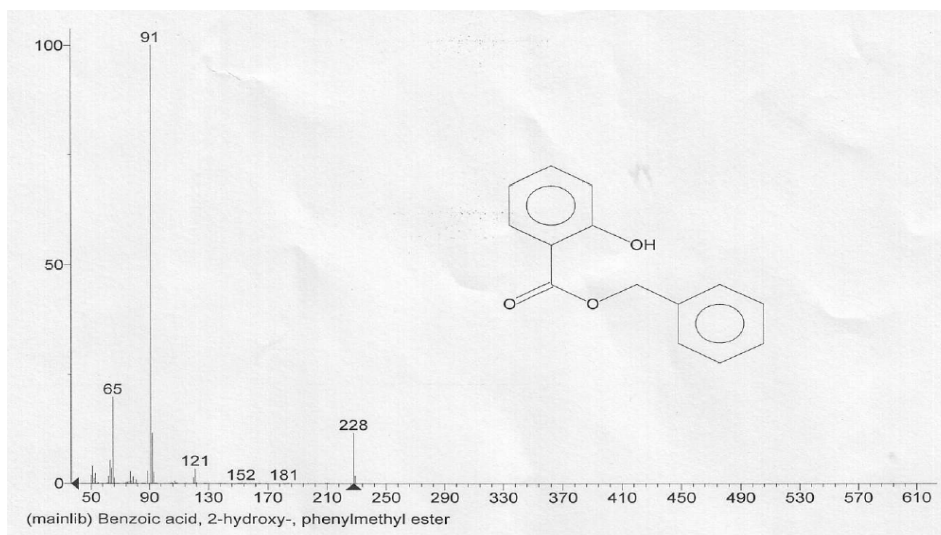


Figura A201. Spettro di massa di BSAL, riprodotto da NIST [92]

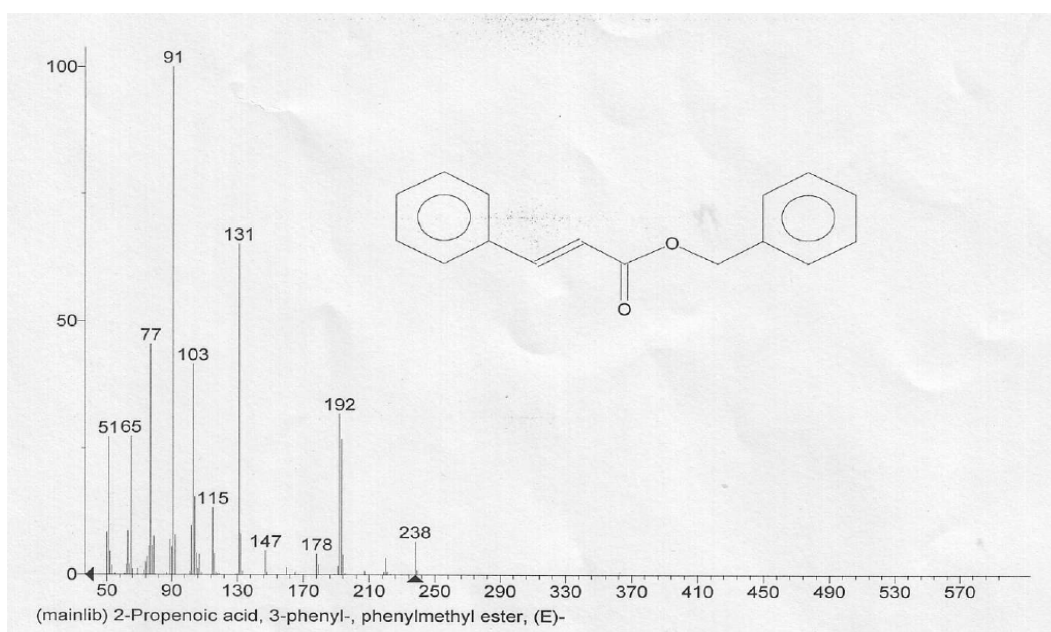


Figura A202. Spettro di massa di BCINN, riprodotto da NIST [92]

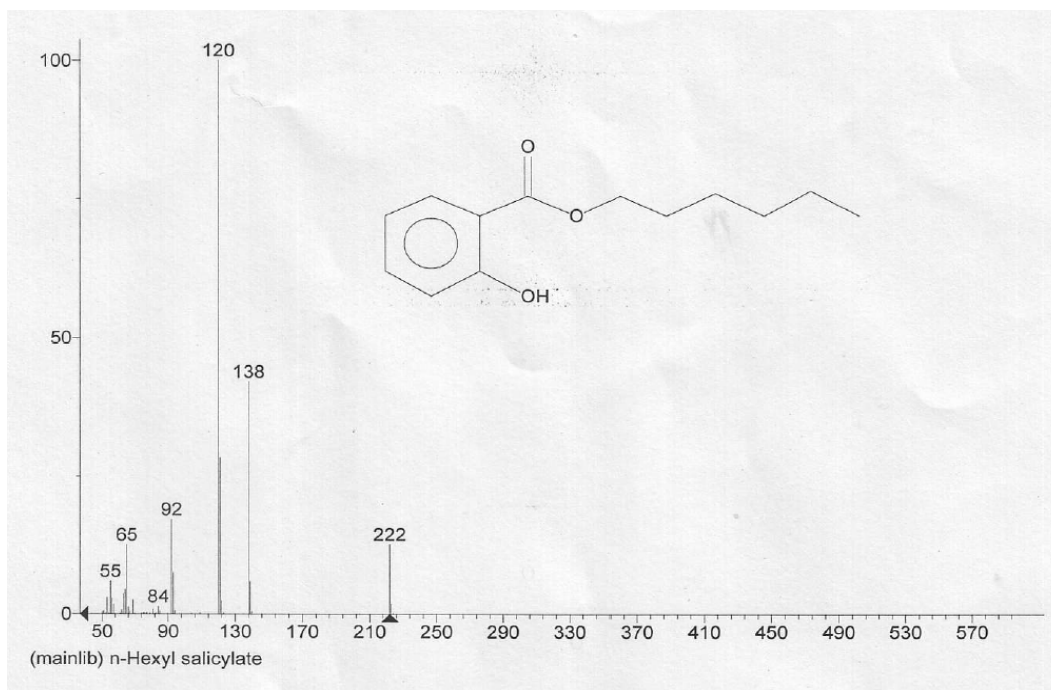
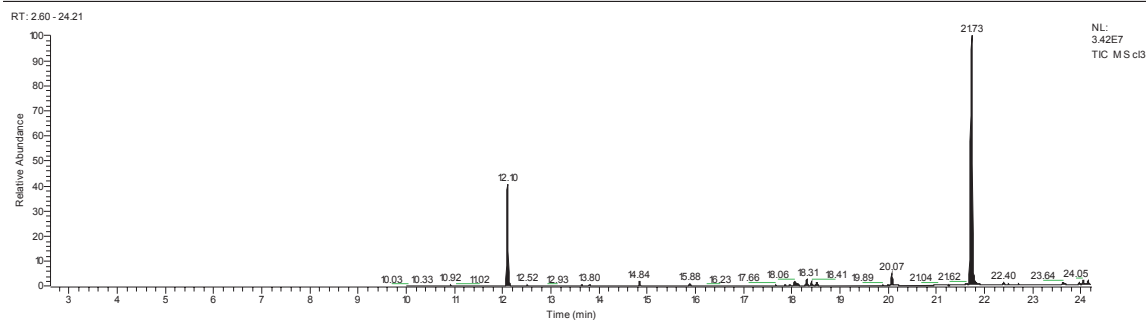


Figura A203. Spettro di massa di HSAL, riprodotto da NIST [92]

Per il BSAL, la semplicità dello spettro ha limitato le potenziali opzioni di scelta dei tre frammenti da usare per la rivelazione, e sono stati scelti i tre più intensi, e cioè $m/z^+ = 228, 91, 65$. Per HSAL, sono stati scelti i due frammenti più intensi, $m/z^+ = 138$ e 120 , che corrispondono alla perdita di esene ed etanolo, e quindi sono piuttosto caratteristici della struttura dei salicilati. Inoltre il picco molecolare è stato preferito a quello poco più intenso a $m/z^+ = 92$, perché più caratteristico.

