



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali

PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DI DERIVATI APICOLI  
E ALTRI ALIMENTI

Dottoranda:

Dott.ssa Sara Castiglioni

Relatore:

Prof.ssa Patricia Carloni

XXIX Ciclo - A.A. 2015/2016

## INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>STRESS OSSIDATIVO</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>RADICALI LIBERI</b> .....	<b>7</b>
3.1	<i>SPECIE REATTIVE: RNS E ROS</i> .....	9
3.1.1	Produzione nell'organismo .....	9
3.1.2	Effetto dei ROS sulle cellule .....	10
3.1.3	Classificazione.....	13
3.1.4	Influenza dei metalli .....	18
<b>4</b>	<b>ANTIOSSIDANTI</b> .....	<b>19</b>
4.1	<i>ANTIOSSIDANTI PREVENTIVI</i> .....	19
4.1.1	Enzimi .....	20
4.1.2	Chelanti dei metalli di transizione .....	21
4.2	<i>ANTIOSSIDANTI INTERRUPTORI DI CATENA (CHAIN-BREAKING)</i> .....	22
4.2.1	Antiossidanti per idrogeno donazione .....	23
4.2.2	Antiossidanti per trasferimento di elettroni .....	25
4.2.3	Antiossidanti per addizione .....	26
4.2.4	Antiossidanti per accoppiamento radicalico .....	27
4.3	<i>POLIFENOLI</i> .....	28
<b>5</b>	<b>METODI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ</b>	
	<b>ANTIOSSIDANTE</b> .....	<b>31</b>
5.1	<i>METODI AOA: APPROCCIO DIRETTO</i> .....	34
5.1.1	Metodi diretti basati sullo studio cinetico .....	34
5.1.2	Metodi diretti di competizione.....	36
5.1.2.1	TEST ORAC.....	37
5.2	<i>METODI AOA: APPROCCIO INDIRETTO</i> .....	39
5.2.1	TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) .....	40
5.2.2	Saggio DPPH.....	44
5.2.3	Contenuto in Polifenoli Totale (TPC).....	49
5.2.4	Metodo dell'alluminio cloruro per la determinazione dei flavonoidi.....	51
5.3	<i>SAGGIO DEL pH DIFFERENZIALE PER LA DETERMINAZIONE DELLE ANTOCIANINE MONOMERICHE</i> .....	53

<b>6</b>	<b>IL COLORE</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>ANALISI MULTIVARIATA</b> .....	<b>58</b>
7.1	<i>CLUSTER ANALISI</i> .....	59
7.2	<i>ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI (PCA)</i> .....	60
7.3	<i>ANALISI DISCRIMINANTE (DA)</i> .....	61
<b>8</b>	<b>IL MIELE</b> .....	<b>64</b>
8.1	<i>INTRODUZIONE</i> .....	64
8.1.1	Storia e uso.....	64
8.1.2	Definizione e composizione.....	65
8.1.3	Effetti benefici.....	67
8.1.4	Produzione.....	69
8.1.5	Colore.....	72
8.2	<i>ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E DEL COLORE DI MIELI UNIFLORALI ITALIANI</i> .....	74
8.2.1	Campioni.....	75
8.2.2	Materiali e metodi.....	77
8.2.2.1	Contenuto in Polifenoli Totale (TPC).....	77
8.2.2.2	Attività antiossidante (AA).....	78
8.2.2.3	Analisi del colore (Lovibond).....	80
8.2.2.4	Misura spettrofotometrica per l'analisi del colore.....	81
8.2.3	Analisi dei dati.....	81
8.2.4	Risultati.....	82
8.2.4.1	Contenuto in Polifenoli Totale (TPC).....	82
8.2.4.2	Attività antiossidante.....	85
8.2.4.3	Test ABTS.....	86
8.2.4.4	Test DPPH.....	88
8.2.4.5	Analisi del colore (Lovibond).....	90
8.2.4.6	Misurazione spettrofotometrica per l'analisi del colore.....	92
8.2.5	Discussione.....	93
8.2.6	Analisi multivariata.....	94
8.2.6.1	Cluster Analisi.....	95
8.2.6.2	Analisi delle componenti principali (PCA).....	97

8.2.7	Conclusioni.....	102
8.3	<i>ANALISI DELL'ATTIVITÁ ANTIOSSIDANTE E DEL COLORE DI MIELI MULTIFLORALI MARCHIGIANI.....</i>	<i>104</i>
8.3.1	Introduzione.....	104
8.3.2	Campioni.....	108
8.3.3	Materiali e metodi.....	110
8.3.4	Risultati.....	111
8.3.5	Analisi multivariata.....	118
8.3.6	Conclusioni.....	124
<b>9</b>	<b>IL POLLINE.....</b>	<b>125</b>
9.1	<i>STRUTTURA.....</i>	<i>125</i>
9.2	<i>COMPOSIZIONE.....</i>	<i>130</i>
9.3	<i>EFFETTI TERAPEUTICI.....</i>	<i>133</i>
9.4	<i>CARATTERIZZAZIONE DI POLLINI UNIFLORALI E STUDIO DELL'ATTIVITÁ ANTIOSSIDANTE E DEL COLORE.....</i>	<i>135</i>
9.4.1	Campioni.....	136
9.4.2	Materiali e metodi.....	154
9.4.2.1	Analisi pollinica.....	155
9.4.2.2	Umidità.....	156
9.4.2.3	Contenuto proteico.....	157
9.4.2.4	Granulometria.....	158
9.4.2.5	Analisi del colore (CIE L*a*b).....	158
9.4.2.6	Preparazione estratti di polline.....	159
9.4.2.7	Contenuto Totale in Polifenoli (TPC).....	159
9.4.2.8	Attività antiossidante (AA).....	160
9.4.2.9	Analisi dei dati.....	163
9.4.3	Risultati.....	164
9.4.4	Analisi multivariata.....	179
9.4.4.1	Cluster Analisi.....	180
9.4.5	Conclusione.....	183
9.5	<i>STUDIO DELLA VARIABILITÁ STAGIONALE DELLA COMPOSIZIONE BOTANICA E DELL'ATTIVITÁ ANTIOSSIDANTE DI POLLINI MULTIFLORALI PROVENIENTI DA DIVERSE ZONE GEOGRAFICHE DELLE MARCHE (ITALIA).....</i>	<i>184</i>
9.5.1	Campioni.....	186