2. Analisi dello spettro di massa di HCINN

HCINN è stato sintetizzato e caratterizzato mediante analisi GC/MS (Parte sper., **1.7.2**) (vedi figura **A204**). Lo spettro di questo composto non era presente in letteratura, quindi lo spettro ottenuto è stato confrontato con quelli disponibili in letteratura [92] per gli esteri cinnamici degli alcoli butilico, isobutilico, isopentilico (vedi tabella **A201** e figure **A205, A206, A207**)



cl3 #2112 RT: 21.73 AV: 1 SB: 2 23.04, 20.53 NL: 4.35E6
T: {0,0} + c EI det=350.00 Full ms [69.00-409.00]

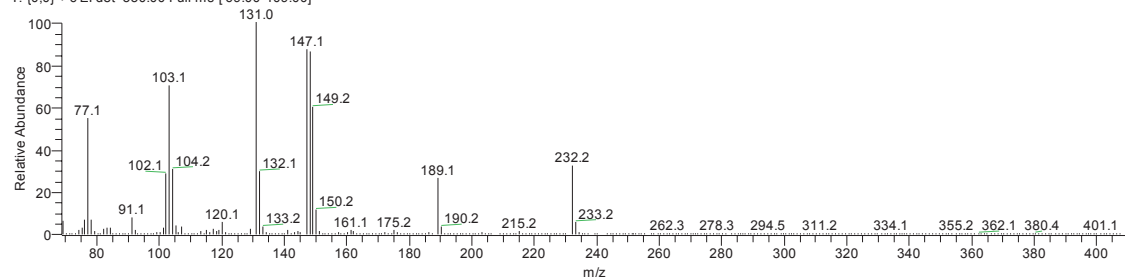


Figura A204. Spettro di massa e cromatogramma del prodotto di reazione di etanolo e acido *t*-cinnamico

m/z^+	PM	189	148	131	103	77
Butil	0,235	ND	0,837	1,0	0,398	0,235
Isobutil	0,0408	ND	0,480	1,0	0,367	0,286
Isopentil	0,0816	ND	0,469	1,0	0,541	0,388
Prodotto	0,309	0,273	0,855	1,0	0,709	0,545

Tabella A201. Proporzioni dei frammenti degli spettri di massa degli esteri cinnamici rispetto al picco più abbondante posto pari ad uno, nonché dello spettro del prodotto di reazione tra 1-esanolo e acido *t*-cinnamico

Negli spettri di questi esteri è sempre presente un picco corrispondente al radicale catione molecolare. La generazione del frammento $m/z^+ = 148$ (che corrisponde al radicale catione dell'acido *t*-cinnamico) deriva dal riarrangiamento di Mc Lafferty, con eliminazione dell'alchene con catena pari a quella del residuo alcolico dell'estere di partenza; il picco a $m/z^+ = 149$ deriva dal doppio trasferimento di idrogeno, tipico degli esteri. La generazione del frammento $m/z^+ = 131$, il più abbondante in tutti gli spettri considerati, corrisponde al frammento RCO^+ , prodotto per eliminazione del corrispondente alcol come radicale. Il frammento $m/z^+ = 103$ è il catione fenil propenoico, generato dal catione RCO^+ per perdita di monossido di carbonio; per successiva perdita di acetilene si genera infine il catione $m/z^+ = 77$, che è il radicale benzilico.

L'analisi degli spettri di massa di questi esteri cinnamici sono di grande aiuto nell'interpretazione dello spettro di massa del nostro picco incognito (e sospetto esil cinnamato), che infatti mostra notevoli analogie. Il picco più intenso è sempre quello $m/z^+ = 131$, e sono presenti anche i picchi $m/z^+ = 103$ ed $m/z^+ = 77$. La presenza di questi picchi è, come abbiamo visto, un indizio importante della presenza gruppo 3-fenil propenoico. La presenza è confermata dal picco $m/z^+ = 148$, che proviene dal riarrangiamento di Mc Lafferty di un estere cinnamico. Il picco $m/z^+ = 149$, prodotto dal doppio trasferimento di idrogeno, ed è intenso quasi quanto il picco $m/z^+ = 148$, a differenza di quanto si riscontra negli spettri degli esteri butilici e pentilici, dove invece il riarrangiamento di Mc Lafferty è preponderante rispetto al doppio trasferimento di idrogeno. Questo dato conferma che il nostro prodotto è effettivamente esil cinnamato, perché è riportato in letteratura che, dei due picchi, il trasferimento di idrogeno cresce di importanza al crescere della catena del residuo alcolico [95]. Il picco a $189 m/z^+$ corrisponde alla formazione di un catione radicale per espulsione di una molecola di propene. Infine, è presente un picco a $m/z^+ = 232$, che è attribuibile al picco del radicale catione molecolare: tutti gli esteri alifatici che abbiamo esaminato al punto precedente mostrano la presenza di tale picco, sia pure di bassa intensità. In base al confronto degli spettri e alla presenza del picco del sospetto peso molecolare, si è attribuito il picco all'esil cinnamato.

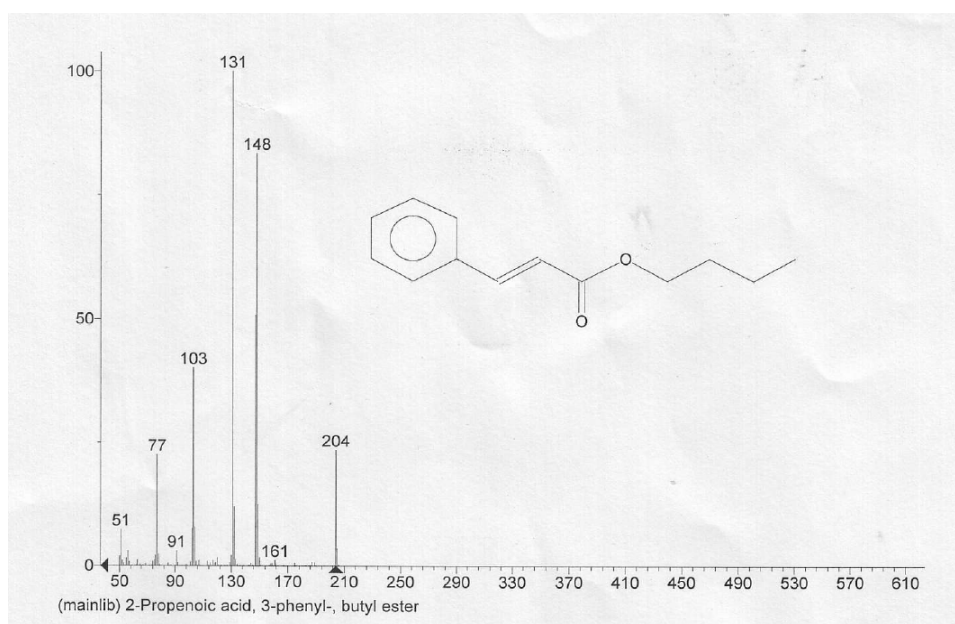


Figura A205. Spettro di massa del butil cinnamato, riprodotto da NIST [92]

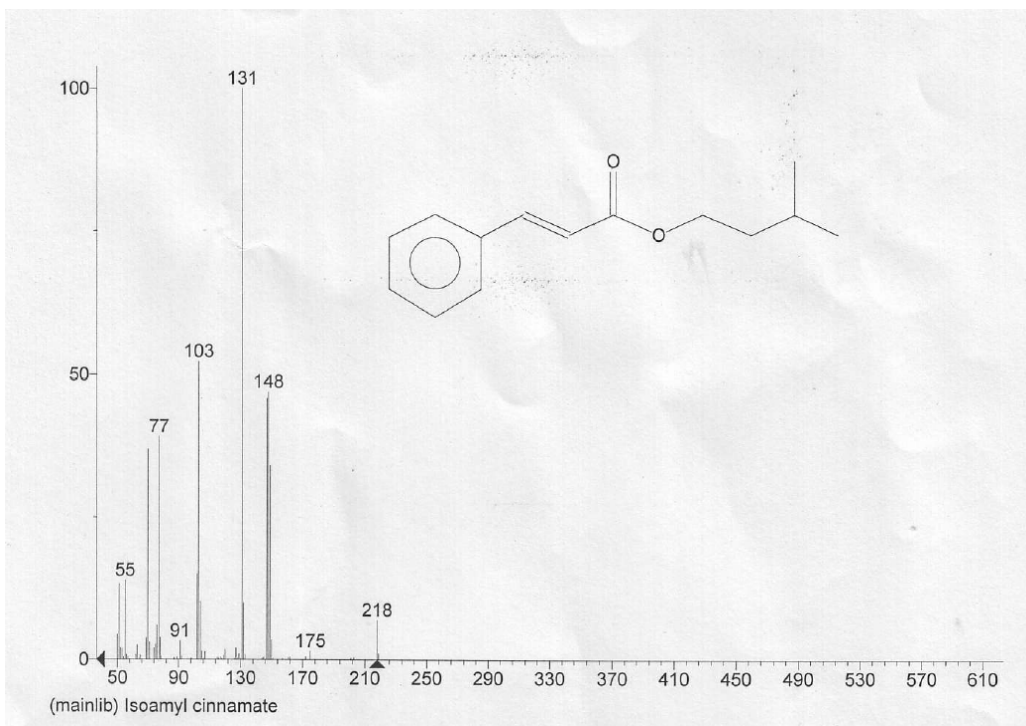


Figura A206. Spettro di massa dell'isopentil cinnamato, riprodotto da NIST [92]

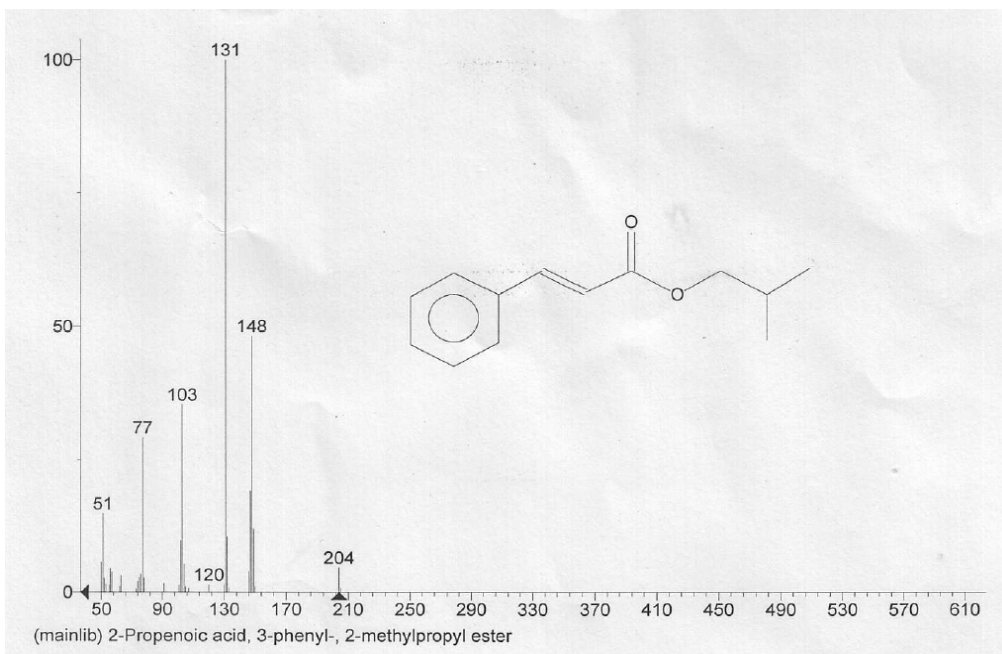


Figura A207. Spettro di massa dell'isobutil cinnamato, riprodotto da NIST [92]

Appendice 3: Metodo delle aggiunte ed analisi mediante HPLC in fase normale per la determinazione di BSAL e BCINN in propoli

A1

I campioni preparati con il metodo delle aggiunte per l'analisi GC-MS sono stati analizzati anche mediante HPLC in fase normale, senza ulteriori trattamenti (Ris., 2.2.3).

Le analisi sono state condotte sul cromatografo B (Parte sper., 5.2), con il seguente metodo:

Colonna: **Supelcosil LC-Si** (150 x4,6 mm, particelle da 5 μ m) (Parte sper., 1.4);

Eluenti: acetato di etile 2 % in esano;

Metodo di eluizione: 20 minuti isocratica;

Rivelazione: 293.

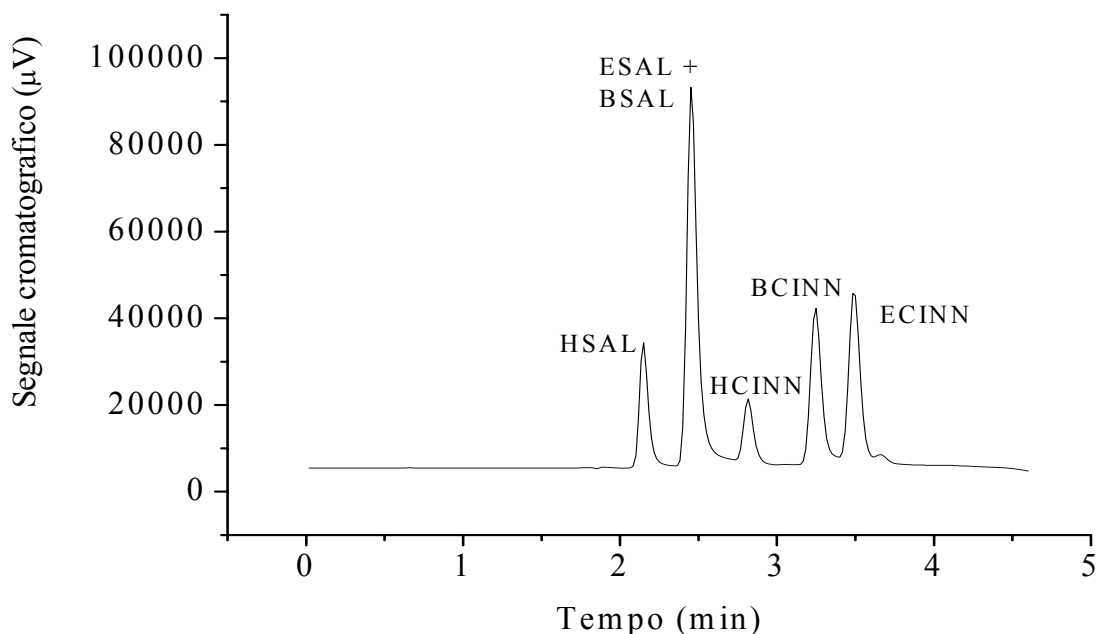
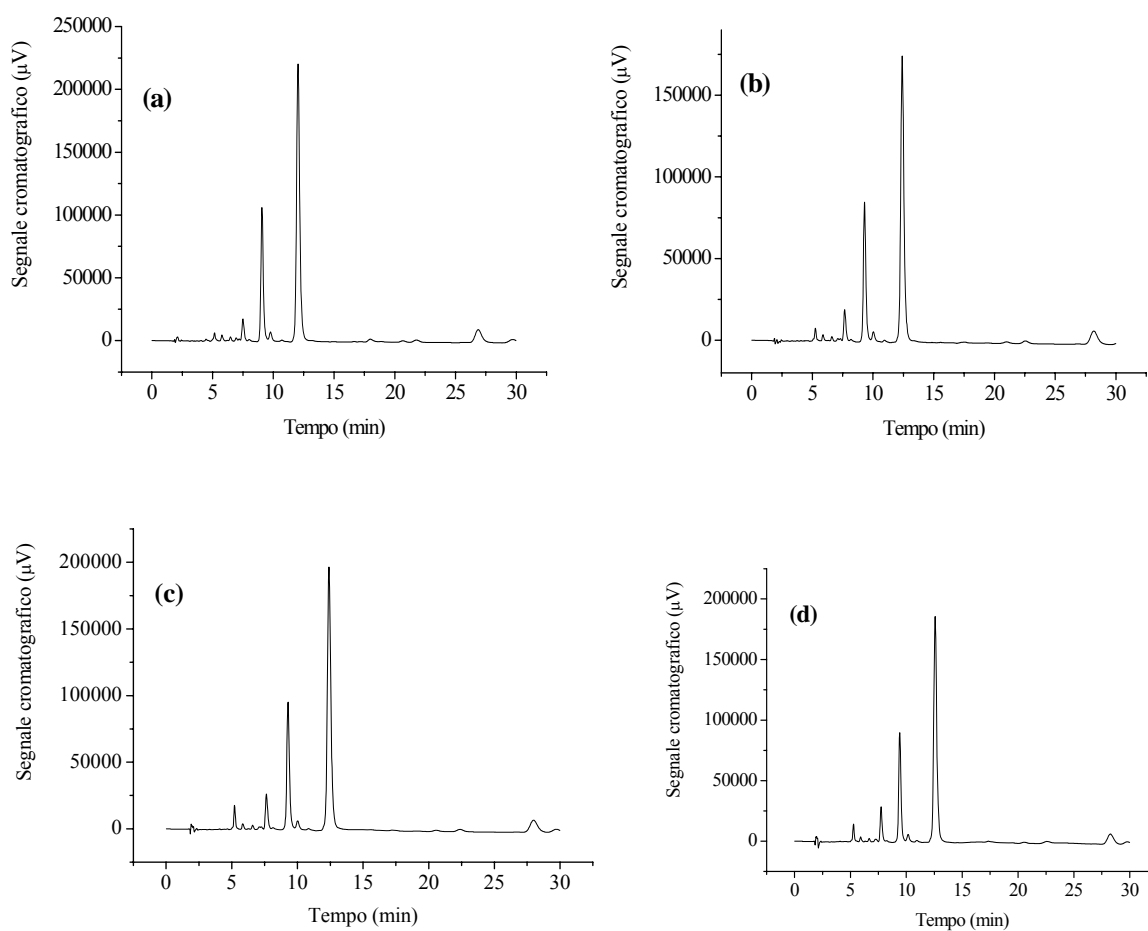


Figura A301. Standard in soluzione esanica eluiti in fase normale come da metodo descritto: BSAL 362 ng, BCINN 82 ng, ESAL 160 ng, ECINN 164 ng, HSAL 167 ng, HCINN 85 ng.

Il cromatogramma degli standard è in figura **A301**. La presenza degli esteri BSAL, BCINN, HSAL, HCINN nei campioni reali è stata confermata con coiniezione con soluzioni esaniche standard. Per la determinazione quantitativa dei cinnamati, sono state tracciate rette di taratura con soluzioni standard in esano.

I cromatogrammi dei campioni reali sono in figura **A302** ed i particolari della zona di eluizione dei cinnamati degli stessi cromatogrammi in figura **A303** (Parte sper., **6.6.2.2.2**).



*Figura A302. Cromatogrammi delle soluzioni dei campioni di propoli A1 in n-ottano ottenuti per aggiunte di quantità note di una soluzione di BSAL, BCINN, HSAL ed HCINN dopo estrazione con esano di sospensioni acquose (Parte sper., **6.6.2.2.1**): (a) aggiunta 1; (b) aggiunta 2; (c) aggiunta 3; (d) aggiunta 4 (Tabella **R9**)*

La retta delle aggiunte per HCINN è stata tracciata con il vincolo che passasse per l'origine, e si vede che ha un'ottima correlazione; la retta delle aggiunte per il BCINN non è stata invece

forzata a passare per l'origine, e mostra anch'essa una buona correlazione. Le rette sono state riportate in figura A304.