9.5.2	Materiali e metodi.....	190
9.5.3	Risultati .....	190
9.5.3.1	Analisi pollinica.....	190
9.5.3.2	Contenuto proteico.....	193
9.5.3.3	Granulometria .....	194
9.5.3.4	Umidità .....	195
9.5.3.5	Colore .....	195
9.5.3.6	Attività Antiossidante .....	197
9.5.3.7	Apiario Ascoli Piceno (AP) .....	200
9.5.3.8	Apiario Isola del Piano (PU).....	208
9.5.3.9	Apiario Matelica (MC) .....	217
9.6	<i>ANALISI MULTIVARIATA DI POLLINI UNIFLORALI E MULTIFLORALI PER MEZZO DELL'ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI (PCA).</i> .....	225
9.6.1	Conclusioni.....	229
<b>10</b>	<b>IL TÈ.....</b>	<b>232</b>
10.1	<i>INTRODUZIONE.....</i>	<i>232</i>
10.2	<i>INFLUENZA DELLE CONDIZIONI DI INFUSIONE (TEMPO, TEMPERATURA E DIMENSIONE) SULLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI E LE CARATTERISTICHE SENSORIALI DI ALCUNI TÈ BIANCHI E VERDI .....</i>	<i>234</i>
10.2.1	Campioni e infusione.....	236
10.2.2	Materiali e metodi.....	238
10.2.2.1	Preparazione degli estratti .....	238
10.2.2.2	Contenuto in Polifenoli Totale (TPC) .....	239
10.2.2.3	Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC).....	240
10.2.2.4	Attività antiossidante (AA) .....	240
10.2.2.5	Analisi sensoriale .....	241
10.2.2.6	Analisi dei dati .....	243
10.2.3	Risultati .....	246
10.2.3.1	Contenuto in Polifenoli Totali (TPC).....	249
10.2.3.2	Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC).....	251
10.2.3.3	Attività antiossidante (AA) .....	252
10.2.3.4	Valutazione sensoriale .....	256

10.2.4	Conclusione .....	262
<b>11</b>	<b>LA MELAGRANA .....</b>	<b>264</b>
<i>11.1</i>	<i>CULTIVAR.....</i>	<i>265</i>
11.1.1	Cultivar Asiatiche.....	265
11.1.2	Cultivar Europee.....	267
11.1.3	Cultivar Americane .....	269
11.1.4	Cultivar Africane .....	270
<i>11.2</i>	<i>COMPOSIZIONE CHIMICA DELLA MELAGRANA.....</i>	<i>271</i>
11.2.1	Antiossidanti.....	274
<i>11.3</i>	<i>CARATTERISTICHE SENSORIALI .....</i>	<i>277</i>
<i>11.4</i>	<i>EFFETTI BENEFICI.....</i>	<i>278</i>
<i>11.5</i>	<i>ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI SUCCHI DI ARILIE E DI POLPE DI MELAGRANE DI DIVERSA CULTIVAR E ORIGINE GEOGRAFICA.....</i>	<i>280</i>
11.5.1	Campioni .....	280
11.5.2	Materiali e metodi.....	287
11.5.2.1	Preparazione dei campioni .....	287
11.5.2.2	Contenuto in Polifenoli Totali (TPC).....	288
11.5.2.3	Attività antiossidante .....	289
11.5.2.4	Analisi dei dati .....	292
11.5.3	Risultati .....	293
11.5.3.1	Contenuto in Polifenoli Totali (TPC).....	296
11.5.3.2	Attività Antiossidante .....	300
11.5.3.3	Contenuto Totale di Antociani (TAC) .....	304
11.5.3.4	pH e Solidi solubili totali .....	306
11.5.4	Conclusioni.....	310
<b>12</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>313</b>
<b>13</b>	<b>SITOGRAFIA .....</b>	<b>331</b>

# 1 INTRODUZIONE

La mia tesi di Dottorato intitolata “Proprietà antiossidanti di derivati apicoli e altri alimenti” ha l’obiettivo di investigare le proprietà antiossidanti di matrici alimentari. Da più di venti anni sono stati riconosciuti i potenziali effetti benefici degli antiossidanti sulla salute e ciò ha stimolato la ricerca allo scopo di determinare quali alimenti contengono il più alto contenuto di antiossidanti (Schaich K. M. et al., 2015).

Gli antiossidanti sono sostanze che, anche se presenti in basse concentrazioni, sono in grado di ridurre o ritardare significativamente l’ossidazione di un substrato biologico prevenendo così il fenomeno dello “stress ossidativo” correlato a una lunga serie di danni cellulari (Halliwell B., 1995).

I radicali liberi e nella fattispecie le specie reattive all’ossigeno (ROS) e all’azoto (RNS) sono i principali responsabili del danno ossidativo di componenti cellulari quali proteine, enzimi, acidi nucleici e lipidi. Tali specie sono prodotte naturalmente dall’organismo (catena di trasporto mitocondriale e sistema fagocitario) oppure possono essere generate da fattori esogeni (fumo, stress, assunzione di farmaci, alimentazione squilibrata, ecc.): essi, se presenti in eccesso, non possono essere sufficientemente contrastati dalle normali difese antiossidanti presenti nell’organismo che possono essere di natura endogena (principalmente enzimatica) e/o esogena (introduzione di antiossidanti attraverso la dieta alimentare) provocando il cosiddetto “stress ossidativo”.

Lo stress ossidativo promuove o influenza una lunga lista di patologie. Per questi motivi ricercatori di tutto il mondo sono intenti a studiare, quantificare e caratterizzare gli antiossidanti presenti in matrici alimentari.

Gli antiossidanti sono presenti in una vasta gamma di alimenti come la frutta fresca (melograno, agrumi, frutti rossi, oliva, ecc.) e secca, la verdura (es. melanzane), i cereali, i legumi e le bevande (es. tè, vino, caffè, birra) derivate da essi (Gheldof N. et al., 2002).

La mia tesi di Dottorato comprenderà lo studio e l'analisi di diverse matrici alimentari ma sarà per lo più incentrata sui prodotti apicoli (miele e polline) i quali negli ultimi anni hanno ricevuto molto interesse da parte dei ricercatori e dei consumatori sempre più interessati e attenti al mantenimento della salute anche attraverso una corretta alimentazione che prevede l'assunzione di alimenti di elevata qualità, talvolta con proprietà funzionali.

Dalla letteratura si evince infatti che i derivati apicoli contengono numerose sostanze fitochimiche in grado di aumentare le difese contro lo stress ossidativo creando una barriera in grado di proteggere l'organismo umano (Alvarez-Suarez et al., 2010a).

Il settore apicolo sta sempre più assumendo inoltre un ruolo importante in ambito agroalimentare, come evidenziato dal Reg. (UE) 1308/2013 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 dicembre 2013 che riporta "L'organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli", il quale stabilisce delle misure per lo sviluppo del settore in merito alla

programmazione 2014-2016 e ha stanziato per l'Italia circa 2.8 milioni di euro all'anno per i 3 anni. Due delle suddette misure sono rivolte al sostegno dei laboratori di analisi sul miele e a programmi di ricerca applicata al settore. Da ciò emerge il rilievo che l'Unione Europea attribuisce allo sviluppo di tale settore.

## 2 STRESS OSSIDATIVO

Il termine “stress ossidativo” coniato negli ultimi anni, definisce l’insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche quando queste rimangono esposte, anche per un breve periodo, a un eccesso di specie ossidanti (tra cui ROS e RNS) sia endogene (prodotti da reazioni metaboliche come nel sistema di trasporto di elettroni mitocondriale durante la produzione di ATP o da un’inappropriata attivazione dei fagociti, quando sono in corso patologie croniche infiammatorie) che esogene (provenienti da fattori ambientali come fumo, stress, alimentazione scorretta e assunzione di farmaci) non sufficientemente contrastate dai sistemi di difesa antiossidante endogeni (enzimatici) ed esogeni (alimentazione) (Figura 1) (Flora S. J. S., 2009, Corti A. et al., 2009).