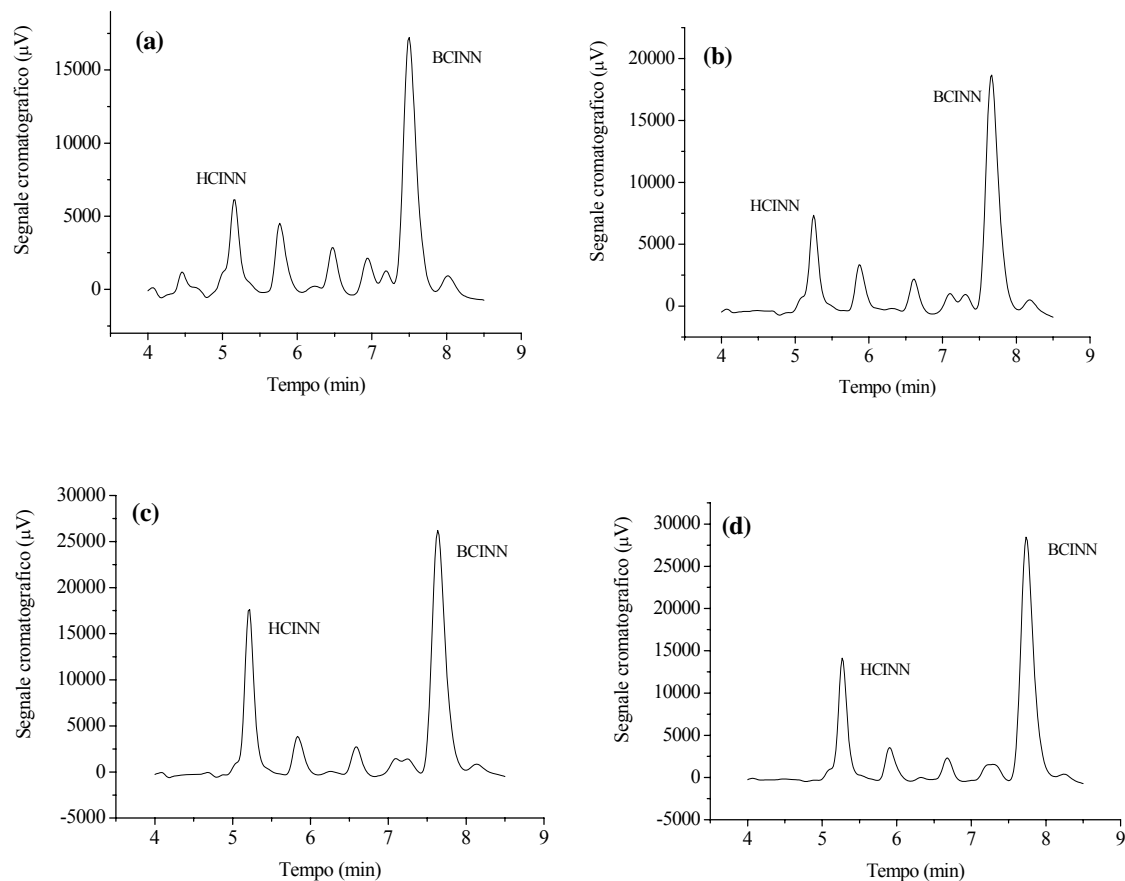


Figura A303. Particolari 4-9 minuti dei cromatogrammi dei campioni in *n*-ottano ottenuti per aggiunte di quantità note di una soluzione di BSAL, BCINN, HSAL ed HCINN dopo estrazione con esano di sospensioni acquose di propoli A1 (Parte sper., 6.6.2.2.1) (Vedi figura A302): (a) aggiunta 1; (b) aggiunta 2; (c) aggiunta 3; (d) aggiunta 4 (Tabella R9)

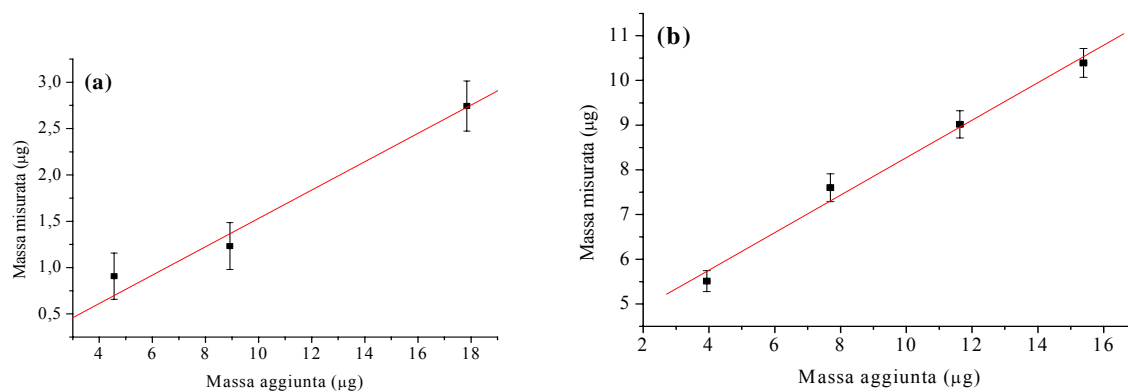


Figura A304. Rette delle aggiunte di (a) HCINN forzata a passare per l'origine e di (b) BCINN non forzata a passare per l'origine. Per le quantità aggiunte, (Parte sper., 6.6.2.2.1).

I parametri di correlazione sono stati riportati in tabella **A301**.

	Intercetta (μg)	Pendenza	R	SD (μg)
BCINN	4,08163	0,41916	0,99394	0,28072
HCINN	ND	0,15304	0,98705	0,17535

Tabella A301. Parametri delle correlazioni per le rette delle aggiunte di BCINN ed HCINN in soluzioni ottaniche ottenute per estrazione con esano di sospensioni in HCl di EEP di propoli A1 (Parte sper., 6.6.2.2.1) (vedi figura A304)

Dalla retta delle aggiunte del BCINN, è stata calcolata la concentrazione analitica e la concentrazione nella propoli solida A1, che risultano essere $9,73 \pm 1,12 \mu\text{g}$ e $126 \pm 15 \mu\text{g/g}$ rispettivamente. Il metodo fornisce lo stesso risultato che si ottiene mediante l'analisi GC-MS per questo estere.

Dal valore determinato con le aggiunte, è stato possibile determinare i recuperi di BCINN (media \pm SD = **0,41 \pm 0,01**) nelle quattro prove, e sono stati correlati con i recuperi di HCINN (media \pm SD = **0,28 \pm 0,02**). Il rapporto tra queste medie, pari a **1,5 \pm 0,1**, può essere usato per la determinazione dei recuperi di BCINN incogniti dai recuperi di BCINN che invece sono noti.

E' quindi possibile usare il metodo HPLC in fase normale come sostituto dell'analisi GC/MS per la determinazione di BCINN usando HCINN come standard interno. Tuttavia, non è stato possibile usare questo metodo per la determinazione degli esteri salicilici. Questo è dovuto al fatto che la capacità di risolvere tali picchi, già dopo poche iniezioni di campioni di propoli, è risultata estremamente ridotta. Infatti, nelle prime iniezioni di standard è stato possibile individuare il picco di BSAL (figura **A301**). Dopo poche iniezioni di campioni reali, però, si perde ogni traccia del picco riferibile a BSAL. La successiva iniezione di una soluzione standard mostra un picco di BSAL praticamente schiacciato sulla linea di base (figura **A305**). La perdita di efficienza è totale, né è stato successivamente recuperarla, neanche dopo prolungato lavaggio con 2-propanolo, e neanche dopo l'uscita di un consistente "panettone" di sporcizia. Questo vuol dire che le colonne in silice si contaminano irreversibilmente per

iniezione di campioni di propoli che abbiano subito il solo trattamento di estrazione con esano. Per questi motivi, l'analisi in fase normale è stata abbandonata.

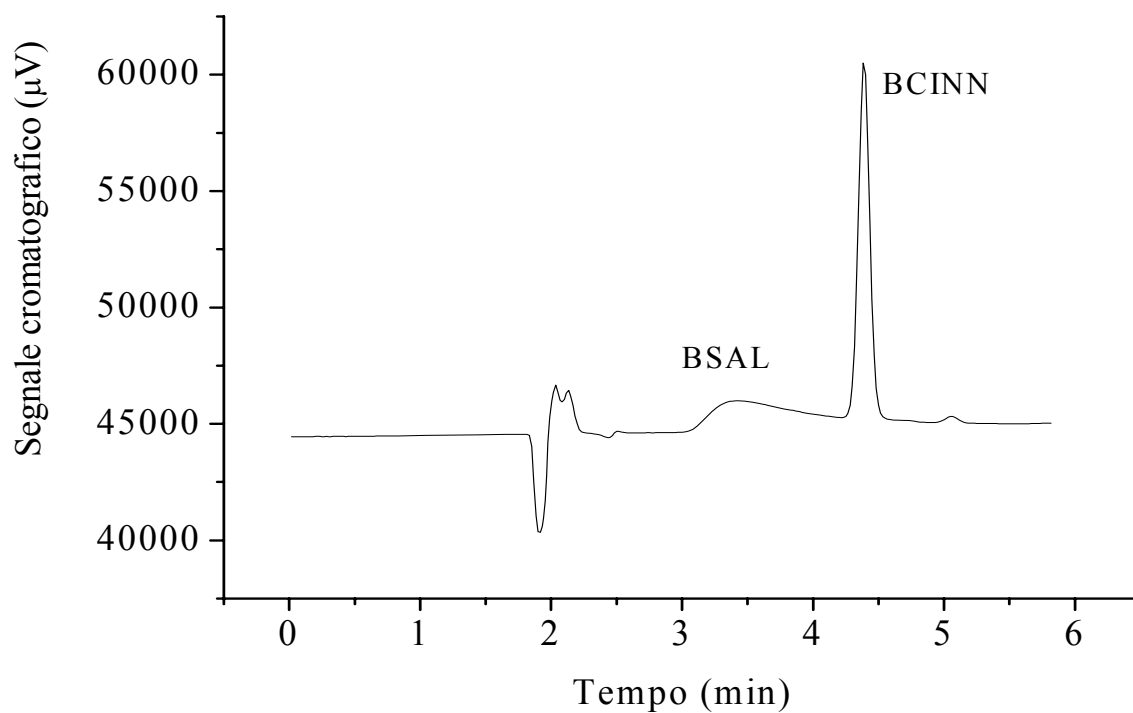


Figura A305. Iniezione di soluzioni esaniche di BSAL e BCINN standard (300 e 60 ng rispettivamente) eluiti con il metodo in fase normale descritto dopo l'iniezione di pochi campioni reali di propoli

Appendice 4: Conferma dell'assegnazione dei picchi nella caratterizzazione HPLC dei campioni di propoli raccolti in autunno 2007

I picchi HPLC di acidi cinnamici e polifenoli in campioni di propoli raccolti nell'inverno 2007 (Parte sper., 4) sono stati preliminarmente assegnati mediante coiniezione.

Rapporto	Acido caffeico	Acido p-cumarico	Acido ferulico	CAPE
293/320	0,77	0,970	0,65	0,34
275/320	0,46	0,595	0,40	0,17
275/293	0,60	0,615	0,60	0,48
275/250	ND	ND	ND	0,73
293/250	ND	ND	ND	1,55
320/250	ND	ND	ND	4,5

Rapporto	Quercetina	Apigenina	Kaempferolo
293/320	0,65	0,5	0,60
275/320	1,1	0,8	1,0
275/293	1,7	1,4	1,7
275/250	0,65	1,8	1,0
293/250	0,37	1,2	0,60
320/250	0,56	2,3	1,0

Rapporto	Crisina	Pinocembrina	Galangina
293/320	0,9	3,3	1,0
275/320	1,1	1,5	0,75
275/293	1,3	0,46	0,8
275/250	1,3	9,5	0,75
293/250	1,0	20	0,9
320/250	1,2	6,0	1,0

Tabella A401. Valori di rapporti di intensità HPLC a diverse lunghezze d'onda per soluzioni standard (2 ppm ciascuna in una soluzione 4/1 H₂O/ACN acidificata con 0,1 % di acido formico) eluiti con il gradiente G2 (Tabella M12). RSD dei valori, 10 %

Per poter confermare l'assegnazione, e verificare che i picchi assegnati fossero puri, si è proceduto ad un'ulteriore verifica, basata sui rapporti di intensità di ciascun picco alle diverse

lunghezze d'onda. Poiché i segnali alle diverse lunghezze d'onda sono funzione del coefficiente di estinzione UV-VIS, e per una data specie la forma dello spettro è costante, ne segue che anche i rapporti di intensità HPLC registrati a diverse lunghezze d'onda debbano essere costanti.

Sono stati determinati i rapporti di intensità HPLC di diversi acidi cinnamici e flavonoidi a diverse lunghezze d'onda mediante iniezioni con soluzioni standard, rivelando a 320,293, 275 e 250 nm. Le soluzioni iniettate erano a 2 ppm per specie considerata in una soluzione 4/1 H₂O/ACN acidificata con 0,1 % di acido formico, e sono state eluite usando il gradiente G2 (Tabella **M12**). I picchi sono stati integrati a tre lunghezze d'onda per gli acidi cinnamici (320, 275 e 293 nm), e a tutte e quattro le lunghezze d'onda per i flavonoidi. In tabella **A301** sono riportati i valori determinati.

I valori provenienti dai campioni reali sono stati divisi per i valori determinati per gli standard (tabella **A401**). Questi valori dovrebbero essere idealmente tutti unitari, e sono in tabella **A402** e **A403** (acidi cinnamici) e **A404** e **A405** (flavonoidi).

Acido caffeico

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,3	1,1	1,2	1,3	0,90
275/320	1,3	1,10	1,4	1,15	0,90
275/293	1,00	1,05	1,10	0,90	1,00
Media	1,184	1,055	1,246	1,122	0,940
SD	0,144	0,025	0,128	0,202	0,055

Acido p-cumarico

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,03	1,14	1,06	1,12	0,92
275/320	1,20	1,10	0,82	0,87	0,92
275/293	1,17	0,97	0,76	0,78	1,01
Media	1,134	1,069	0,883	0,924	0,950
SD	0,095	0,088	0,157	0,172	0,050

Acido ferulico

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	2,1	1,5	1,2	1,3	0,8
275/320	1,2	0,95	1,0	1,2	0,8
275/293	0,55	0,65	0,8	0,94	1,1
Media	1,288	1,024	1,002	1,127	0,905
SD	0,794	0,432	0,201	0,168	0,164

Tabella A402. Rapporti di intensità di segnale HPLC di acidi cinnamici in campioni di propoli reali tal quali (Ris., 2.4.4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A301)

Acido caffeico

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,0	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	1,0
275/320	1,00	1,05	1,05	1,00	0,95	1,05	0,95
275/293	0,95	0,95	1,00	1,00	0,95	0,95	0,90
Media	0,986	1,050	1,036	1,013	0,984	1,025	0,977
SD	0,051	0,078	0,047	0,031	0,027	0,055	0,067

Acido p-cumarico

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,14	1,01	1,14	1,07	1,17	1,14	1,000
275/320	1,09	0,89	1,07	1,05	1,24	1,12	1,03
275/293	0,95	0,87	0,94	0,98	1,06	0,98	1,02
Media	1,059	0,924	1,047	1,030	1,156	1,080	1,017
SD	0,099	0,077	0,102	0,047	0,093	0,086	0,014

Acido ferulico

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,1	0,9	1,3	1,2	1,2	1,2	1,1
275/320	1,1	0,75	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1
275/293	1,0	0,9	0,9	1,0	1,0	0,9	1,0
Media	1,051	0,839	1,131	1,065	1,065	1,066	1,067
SD	0,074	0,077	0,175	0,110	0,110	0,114	0,063

Tabella A403. Rapporti di intensità di segnale HPLC di acidi cinnamici in campioni di propoli reali trattati con olio (Ris., 4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A401)

I dati dei flavonoidi sono stati sottoposti ad una elaborazione statistica basata sul test di normalità K-S: si tratta di un test statistico non parametrico che valuta la conformità di un campione statistico ad una ipotizzata distribuzione. La scelta è ricaduta su questo test per diversi motivi. Il primo risiede nel fatto che test parametrici, come il classico t di student, sarebbero stati meno adatti, a causa del basso numero di osservazioni. Il secondo motivo di

preferenza è che tale test non richiede operazioni soggettive di discretizzazione delle osservazioni in classi, come avviene invece in un altro test non parametrico quale il Chi quadro. Infine, il test presenta un livello di *potenza* (probabilità di rigettare l'ipotesi nulla quando questa è effettivamente falsa) sufficientemente alto, non lontano da quello dei test parametrici.

Il test determina un valore di p-bilaterale, che indica la probabilità che non si possa escludere che il set di valori siano distribuiti normalmente. Un valore di questo parametro inferiore od uguale a 0,05 indica che è possibile escludere che il set di valori sia distribuito normalmente. I set di valori di rapporti sono stati testati picco per picco, prima senza vincoli (in tabella **A404** ed **A405**, il valore “p-bil lib” è quello ricavato da questa elaborazione, insieme al valore di media e SD), quindi con il vincolo che la media fosse pari ad 1 e la varianza pari a 0,03 (in tabella **A404** ed **A405**, il valore “p-bil 1” è quello ottenuto da questa seconda elaborazione). Dove un valore di intensità non è stato misurabile, e sono stati determinati solo tre rapporti, non è stato eseguito test k-s, e si è usato il valore di media e SD.

Quercetina

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,08	1,19	1,20	1,28	ND
275/320	0,883	0,981	0,814	1,05	1,1
275/293	0,817	0,824	0,674	0,815	ND
275/250	0,817	0,789	1,16	0,889	4,0
293/250	1,05	1,00	1,80	1,15	ND
320/250	0,977	0,848	1,50	0,893	4,0
Media	0,936	0,939	1,19	1,01	3,01
SD	0,114	0,149	0,420	0,180	1,64
p-bil lib	0,986	0,915	0,999	0,854	ND
p-bil 1	0,524	0,542	0,117	0,904	ND

Tabella A404. Rapporti di intensità di segnale HPLC di flavonoidi in campioni di propoli reali tal quali (Ris., 2.4.4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A401). I valori di “p-bil lib” e “p-bil 1” sono i parametri determinati dall’elaborazione con il test di normalità k-s, condotti rispettivamente lasciando liberi media e varianza e fissando media e varianza a 1 e 0,03. Dove un valore di intensità non è stato misurabile, e sono stati determinati solo tre rapporti, non è stato eseguito test k-s, e si è usato il valore di media e SD. In rosso i valori di media inaccettabili e i valori di p-bilaterale sotto