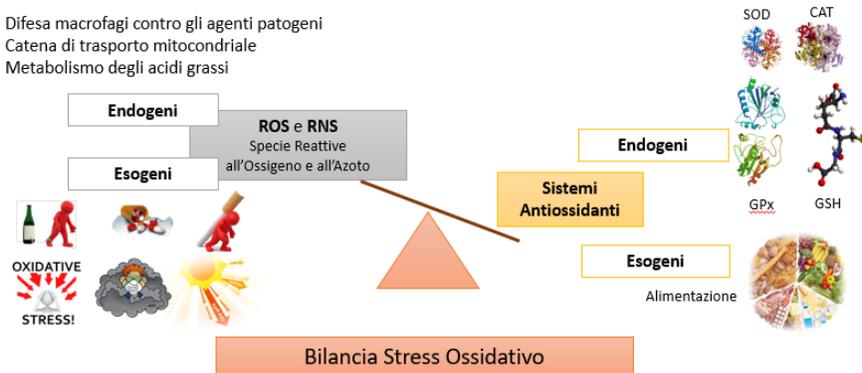


Figura 1: Bilancia dello stress ossidativo: radicali e antiossidanti a confronto.

Un corretto bilanciamento tra le specie chimiche reattive e quelle antiossidanti (il cosiddetto equilibrio ossido riduttivo o equilibrio *redox*) è infatti essenziale per tutta una serie di funzioni fisiologiche. Lo stress ossidativo influenza una lunga lista di patologie in continuo aggiornamento (Tabella 1). Quando si verificano squilibri sostanziosi, facilmente si può incorrere infatti nell'insorgenza di disfunzioni, patologie, danni cellulari, apoptosi o necrosi (Corti A. et al., 2009) Questi squilibri possono essere causati dalla produzione di specie reattive in quantità superiore rispetto alla capacità di difesa antiossidante insita nell'organismo e/o da una riduzione di efficienza dei sistemi di difesa influenzati talvolta da una carenza nutrizionale.

<p><b>Processi infiammatori</b>            Alcune glomerulonefriti            Malattie autoimmuni            Artrite reumatoide</p> <p><b>Ischemia-riperfusion</b>            Infarto del miocardio            Ictus            Trapianti d'organo</p> <p><b>Patologie ematologiche</b>            Anemia falciforme            Favismo            Anemia di Fanconi            Malaria            Danno da farmaci</p> <p><b>Patologie della pelle</b>            Porfirie            Danno da radiazioni</p>	<p><b>Patologie respiratorie</b>            Effetti del fumo di sigaretta            Enfisema            Danno iperossico            Fibrosi cistica            Tossicità da ozono, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>            ARDS            Asbestosi            Fibrosi polmonare</p> <p><b>Patologie cardiovascolari</b>            Miocardiopatia alcolica            Aterosclerosi            Ipertensione            Cardiotossicità della doxorubicina</p> <p><b>Patologie renali</b>            Effetti cronici della terapia dialitica            Tossicità da metalli pesanti</p>	<p><b>Patologie neurologiche</b>            Morbo di Alzheimer            Morbo di Parkinson            Sclerosi multipla            Distrofie muscolari            Tossicità da alluminio            Encefalopatia allergica            Emorragia cerebrale</p> <p><b>Patologie oculari</b>            Cataratta            Degenerazioni retiniche</p> <p><b>Altre patologie</b>            Diabete            Alcolismo            Danno epatico tossico            Pancreatite acuta</p> <p><b>Invecchiamento</b></p>
--	---	---

Tabella 1: Principali patologie in cui è stata riscontrata l'influenza dello stress ossidativo (Corti A. et al., 2009).

Non si è ancora stabilito con certezza se lo stress ossidativo sia: la causa iniziale di un processo patologico; un fattore che insieme ad altri contribuisce alla progressione del danno cellulare; solo l'effetto finale del processo.

Lo stress ossidativo si potrebbe comunque rivelare un possibile utile biomarcatore nel monitoraggio preventivo delle malattie oppure un valido elemento per ipotizzare una diagnosi clinica (Corti A. et al., 2009).

### 3 RADICALI LIBERI

Per definizione i radicali liberi sono specie (atomi o molecole) capaci di esistenza indipendente e caratterizzati dalla presenza di uno o più elettroni spaiati (Flora S. J. S., 2009). Questa definizione, non specificando esattamente la posizione dell'elettrone spaiato, permette di classificare la maggior parte dei metalli di transizione come radicali liberi (Flora S. J. S., 2009). La presenza dell'elettrone spaiato rende le specie radicaliche generalmente molto instabili quindi fortemente reattive e poco selettive, in quanto tendono, in modo più o meno spiccato, a strappare un elettrone da un'altra molecola non radicalica al fine di completare la configurazione stabile dell'ottetto. La molecola a cui viene strappato l'elettrone a sua volta si trasforma in un altro radicale più o meno stabile. Fanno eccezione a tutto ciò i radicali persistenti, che hanno un tempo di vita più lungo tanto da poter essere isolati e caratterizzati con maggior facilità. La persistenza è correlata alla bassa reattività del radicale dovuta ad una elevata delocalizzazione dell'elettrone spaiato e alla presenza di gruppi che creano un ingombro sterico intorno ad esso. Tutti i radicali che non posseggono tali caratteristiche hanno un tempo di vita più corto e per questo sono definiti "transienti".

Le reazioni che vedono protagonisti i radicali sono chiamate "radicaliche", e procedono solitamente con un meccanismo a catena che consiste in tre fasi: l'iniziazione, la propagazione e la terminazione (Figura 2). Un tipico esempio di tale processo è la reazione di

perossidazione lipidica che procede appunto attraverso queste fasi: nell'iniziazione si genera un radicale centrato al carbonio (R•); questo partecipa alla fase di propagazione reagendo velocemente con una molecola di ossigeno e originando un perossi radicale (ROO•). Il perossi radicale a sua volta per stabilizzarsi come idroperossido (ROOH), strappa un atomo di idrogeno a un'altra molecola lipidica generando un nuovo radicale alchilico che propaga la catena ossidativa. La fase di terminazione si verifica quando i radicali si trasformano in specie stabili (Ingold et al., 2014).