0,05

Apigenina

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,55	1,53	0,763	1,74	ND
275/320	0,996	0,846	0,564	1,00	1,2
275/293	0,735	0,632	0,845	0,658	ND
275/250	0,721	0,652	0,359	0,751	0,90
293/250	1,05	1,10	0,455	1,22	ND
320/250	0,708	0,753	0,623	0,732	0,7
Media	0,960	0,919	0,601	1,02	0,944
SD	0,325	0,347	0,183	0,413	0,233
p-bil lib	0,827	0,845	1,00	0,874	ND
p-bil 1	0,205	0,127	0,0010	0,228	ND

Kaempferolo

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	2,31	2,75	1,43	2,07	ND
275/320	1,31	1,68	0,725	1,18	0,7
275/293	0,555	0,599	0,498	0,559	ND
275/250	1,24	1,27	1,29	0,912	1,5
293/250	2,19	2,07	2,54	1,60	ND
320/250	0,950	0,753	1,78	0,772	2,1
Media	1,42	1,52	1,38	1,18	1,46
SD	0,692	0,818	0,738	0,564	0,715
p-bil lib	0,894	0,998	1,00	0,987	ND
p-bil 1	0,034	0,025	0,020	0,447	ND

Tabella A404. Continua da pag. 196. Rapporti di intensità di segnale HPLC di flavonoidi in campioni di propoli reali tal quali (Ris., 2.4.4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A401). I valori di “p-bil lib” e “p-bil 1” sono i parametri determinati dall’elaborazione con il test di normalità k-s, condotti rispettivamente lasciando liberi media e varianza e fissando media e varianza a 1 e 0,03. Dove un valore di intensità non è stato misurabile, e sono stati determinati solo tre rapporti, non è stato eseguito test k-s, e si è usato il valore di media e SD. In rosso i valori di media inaccettabili e i valori di p-bilaterale sotto 0,05

Crisina

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,18	1,18	1,40	1,64	0,733
275/320	1,95	1,43	1,29	2,11	1,38
275/293	1,56	1,14	0,869	1,21	1,77
275/250	1,29	1,10	1,28	1,35	1,77
293/250	0,827	0,960	1,48	1,113	1,00
320/250	0,650	0,752	0,975	0,629	1,25
Media	1,24	1,09	1,22	1,34	1,32
SD	0,477	0,228	0,242	0,500	0,415
p-bil lib	1,00	0,987	0,745	0,998	0,976
p-bil 1	0,083	0,364	0,021	0,003	0,733

Galangina

	A1	T1	T2	L2	L3
293/320	2,3261	2,1043	1,4934	2,6240	1,3400
275/320	2,2830	1,7105	1,2260	2,4107	1,6400
275/293	0,9201	0,7621	0,7696	0,8613	1,1500
275/250	2,9422	2,4915	1,8934	2,6507	3,2000
293/250	3,3309	3,4057	2,5626	3,2067	2,8889
320/250	1,2887	1,4566	1,5443	1,1000	2,0000
Media	2,1818	1,9884	1,5816	2,1422	2,0365
SD	0,9294	0,9099	0,6090	0,9859	0,8378
p-bil lib	0,9540	1,0000	0,9810	0,7390	0,9870
p-bil 1	0,0010	0,0010	0,0030	0,0100	1,3400

Tabella A404. Continua da pag. 197. Rapporti di intensità di segnale HPLC di flavonoidi in campioni di propoli reali tal quali (Ris., 2.4.4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A401). I valori di “p-bil lib” e “p-bil 1” sono i parametri determinati dall’elaborazione con il test di normalità k-s, condotti rispettivamente lasciando liberi media e varianza e fissando media e varianza a 1 e 0,03. Dove un valore di intensità non è stato misurabile, e sono stati determinati solo tre rapporti, non è stato eseguito test k-s, e si è usato il valore di media e SD. In rosso i valori di media inaccettabili e i valori di p-bilaterale sotto 0,05

Quercetina

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,5169	1,6338	0,8585	ND	1,2738	1,5031	ND
275/320	0,9882	1,2291	0,5718	ND	0,8809	0,8136	1,1
275/293	0,6482	0,7488	0,6629	ND	0,6888	0,5388	ND
275/250	1,0215	0,9492	0,8646	ND	1,0138	0,5892	1,5
293/250	1,6493	1,3288	1,3644	ND	1,5425	1,1452	ND
320/250	1,0911	0,8143	1,5946	0,8071	1,2143	0,7643	1,4
Media	1,1525	1,1173	0,9861	ND	1,1024	0,8924	1,375
SD	0,3693	0,3406	0,4051	ND	0,3045	0,3678	0,215
p-bil lib	0,9010	0,9830	0,7160	ND	1,0000	0,8430	ND
p-bil 1	0,5230	0,2730	0,0670	ND	0,3150	0,0730	ND

Apigenina

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,3400	1,8020	1,4060	1,3000	1,3900	1,7320	ND
275/320	0,9075	1,1713	0,8900	0,7988	0,7563	1,1525	1,5
275/293	0,7750	0,7429	0,7229	0,7029	0,6221	0,7607	ND
275/250	0,6894	0,7978	0,7967	0,9444	0,8161	0,9133	0,6
293/250	0,9533	1,1508	1,1800	1,4392	1,4058	1,2867	ND
320/250	0,7426	0,6665	0,8757	1,1561	1,0557	0,7757	0,4
Media	0,9013	1,0552	0,9785	1,0569	1,0077	1,1035	0,849
SD	0,2372	0,4231	0,2608	0,2897	0,3333	0,3721	0,573
p-bil lib	0,8590	0,9130	0,6550	1,0000	0,9400	0,9760	ND
p-bil 1	0,1970	0,3560	0,2810	0,5860	0,4330	0,6090	ND

Tabella A405. Rapporti di intensità di segnale HPLC di flavonoidi in campioni di propoli reali trattati con olio (Ris., 4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A401). I valori di “p-bil lib” e “p-bil 1” sono i parametri determinati dall’elaborazione con il test di normalità k-s, condotti rispettivamente lasciando liberi media e varianza e fissando media e varianza a 1 e 0,03. Dove un valore di intensità non è stato misurabile, e sono stati determinati solo tre rapporti, non è stato eseguito test k-s, e si è usato il valore di media e SD. In rosso i valori di media inaccettabili e i valori di p-bilaterale sotto

0,05

Kaempferolo

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	2,0900	3,0167	1,8733	7,1950	1,5650	1,9517	ND
275/320	1,2240	1,6040	1,1480	3,3420	0,7360	1,9220	0,8
275/293	0,5741	0,5212	0,6012	0,4553	0,4612	0,9653	ND
275/250	0,6700	1,1160	1,1510	3,6890	1,4710	0,8590	1,0
293/250	1,1433	2,1000	1,8783	7,9417	3,1267	0,8717	ND
320/250	0,5470	0,6960	1,0020	1,1040	1,9980	0,4470	1,2
Media	1,0414	1,5090	1,2756	3,9545	1,5596	1,1694	1,025
SD	0,5906	0,9405	0,5064	3,0729	0,9530	0,6208	0,198
p-bil lib	0,8940	0,9980	0,7980	0,8680	0,9970	0,6710	ND
p-bil 1	0,1390	0,1000	0,1410	0,0010	0,0100	0,5180	ND

Crisina

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	1,1831	1,5747	0,9777	0,8056	1,4	0,9244	0,6111
275/320	1,7633	2,5679	1,4788	2,2018	1,4	1,9936	1,3636
275/293	1,4012	1,5331	1,4221	2,5685	0,9	2,0285	2,0000
275/250	1,1416	1,4060	1,4505	1,7423	ND	1,3962	1,6154
293/250	0,8147	0,9171	1,0200	0,6780	ND	0,6880	0,8000
320/250	0,6376	0,5393	0,9660	0,7792	ND	0,6892	1,1667
Media	1,1569	1,4230	1,2192	1,4626	1,218	1,2866	1,2595
SD	0,4038	0,6904	0,2546	0,8200	0,243	0,6178	0,5150
p-bil lib	0,9990	0,8600	0,7050	0,7000	ND	0,9310	0,9990
p-bil 1	0,1580	0,0110	0,1090	0,1000	ND	0,1140	0,1010

Tabella A405. Continua da pag. 199. Rapporti di intensità di segnale HPLC di flavonoidi in campioni di propoli reali trattati con olio (Ris., 4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A401). I valori di “p-bil lib” e “p-bil 1” sono i parametri determinati dall’elaborazione con il test di normalità k-s, condotti rispettivamente lasciando liberi media e varianza e fissando media e varianza a 1 e 0,03. Dove un valore di intensità non è stato misurabile, e sono stati determinati solo tre rapporti, non è stato eseguito test k-s, e si è usato il valore di media e SD. In rosso i valori di media inaccettabili e i valori di p-bilaterale sotto 0,05

Galangina

	1A1	2A1	3A1	T1	T2	L2	L3
293/320	2,7403	3,3315	2,2048	2,4940	1,4	2,3590	1,3000
275/320	2,3191	2,7155	1,6945	2,4320	1,1	2,3787	1,6000
275/293	0,7934	0,7642	0,7205	0,9138	0,8	0,9450	1,2500
275/250	3,6962	3,4374	3,3729	8,8893	ND	3,9440	3,2000
293/250	4,8526	4,6858	4,8764	10,1289	ND	4,3456	2,7778
320/250	1,5938	1,2659	1,9905	3,6550	ND	1,6580	2,0000
Media	2,6659	2,7000	2,4766	4,7522	1,084	2,6050	2,0213
SD	1,4577	1,4622	1,4538	3,8064	0,296	1,3105	0,8068
p-bil lib	1,0000	0,9950	0,8770	0,7340	ND	0,8940	0,9710
p-bil 1	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	ND	0,0000	0,0000