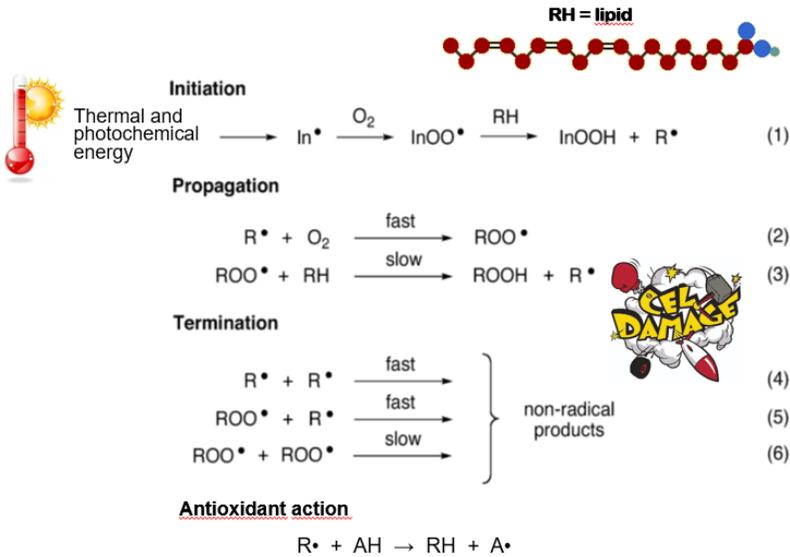


Figura 2: Esempio di reazione radicalica a catena: perossidazione lipidica e azione antiossidante.

L'iniziazione, che permette la formazione del primo radicale può avvenire attraverso la scissione omolitica di un legame covalente.



Questo meccanismo di scissione può essere promosso dalla luce (fotolisi), dal calore (termolisi) o dalle radiazioni ionizzanti (radiolisi).

Un altro modo attraverso il quale si possono formare i radicali è attraverso una reazione di *ossidazione-riduzione* che prevede il trasferimento di elettroni.



Queste reazioni coinvolgono spesso gli ioni dei metalli di transizione.

### **3.1 SPECIE REATTIVE: RNS E ROS**

#### ***3.1.1 Produzione nell'organismo***

È noto che l'ossigeno è un componente essenziale per gli organismi viventi aerobi (Lee J. et al., 2004). Il 90% dell'ossigeno presente nell'organismo è consumato dai mitocondri delle cellule per produrre energia, ossidando per via enzimatica i principi nutritivi. Per effettuare questa trasformazione, l'ossigeno molecolare (di per sé non tossico) viene sottoposto a una serie di riduzioni durante le quali si producono degli intermedi altamente instabili, reattivi e tossici, che vengono

indicati come ROS (Reactive Oxygen Species) (Flora S. J. S: et al., 2009; Lee J. et al., 2004).

I ROS sono prodotti anche durante il metabolismo degli acidi grassi polinsaturi a partire dall'acido arachidonico (acido eicosapentenoico) e durante la produzione degli eicosaenoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni) che svolgono importanti funzioni a livello dell'apparato vascolare. Un altro caso in cui la produzione di radicali liberi è considerata fisiologica e utile all'organismo, è quello che si realizza nei macrofagi, nei quali il radicale superossido viene utilizzato come "killer" per eliminare batteri e virus potenzialmente patogeni. Naturalmente in tutti i casi in precedenza descritti parliamo di ROS endogeni. Esistono anche ROS esogeni la cui produzione è riconducibile a una serie di fattori comportamentali quali fumo, eccessivo consumo di alcolici, esercizio fisico intenso, stress e assunzione di alcuni farmaci (quali gli antipiretici e i chemioterapici), e ambientali come l'esposizione alle radiazioni solari, in particolare quelle ultraviolette, e l'inquinamento atmosferico.

### ***3.1.2 Effetto dei ROS sulle cellule***

Sembra che le specie reattive all'ossigeno siano una delle principali cause responsabili dell'invecchiamento insieme allo stile di vita, alle condizioni ambientali e ai fattori genetici. Infatti, queste specie possono causare l'ossidazione dei lipidi e delle proteine, e la rottura dei filamenti

e delle basi di DNA (Figura 3) con conseguenze sulla modulazione dell'espressione genica (Lee J. et al., 2004).

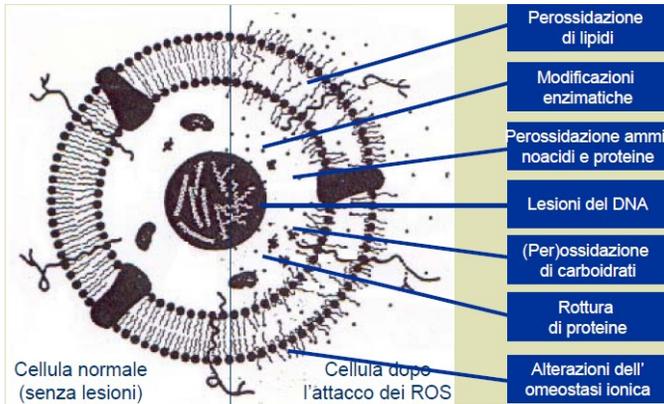


Figura 3: Cellula normale e cellula lesionata dai ROS: a confronto.

Alcuni dei substrati biologici oggetti ad ossidazione per opera dei radicali sono i seguenti.

I lipidi, principalmente i fosfolipidi che costituiscono il doppio strato della membrana plasmatica (Lee J. et al., 2004), che vengono danneggiati attraverso la reazione di perossidazione lipidica, innescata da un radicale generato per termolisi, fotolisi o radiolisi, e favorita dalla presenza di ossigeno (condizioni aerobiche). La presenza di acidi grassi polinsaturi dà luogo a strutture maggiormente vulnerabili all'attacco del radicale, in quanto il prodotto della reazione (radicale lipidico) è stabilizzato per risonanza. I prodotti di ossidazione lipidica sembrano

essere coinvolti nelle malattie epatiche e cardiovascolari (per ossidazione delle LDL, lipoproteine plasmatiche a bassa densità trasportatrici di colesterolo) nel diabete, nell'aterosclerosi e nei processi d'inflammatione (Lee J. et al., 2004). Inoltre, il sistema nervoso centrale è particolarmente vulnerabile nei confronti del processo di perossidazione lipidica a causa delle elevate quantità di ossigeno richieste dal metabolismo neuronale e dall'elevato contenuto di acidi grassi insaturi nei fosfolipidi delle membrane cellulari e mieliniche (Corti A. et al., 2009).

Le proteine, e in particolare le catene laterali amminoacidiche che sono attaccate dai radicali i quali determinano la loro frammentazione o la formazione di legami crociati tra le proteine. La modificazione delle proteine altera i sistemi di trasporto, l'attività enzimatica, i meccanismi di traduzione del segnale ed è coinvolta in malattie come aterosclerosi e ischemia (Lee J. et al., 2004).

Il DNA, sia nucleare che mitocondriale: quest'ultimo è più vulnerabile per la carenza delle proteine protettive (istoni). I radicali ossidando la guanosina (guanina e ribosio) o la timina, determinano mutazioni del DNA molto dannose, tanto da produrre la comparsa di tumori. Nei soggetti colpiti da un forte stress ossidativo dovuto al fumo o a infiammazioni croniche come l'artrite reumatoide, la produzione di DNA ossidato è superiore rispetto ai sistemi di riparazione e quindi avvengono fenomeni di mutagenesi e/o carcinogenesi (Lee J. et al., 2004).

### 3.1.3 Classificazione

Come già accennato i radicali si distinguono in ROS (Reactive Oxygen Species) e RNS (Reactive Nitrogen Species) (Figura 4).