Tabella A405. Continua da pag. 200. Rapporti di intensità di segnale HPLC di flavonoidi in campioni di propoli reali trattati con olio (Ris., 4), come rapporto rispetto ai valori di rapporti di intensità determinati con iniezioni di soluzioni standard (Tabella A401). I valori di “p-bil lib” e “p-bil 1” sono i parametri determinati dall’elaborazione con il test di normalità k-s, condotti rispettivamente lasciando liberi media e varianza e fissando media e varianza a 1 e 0,03. Dove un valore di intensità non è stato misurabile, e sono stati determinati solo tre rapporti, non è stato eseguito test k-s, e si è usato il valore di media e SD. In rosso i valori di media inaccettabili e i valori di p-bilaterale sotto 0,05

In base ai valori forniti dal test k-s, è stato possibile assegnare soltanto i picchi di quercetina ed apigenina. Il picco della galangina sembra molto contaminato, le possibili assegnazioni di kaempferolo e dalla crisina devono essere confermate. Per poter ottenere ulteriori informazioni, si è svolto il test k-s sui valori di ciascun rapporto su tutti i campioni. I valori sono riportati in tabella A406, e mostrano chiaramente che il picco coiniettato con la galangina è contaminato in maniera irrecuperabile, e non può essere attribuito univocamente, né utilizzato per l’analisi quantitativa. L’assegnazione della quercetina e dell’apigenina sono confermate. I valori relativi al kaempferolo mostrano che il segnale registrato a 293 nm è chiaramente contaminato, quelli relativi alla crisina mostrano che è molto contaminato il valore registrato a 275 nm.

Quercetina	293/320	275/320	275/293	275/250	293/250	320/250
Media	1,264	0,913	0,713	0,919	1,353	1,082
Varianza	0,055	0,033	0,009	0,028	0,072	0,091
P	0,950	0,923	0,906	0,999	0,903	0,823

Apigenina	293/320	275/320	275/293	275/250	293/250	320/250
Media	1,432	0,908	0,718	0,813	1,077	0,772
Varianza	0,088	0,030	0,004	0,076	0,095	0,042
P	0,974	0,986	0,997	0,631	0,800	0,665

Kaempferolo	293/320	275/320	275/293	275/250	293/250	320/250
Media	1,975	1,302	0,593	1,077	1,852	1,014
Varianza	0,436	0,151	0,022	0,065	0,509	0,262
P	0,991	0,982	0,180	0,959	0,990	0,771

Crisina	293/320	275/320	275/293	275/250	293/250	320/250
Media	1,134	1,745	1,534	1,413	0,936	0,821
Varianza	0,110	0,172	0,247	0,049	0,051	0,055
P	0,979	0,498	0,961	0,944	0,894	0,730

Galangina	293/320	275/320	275/293	275/250	293/250	320/250
Media	2,143	1,959	0,887	3,083	3,693	1,590
Varianza	0,413	0,277	0,027	0,370	0,819	0,106
P	0,844	0,545	0,704	0,915	0,694	0,861

Tabella A406. Valori medi di intensità di segnale sui singoli rapporti su tutti i campioni analizzati, e valore di p bilaterale proveniente dal test di normalità k-s

Sono stati quindi calcolati i valori medi per kaempferolo e crisina, picco per picco, eliminando il segnale più contaminato. Questa operazione consente di assegnare i due picchi, e di fare l'analisi quantitativa delle due specie (Tabella A407).

	Kaempferolo		Crisina	
	Media	Varianza	Media	Varianza
A1	1,1647	0,1888	0,8850	0,2687
T1	1,2327	0,4643	0,9645	0,2147
T2	1,2646	0,5279	1,2850	0,2714
L2	0,9550	0,2079	1,1266	0,5044
L3	1,5000	1,5000	0,9944	0,2584
1A1 tratt	0,8137	0,3606	0,8785	0,2783
2A1 tratt	1,1387	0,4544	1,0103	0,5240
3A1 tratt	1,1003	0,0852	0,9879	0,0284
T1 tratt	2,7117	1,4030	0,7542	0,0673
T2 tratt	1,4017	0,6339	1,4000	0,0000
L2 tratt	1,0760	0,7611	0,7672	0,1362
L3 tratt	1,0000	0,2828	0,8593	0,2825

Tabella A407. Valori medi dei rapporti di intensità di segnale HPLC picco per picco di kaempferolo e crisina in campioni di propoli reali tal quali e trattati con olio (vedi tabelle A404 ed A405), calcolati escludendo i valori di intensità registrati a 293 nm per il kaempferolo e a 275 nm per la crisina

Appendice 5 Determinazione di pinocembrina e CAPE in campioni di propoli raccolti nell'inverno 2007

Nel corso della caratterizzazione delle propoli raccolte nell'inverno 2007 (Parte sper., 4) non è stato possibile determinare quantitativamente CAPE e pinocembrina, perché con il metodo HPLC utilizzato coeluvano (Tabella M12). Poiché sono stati registrati i cromatogrammi a quattro lunghezze d'onda differenti, si è cercato di risalire al contenuto di queste due specie risolvendo i sei possibili sistemi di due equazioni a due incognite del tipo:

$$S_{\lambda 1} = C_{\text{CAPE}} * k_{\text{CAPE1}} + C_{\text{PC}} * k_{\text{PC1}}$$

$$S_{\lambda 2} = C_{\text{CAPE}} * k_{\text{CAPE2}} + C_{\text{PC}} * k_{\text{PC2}}$$

In questo sistema, $S_{\lambda 1}$ e $S_{\lambda 2}$ rappresentano i segnali registrati sul picco di interesse a due lunghezze d'onda tra le quattro usate per la registrazione, i valori di C_{CAPE} e C_{PC} rappresentano le concentrazioni delle due specie, e sono le incognite del sistema, ed infine i valori di k sono le pendenze delle rette di calibrazione HPLC per ciascuna specie a quella specifica lunghezza d'onda (Parte sper., 6.2.2.1). In tabella A501 sono riportati i valori di concentrazione analitica in soluzione che si ricavano dalla soluzione dei sei sistemi possibili, sia per i campioni tal quali sia per i campioni trattati con olio (Ris., 2.4.4; Ris., 4).

L'analisi dei valori riportati in tabella A501 mostra che solo i sistemi risolti con le coppie di segnali 250-275 nm e 250-293 nm producono risultati potenzialmente accettabili. I valori di concentrazione di ciascuna specie così determinati sono stati moltiplicati per il valore della retta di calibrazione alle due lunghezze d'onda non usate nella risoluzione di quel sistema. I valori di segnale così ottenuti per CAPE e pinocembrina sono stati sommati, e forniscono un valore di segnale che, se i valori forniti dal sistema di equazioni fossero corretti, dovrebbe coincidere con quello registrato sperimentalmente. Questi valori sono stati sottratti dall'intensità sperimentalmente del picco, e il risultato è stato ancora diviso per questo valore (Tabella A502). Se uno dei due sistemi avesse fornito il risultato corretto, questi valori dovrebbero essere tutti pari a zero.

(a)	250+275	250+293	250+320	275+293	275+320	293+320
A1	5,981661	15,99913	-1,67446	38,47794	22,94516	32,09383
T1	3,060046	13,43996	-1,49936	36,73206	13,16222	27,04465
T2	-0,19981	3,487136	-1,77031	11,76048	3,279929	8,274902
L2	3,781431	13,44793	-1,52157	35,13917	15,53118	27,08012
L3	3,033986	6,877059	-0,38327	15,50076	10,60553	13,48878
1A1 trattato	1,649402	8,139354	-1,54141	22,70255	8,719221	16,95528
2A1 trattato	4,027326	11,97223	-2,91095	29,80027	19,40032	25,5258
3A1 trattato	5,029919	15,21485	-3,03533	38,06943	22,89993	31,83463
T1 trattato	1,967344	2,092436	-0,94056	2,373136	8,410323	4,854473
T2 trattato	0,144908	3,086532	-0,69754	9,687417	2,011505	6,53255
L2 trattato	1,358509	3,722491	-1,40524	9,02717	7,48209	8,392128
L3 trattato	0,785521	1,928865	-0,56346	4,494482	3,774435	4,198536

(b)	250 +275	250 +293	250 +320	275 +293	275 +320	293 +320
A1	2,87016	-0,72919	5,621063	-69,5981	-34,9593	-50,0389
T1	4,167703	0,438121	5,805932	-70,9225	-18,3606	-41,2429
T2	3,36069	2,035943	3,924984	-23,3113	-4,39928	-12,6325
L2	3,083683	-0,38957	4,989093	-66,8456	-23,1188	-42,1548
L3	1,916788	0,535942	3,144634	-25,8847	-14,9681	-19,7205
1A1 trattato	3,515884	1,183994	4,662368	-43,4336	-12,2501	-25,8256
2A1 trattato	4,529312	1,674647	7,022288	-52,9456	-29,7532	-39,8498
3A1 trattato	6,181314	2,521789	9,079221	-67,4984	-33,6697	-48,3967
T1 trattato	2,018698	1,973752	3,06353	1,113764	-12,3495	-6,48837
T2 trattato	2,700656	1,643708	3,003355	-18,5796	-1,46195	-8,91395
L2 trattato	3,035178	2,185781	4,028214	-14,0663	-10,6207	-12,1207
L3 trattato	1,608343	1,197531	2,093043	-6,66282	-5,05708	-5,75612

Tabella A501. Valori di concentrazione analitica di (a) pinocembrina e (b) CAPE stimati in EEP di propoli tal quali e trattati con olio (Ris., 2.4.4; Ris., 4) risolvendo i sei sistemi possibili di due equazioni a due incognite

I valori in tabella **A502** mostrano chiaramente come anche i valori generati dai due sistemi 250-275 e 250-293 siano inaccettabili. Infatti, le differenze tra il segnale stimato e quello realmente misurato è molto importante, ed è molto probabile che questo problema dipenda dalla presenza di ulteriori specie interferenti che coeluiscono con le specie di interesse. L'esatta determinazione quantitativa di queste specie risulta quindi impossibile. E' stata stimata una concentrazione massima, assegnando tutto il segnale a 320 nm al CAPE e tutto il segnale a 275 nm alla pinocembrina. I valori stimati sono in tabella **A503**. I valori di CAPE possono essere confrontati con quelli determinati nella caratterizzazione delle propoli raccolte nell'inverno 2006 (Ris., **2.1.2**), dove tutti i valori sono dell'ordine dei 7000 µg/g sulla propoli solida, quindi i valori stimati sono tendenzialmente più alti di quanto atteso.