I ROS si suddividono a loro volta in due classi: radicali centrati all'ossigeno e molecole non radicaliche. Nel primo gruppo troviamo il radicale superossido, il radicale idrossile, l'alcossi radicale, e il perossi radicale. Nel secondo troviamo il perossido di idrogeno e l'ossigeno singoletto che non sono radicali.

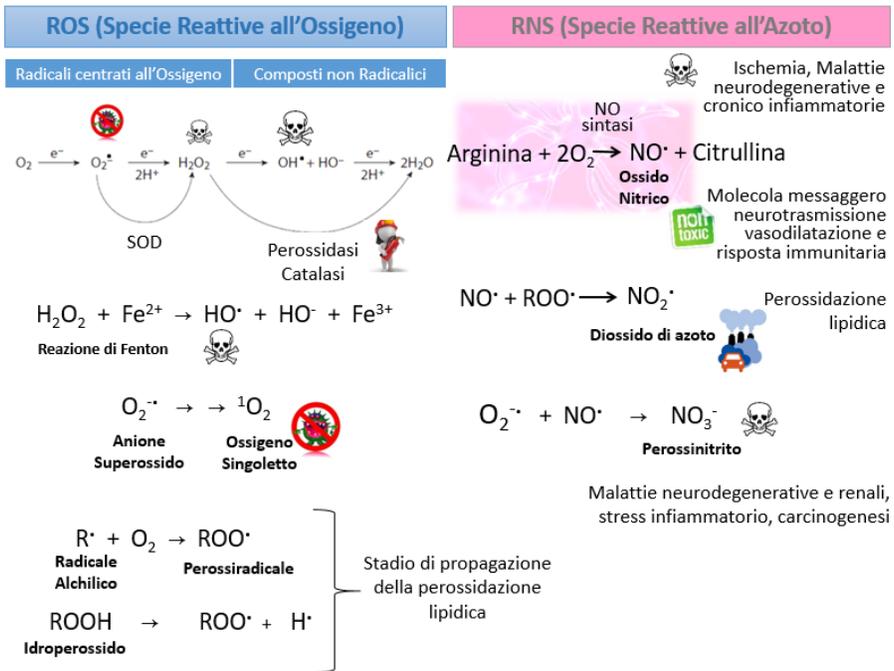


Figura 4: Trasformazione dell'ossigeno molecolare in ROS e formazione dei RNS.

Il *radicale superossido* ( $O_2^{\cdot-}$ ) è la prima specie che si forma durante la riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua, a livello della catena respiratoria mitocondriale e microsomiale, ma ha una reattività piuttosto bassa in quanto minimizzata dalla sua compartimentazione biologica (incapacità di superare la membrana biologica) e dall'attività dell'enzima *superossido dismutasi* (SOD) che, in presenza di protoni, converte tale anione in ossigeno e perossido di idrogeno. Tuttavia può evolvere in specie più reattive quindi più dannose come il perossido di idrogeno e il radicale idrossile.

Il *perossido di idrogeno* ( $H_2O_2$ ) nonostante sia uno dei ROS meno reattivi è dannoso soprattutto quando interagisce con ioni metallici allo stato ridotto come il  $Fe^{2+}$  o il  $Cu^+$  per formare il radicale idrossile, molto più reattivo (reazione di Fenton). Il perossido di idrogeno è tossico verso gli eritrociti in quanto ha una capacità di lisi nei loro confronti anche a basse concentrazioni. Grazie agli enzimi *catalasi* e *glutathione perossidasi* è possibile prevenire i danni causati da questo radicale decomponendo l'acqua ossigenata in acqua e ossigeno.

Il *radicale idrossile* ( $OH^{\cdot}$ ), molto dannoso per i sistemi biologici, è uno dei radicali più reattivi e meno selettivi in quanto è in grado di strappare molto facilmente gli atomi di idrogeno delle molecole con le quali entra a contatto. I danni causati dal radicale idrossile possono essere diminuiti prevenendo la sua formazione, attraverso il sequestro degli ioni

metallici nello stato di ossidazione più basso, responsabili dell'avvio della reazione di Fenton. Il radicale idrossile può essere originato, non solo attraverso la reazione di Fenton, ma anche dalla reazione di Haber-Weiss tra l'anione superossido e il perossido di idrogeno oppure dall'irraggiamento dei tessuti biologici con raggi  $\gamma$  che provocando la rottura omolitica dei legami covalenti dell'acqua, portando alla formazione di radicali idrossili e idrogeno.

Come già accennato, *l'ossigeno singoletto* ( $^1\text{O}_2$ ) non è un radicale ma uno stato eccitato dell'ossigeno molecolare quindi pur sempre una forma reattiva dell'ossigeno. Normalmente l'ossigeno in natura si trova sotto forma di molecole biatomiche nello stato di tripletto (stato fondamentale) le quali assorbendo una sufficiente quantità di energia possono invertire lo spin, di uno dei due elettroni spaiati, ed accoppiarlo all'altro in un orbitale  $\pi$  di anti-legame. Il passaggio dell'ossigeno dal suo stato fondamentale a quello eccitato è possibile in presenza di sostanze foto-sensibilizzanti in grado di assorbire e trasferire l'energia delle radiazioni luminose. L'interazione di luce, sostanze foto-sensibilizzanti e ossigeno, costituisce il principale punto di partenza per la formazione dell'ossigeno singoletto (Cabras P. et al., 2004). Nei sistemi biologici, l'ossigeno singoletto può formarsi in diversi modi come per dismutazione spontanea del radicale superossido o per interazione di quest'ultimo con il radicale idrossile o con l'acqua ossigenata. Inoltre, si può anche formare durante il processo di

perossidazione. Nonostante l'ossigeno singoletto possa danneggiare molti substrati d'interesse biologico, rispetto ad altre specie reattive dell'ossigeno, è piuttosto mite e non eccessivamente tossico. Nell'organismo umano può essere anche sfruttato come "un'arma" terapeutica contro vari agenti patogeni quali microrganismi, virus e cellule tumorali (Lee J. et al., 2004).

I *radicali perossilici* ( $\text{ROO}\bullet$ ) si possono formare dalla reazione diretta tra l'ossigeno molecolare e un radicale alchilico oppure dalla rottura omolitica dei tetrossidi per opera delle radiazioni UV o di metalli di transizione, determinando anche la formazione di radicali *alcossilici* ( $\text{RO}\bullet$ ) (Lee J. et al., 2004). Questi radicali sono i propagatori delle catene di autossidazione come la perossidazione lipidica.

Tra le **RNS** troviamo l'ossido nitrico, il biossido di azoto e il perossinitrito.

L'*ossido nitrico* ( $\text{NO}\bullet$ ), comunemente detto monossido di azoto è un radicale poco reattivo che ad elevate concentrazioni, può determinare ischemia, malattie croniche infiammatorie e neurodegenerative (Lee J. et al., 2004). Tuttavia non possiede solo effetti tossici; è anche un messaggero che svolge un importante ruolo nella neurotrasmissione, vasodilatazione e nella risposta del sistema immunitario (Flora S. J. S. et al., 2009). È sintetizzato enzimaticamente dall'L-arginina per opera

del NO sintetasi presenti nel tessuto nervoso o epiteliale (Flora S. J. S., 2009; Lee J. et al., 2004).

Dalla reazione tra l'ossido nitrico e un radicale perossile si forma il *bioossido di azoto* ( $\text{NO}_2\bullet$ ), talvolta presente nell'aria inquinata (Lee J. et al., 2004).

Il *perossinitrito* ( $\text{NO}_3^-$ ) si origina a partire dal radicale superossido e ossido nitrico. Per la sua elevata permeabilità nelle membrane cellulari è considerato un radicale tossico per i tessuti biologici; ossida il DNA e le proteine tra cui le lipoproteine (LDL) probabilmente coinvolte nell'insorgenza dell'aterosclerosi. Sembra essere coinvolto in malattie neurodegenerative e renali.

L'organismo umano, quando si trova in buone condizioni di salute, possiede le difese necessarie per contrastare la tossicità dei ROS e degli RNS ed in alcune condizioni è in grado addirittura di sfruttare la loro tossicità a suo favore nel contrasto dell'azione di microrganismi indesiderati e di cellule tumorali.

### ***3.1.4 Influenza dei metalli***

Studi approfonditi effettuati negli ultimi decenni hanno dimostrato che i metalli come ferro, cadmio, cromo, mercurio, arsenico e piombo possiedono la capacità di produrre specie reattive. Tra questi l'arsenico è uno degli elementi più tossici in quanto può produrre diverse specie reattive all'ossigeno e all'azoto. Anche il piombo può causare stress ossidativo generando specie reattive all'ossigeno (Flora S. J. S., 2009).

## 4 ANTIOSSIDANTI

Definiamo come antiossidante “qualsiasi sostanza che, presente in concentrazione molto bassa rispetto a quella di un substrato ossidabile, è in grado di ritardare o inibire significativamente l’ossidazione di quel substrato” (Halliwell B., 1995).

Gli antiossidanti possono essere classificati in base al loro meccanismo di azione (Choe E. et al., 2009; Damiani E. et al., 2008) come preventivi, quali enzimi e specie chelanti dei metalli di transizione, o come interruttori di catena (chain-breaking) per idrogeno donazione, addizione, trasferimento elettronico e accoppiamento radicalico.

### 4.1 ANTIOSSIDANTI PREVENTIVI

(Damiani E., et al., 2008; Damiani E. et al., 2003; Prior R. L., 2005)

Per antiossidanti preventivi intendiamo quei composti che impediscono la formazione dei radicali che iniziano le reazioni di perossidazione radicalica (Figura 5).

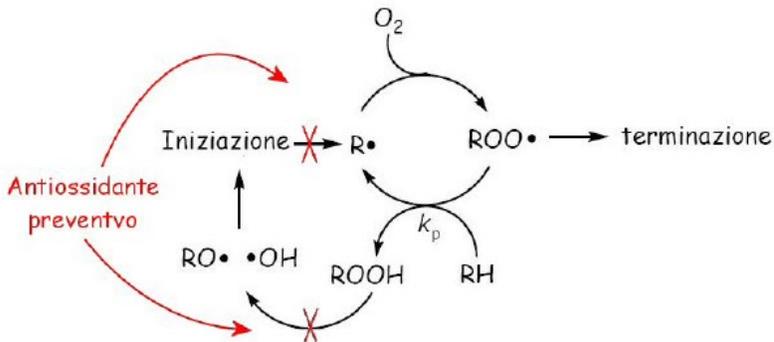
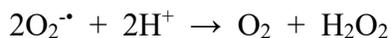


Figura 5: Meccanismo d'azione di un antiossidante preventivo.

### 4.1.1 Enzimi

In questa classe di antiossidanti rientrano gli enzimi come la superossido dismutasi, la catalasi e la glutazione perossidasi (Flora S. J. S., 2009).

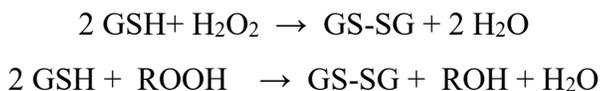
L'enzima *superossido dismutasi* (SOD) come visto in precedenza catalizza molto velocemente la reazione di dismutazione dello ione superossido in specie meno reattive.



La *catalasi* (CAT) è un enzima molto efficiente nel promuovere la dismutazione del perossido d'idrogeno in acqua e ossigeno molecolare.



La *glutathione perossidasi* (GPx), invece, è uno dei meccanismi di difesa antiossidante più essenziali che agisce sul perossido d'idrogeno in eccesso. Si tratta di un enzima selenio-dipendente che converte il H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o gli idroperossidi organici rispettivamente in acqua o alcoli (ROH) attraverso l'ossidazione del glutathione ridotto (GSH). Di seguito le due reazioni



#### ***4.1.2 Chelanti dei metalli di transizione***

Per chelanti dei metalli di transizione s'intendono dei composti in grado di bloccare, riducendone la concentrazione gli ioni metallici liberi che sono spesso precursori delle reazioni di ossidazione lipidica, rallentando la formazione di specie radicaliche. Infatti è noto che gli ioni metallici, in particolare Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>+</sup>, sono cofattori enzimatici essenziali in molti sistemi ossido-riduttivi. Essi agiscono facilitando il trasferimento elettronico a molecole biologiche e possono quindi catalizzare il processo ossido-riduttivo. Un esempio del ruolo degli ioni metallici si ha nella reazione di Fenton, in cui gli ioni ferrosi agiscono da elettrone-donatori e il perossido di idrogeno da elettrone-accettore.



Tra gli antiossidanti preventivi ad azione chelante in vivo possiamo includere la transferrina e la ferritina, due enzimi in grado di complessare selettivamente il  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ . Anche l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) che forma complessi forti con la maggior parte degli ioni metallici, è molto utilizzato soprattutto nell'industria alimentare come conservante, come tra l'altro l'acido citrico. Infine, non meno importanti, anche i polifenoli possiedono spesso un'azione preventiva in quanto in grado di chelare i metalli di transizione ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ ).

## **4.2 ANTIOSSIDANTI INTERRUZZORI DI CATENA (CHAIN-BREAKING)**

(Damiani E. et al., 2008; Damiani E. et al., 2003)

Gli antiossidanti "interruttori di catena" bloccano la catena ossidativa durante la fase di propagazione (Figura 6).

Le caratteristiche fondamentali degli antiossidanti chain-breaking sono due: reagiscono con i radicali propagatori di catena più velocemente del substrato; danno origine a radicali stabili che non danno inizio ad altre catene ossidative.