250-275	$\Delta S/S$ 293 nm	$\Delta S/S$ 320 nm
A1	6 5 , 0 -	5 4 , 3
T1	7 6 , 0 -	6 7 , 1
T2	8 7 , 0 -	1 0 , 2
L2	4 6 , 0 -	6 7 , 2
L3	8 4 , 0 -	5 7 , 1
1A1 trattato	-0,67	1,94
2A1 trattato	-0,56	4,02
3A1 trattato	-0,56	2,55
T1 trattato	-0,040	2,48
T2 trattato	-0,72	0,59
L2 trattato	-0,47	2,08
L3 trattato	-0,44	1,49

250-293	$\Delta S/S$ 275 nm	$\Delta S/S$ 320 nm
A1	6 1 , 1	6 9 , 7
T1	7 7 , 1	7 7 , 5
T2	7 3 , 2	3 7 , 6
L2	7 5 , 1	8 7 , 7
L3	3 8 , 0	2 7 , 3
1A1 trattato	1,69	5,88
2A1 trattato	1,10	8,63
3A1 trattato	1,10	5,77
T1 trattato	0,037	2,58
T2 trattato	1,82	2,63
L2 trattato	0,73	3,86
L3 trattato	0,64	2,76

Tabella A502. Rapporti di intensità calcolati come segue. I valori di concentrazione di ciascuna specie, determinati con i sistemi di equazioni, sono stati moltiplicati per il valore della retta di calibrazione alle due lunghezze d'onda non usate nella risoluzione di quel sistema. I valori di segnale per CAPE e pinocembrina sono stati sommati, sottratti dall'intensità sperimentale del picco, e il risultato è stato diviso sempre per questo valore.

Per quanto riguarda i valori stimati della pinocembrina, seppur sovrastimati, risultano però molto inferiori ai valori stimati spettrofotometricamente per flavanoni e diidroflavonoli totali (Tabella R13). Questo dato indica che la pinocembrina non è la specie preponderante di questa classe in composti in questi campioni di propoli, contrariamente a quanto è riportato in letteratura per la propoli di pioppo [38]. Devono quindi essere presenti anche altri flavanoni e diidroflavonoli in quantità molto più abbondante della pinocembrina, che rispondono al saggio con la 2,4 dinitrofenil idrazina. I risultati confermano come il picco in esame sia

contaminato da specie, che coeluiscono con CAPE e pinocembrina, e che interferiscono nell'analisi quantitativa a tutte le lunghezze d'onda usate.

Campione	C _{CAPE} (ppm)	C _{pinoc} (ppm)	C _{CAPE} (µg/g)	C _{pinoc} (µg/g)
A1	2,861	1,736	41260,5	25036,1
T1	3,335	2,023	34448,3	20896,2
T2	1,007	0,611	4777,3	2898,4
L2	2,481	1,505	27483,6	16671,8
L3	2,513	1,525	20068,7	12178,6
1A1 trattato	2,122	1,287	15939,0	9667,0
2A1 trattato	2,224	1,349	16705,1	10132,7
3A1 trattato	4,076	2,473	30616,0	18575,4
T1 trattato	1,513	0,918	7965,9	4833,3
T2 trattato	1,854	1,125	4473,2	2714,3
L2 trattato	1,712	1,039	9877,6	5994,6
L3 trattato	1,164	0,706	8069,1	4894,2

Tabella A503. Concentrazioni massime possibili per CAPE e pinocembrina sia nella soluzione analitica, in ppm, sia nella propoli solida, in µg/g, stimate assegnando l'intero segnale cromatografico sperimentale a 275 nm alla pinocembrina e l'intero segnale cromatografico sperimentale a 320 nm al CAPE, come se non ci fossero interferenze, usando per il calcolo le rette di taratura delle due specie

Ringraziamenti

La ricerca condotta nell'ambito del presente dottorato di ricerca non sarebbe stata possibile senza il contributo di tante altre persone.

Il Dott. Roberto Balducchi, direttore del gruppo BIOTEC-AGRO dell'ENEA, ha creduto al tema di ricerca affrontato, lo ha finanziato e supportato, ha appoggiato il lavoro e lo sviluppo del laboratorio di Chimica Analitica del gruppo BIOTEC-AGRO dell'ENEA Casaccia.

I relatori della tesi, la professoressa Maria Perla Colombini dell'Università di Pisa e il dottor Armando D'Andrea, ricercatore del gruppo BIOTEC-AGRO dell'ENEA Casaccia, mi hanno supportato fornendo preziosi consigli, e seguendo con attenzione e spirito critico e costruttivo lo svolgersi del lavoro sperimentale e la rielaborazione dei dati. Il controrelatore, il dottor Paolo Massanisso, ricercatore del gruppo PROT-CHIM dell'ENEA Casaccia, ha altresì fornito il suo supporto, consigliandomi e discutendo con me diversi aspetti dell'attività sperimentale. Mi ha inoltre introdotto e guidato nell'analisi gas cromatografica e nella rivelazione di massa, collaborando attivamente alla realizzazione delle analisi. La dottoressa Ilaria Bonaduce del Dipartimento di Chimica in Chimica Industriale dell'Università di Pisa mi ha aiutato nella messa a punto di metodi per la preparazione del campione nell'analisi gas cromatografica. Il dottor Alessandro Zini, ricercatore ENEA del gruppo PROT-ACS, mi ha aiutato ad impostare ed eseguire i test K-S necessari per la conferma delle assegnazioni di picco. Il dottor Luigi Nardi, ricercatore ENEA dell'unità PROT-ANT, è stato sempre disponibile ad aiutarmi sui più vari problemi pratici di chimica analitica.

Alcune strumentazioni non erano disponibili nel laboratorio, e sono state gentilmente messe a disposizione da laboratori ENEA ed Università di Pisa. Il dottor Carlo Cremisini, direttore del gruppo PROT-CHIM dell'ENEA ha permesso che la strumentazione gas cromatografica potesse essere usata per la sperimentazione. Lo spettrofotometro Cary UV-50 era a disposizione del gruppo PROT-ANT dell'ENEA Casaccia, ed il dott. Maurizio Casarci lo ha messo a disposizione per le misure. La strumentazione necessaria per la registrazione degli spettri IR era di proprietà dell'Università di Pisa, e la dottoressa Antonella Manariti mi ha aiutato sia nella preparazione delle misure, sia nella loro esecuzione e nella successiva elaborazione dei dati.

Presentazioni a congressi e corsi frequentati

Dal lavoro svolto, è stato possibile presentare i seguenti poster in diversi congressi internazionali:

Aliboni A., Colombini M.P., D'Andrea A., “*SPE-HPLC procedure for the determination of allergenic esters in propolis*”, presentato al congresso “HPLC 2007”, Natural Products and Food session, Gandes (Belgio), 17-21 giugno **2007**

Il poster è stato uno dei cinquanta finalisti per la scelta dei migliori poster del simposio

Aliboni A., Massanisso P., D'Andrea A., “*Extraction and HPLC analysis of low polarity esters in propolis*”, presentato al congresso “HPLC 2008”, Baltimora, MA (USA) May 10-16 **2008**

Aliboni A., D'Andrea A., Massanisso P., “*A novel process for the removal of two allergenic esters from propolis*”, presentato al congresso Green Process Engineering (GPE-EPIC 2009) Symposium, Venezia, Giugno **2009**

Aliboni A., D'Andrea A., “*HPLC analysis of propolis following a treatment aimed at the removal of some allergenic esters*”, presentato al congresso “HPLC 2009”, Dresda (Germania), 28 giugno- 2 luglio **2009**

Aliboni A., D'Andrea A., “*Treatment of propolis with supercritical carbon dioxide to remove some allergenic esters*”, accettato per la presentazione al 239° incontro ACS, San Francisco, CA (USA), 20-25 marzo **2010**

Sono inoltre stati frequentati i seguenti corsi:

“*Scuola nazionale di tecniche analitiche in spettrometria di massa*”, Università di Parma, Parma, maggio **2006**

“*Scuola nazionale di chimica analitica per studenti di dottorato*”, Roma, settembre **2006**

“*Scuola di chemiometria*”, Università di Genova, Genova, febbraio **2007**