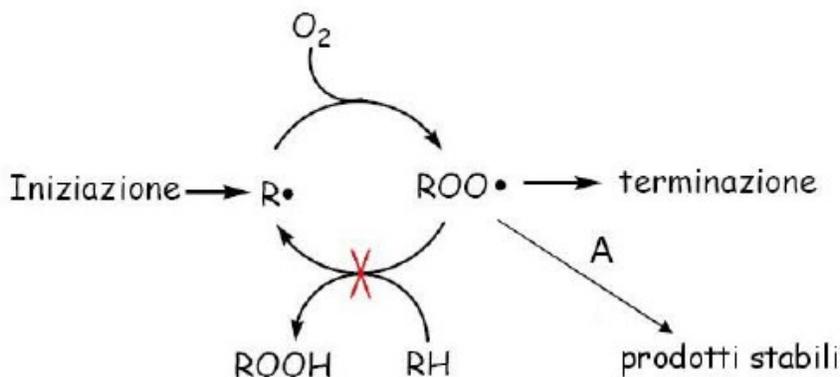
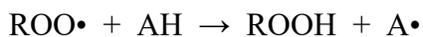


Figura 6: Meccanismo d'azione degli antiossidanti interruttori di catena (chain-breaking).

#### 4.2.1 Antiossidanti per idrogeno donazione

Gli antiossidanti per idrogeno donazione (Hydrogen Atom Transfer, HAT) sono quelli che interrompono la catena radicalica donando un atomo di idrogeno ai radicali perossili (Figura 7).



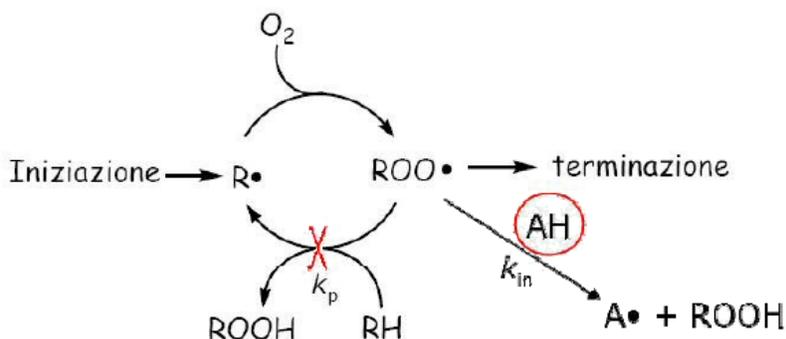
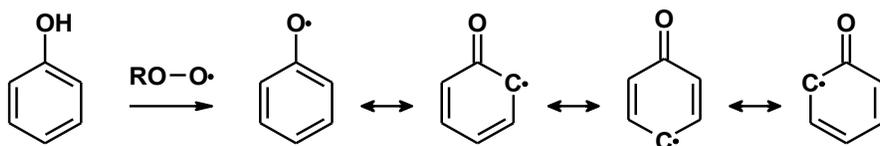


Figura 7: Antiossidanti per idrogeno donazione.

La reazione di idrogeno estrazione da parte di un perossi radicale su un antiossidante può avvenire a condizione che l'energia di dissociazione di legame (BDE) del legame A-H, sia inferiore alla BDE del legame ROO-H.

Gli antiossidanti più comuni che agiscono con meccanismo di idrogeno donazione sono quelli a struttura fenolica dai quali si forma un fenossiradicale stabile grazie alla delocalizzazione dell'elettrone sull'anello benzenico.



Tra gli antiossidanti più comuni che reagiscono per idrogeno donazione troviamo i polifenoli, il BHT (butilidrossitoluene), il BHA (butilidrossianisolo), l'acido caffeico, la vitamina C e la vitamina E (Ingold K. U. et al., 2014).

### 4.2.2 Antiossidanti per trasferimento di elettroni

Gli antiossidanti possono anche inibire il processo perossidativo trasferendo un elettrone al radicale perossile (SET – Single electron transfer) per formare una specie neutra e un radicale catione stabile ( $AH\cdot^+$ ) (Figura 8).

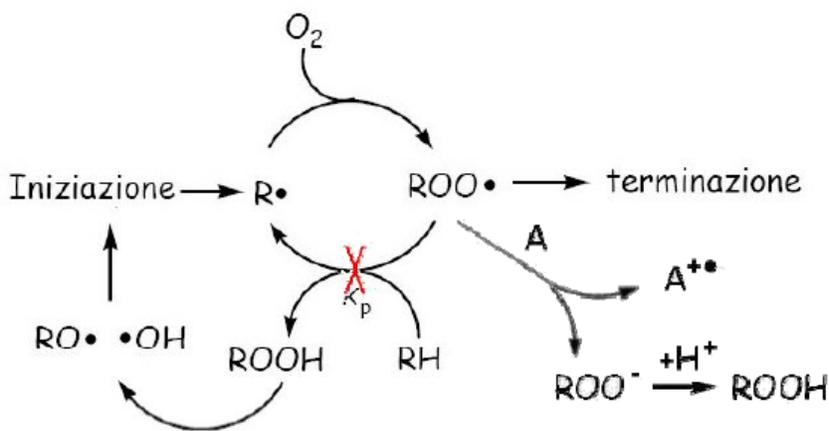


Figura 8: Meccanismo antiossidante per trasferimento elettronico.

### 4.2.3 Antiossidanti per addizione

I radicali che si formano durante il processo perossidativo possono addizionarsi a specie contenenti dei doppi legami (A) dando radicali (ROOA•) fortemente stabilizzati per risonanza (Figura 9).

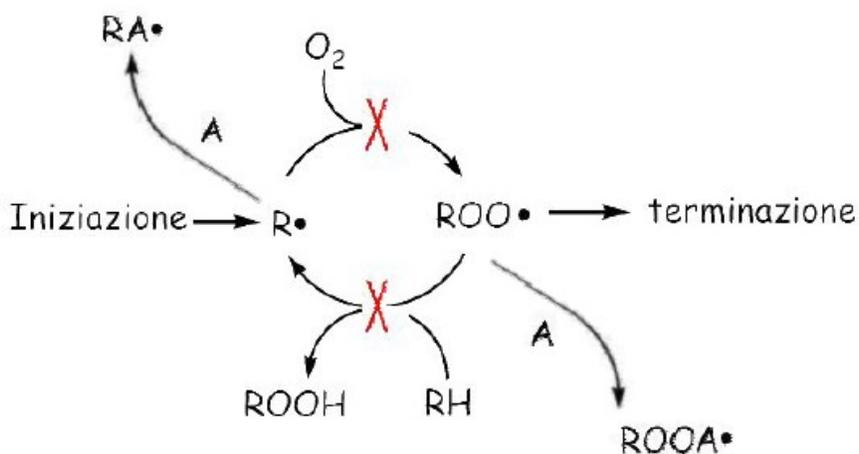


Figura 9: Meccanismo antiossidante per addizione.

In questo caso l'antiossidante inibisce il processo di perossidazione intrappolando il radicale attraverso una reazione di addizione.

#### 4.2.4 Antiossidanti per accoppiamento radicalico

I radicali che si formano durante il processo perossidativo possono essere bloccati reagendo con antiossidanti che sono essi stessi dei radicali ( $A\bullet$ ) ma persistenti per dare specie neutre (ROOA) come mostrato in Figura 10.

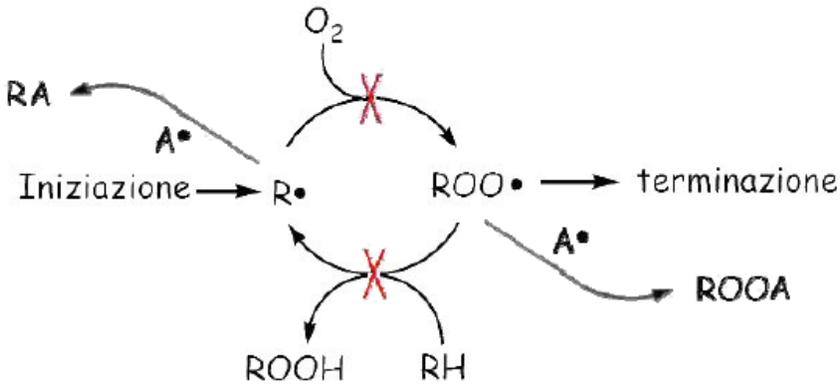


Figura 10: Antiossidanti per accoppiamento radicalico.

Tutti i radicali formati durante il processo perossidativo possono essere inattivati attraverso l'accoppiamento radicalico con altre specie radicaliche anche se a causa della loro elevata reattività, la concentrazione delle specie radicaliche è molto bassa e lo è quindi anche la probabilità che queste incontrino altri radicali. Tuttavia, se la specie radicalica è persistente l'accoppiamento diventa possibile.

Per concludere possiamo affermare che l'attività antiossidante, indipendentemente dal meccanismo attraverso il quale si esplica, viene spiegata attraverso la disattivazione o l'intrappolamento di specie reattive all'ossigeno (ROS) da parte dell'antiossidante.

### **4.3 POLIFENOLI**

I polifenoli costituiscono una famiglia di circa 5000 molecole organiche largamente presenti nel regno vegetale che derivano principalmente dal metabolismo secondario delle piante (Figura 11). Dal punto di vista chimico, i polifenoli sono molecole composte da uno o più anelli fenolici condensati.

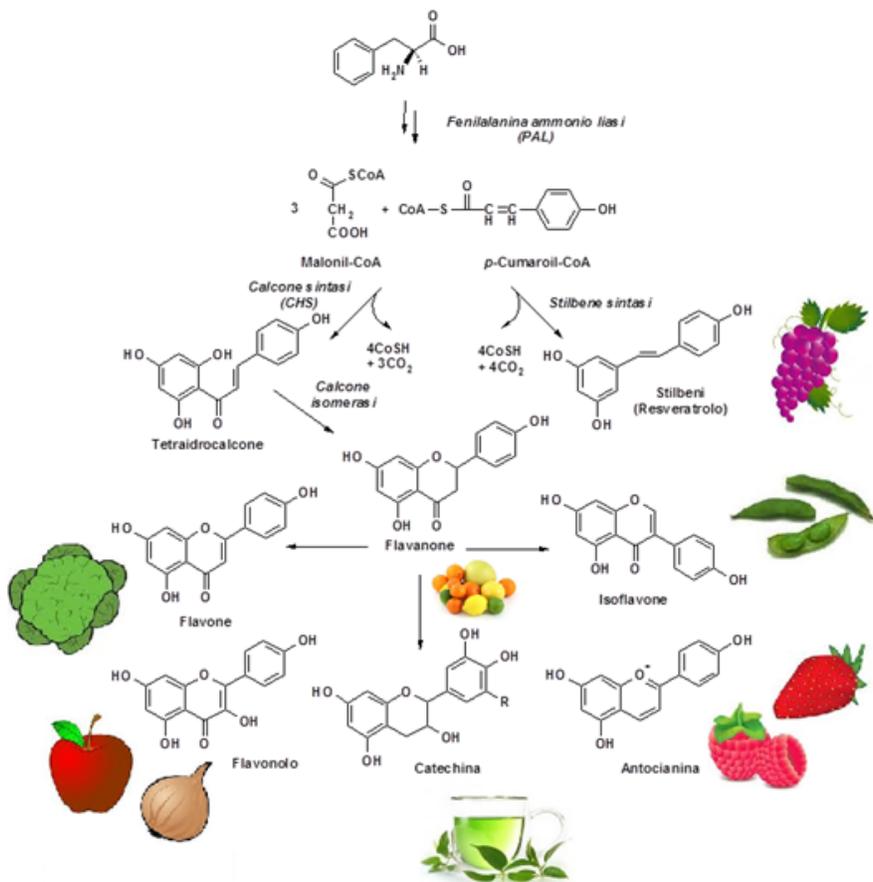


Figura 11: Schema della sintesi di una classe di polifenoli: i flavonoidi.

I polifenoli contengono più di un gruppo ossidrilico che può essere facilmente ossidato monoelettronicamente: essi vengono quindi consumati prima e al posto di biomolecole (lipidi, proteine/enzimi, acidi nucleici, ecc.) che verrebbero alterate da tale reazione e subirebbero una modifica della propria struttura e quindi della propria funzionalità (biologica-nutrizionale), che potrebbe rivelarsi patologica.

Diversi studi dimostrano che alcune sostanze fenoliche hanno proprietà protettive per la salute umana nei confronti di tumori, malattie cardiovascolari e degenerative, osteoporosi, diabete, ecc. Inoltre i polifenoli possono influenzare in maniera importante le proprietà organolettiche degli alimenti (aroma, sapore e colore).

Nei sistemi biologici vegetali le sostanze fenoliche presentano vari ruoli funzionali:

- ✓ sono essenziali per la crescita e la riproduzione;
- ✓ hanno funzione isolante e impermeabilizzante (lignina, cutina, suberina);
- ✓ conferiscono struttura e stabilità meccanica (lignina);
- ✓ contribuiscono alla pigmentazione, fungendo da mediatori per l'impollinazione poiché attraggono gli insetti;
- ✓ hanno funzione deterrente nei confronti dei predatori erbivori, ai quali risulta sgradevole il gusto astringente conferito dai tannini in alcuni frutti;
- ✓ proteggono dalle radiazioni ultraviolette e dallo stress ossidativo;
- ✓ hanno funzione di fitoalessine, ossia molecole dotate di attività antipatogena (Castiglioni S., A.A. 2011/2012).

## 5 METODI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

L'azione di un antiossidante dipende da due fattori:

- a) Il numero di siti attivi presenti, che si identifica con la “capacità antiossidante”, che rappresenta il numero totale di elettroni donati o le molecole bersaglio convertite per mole di antiossidante al termine della reazione, in determinate condizioni. Questo di solito corrisponde per gli antiossidanti fenolici al numero di gruppi ossidrilici.
- b) La reattività o potenziale dell'antiossidante e cioè la velocità con la quale reagisce, che dipende sia dall'ingombro sterico del sito reattivo dell'antiossidante sia dalla sua stabilità cioè la tendenza del sito attivo a reagire (legata all'energia necessaria per rompere il legame tra O e H del gruppo ossidrilico nei polifenoli) (Schaich K. M. et al., 2015).

Sfortunatamente non esiste un test che riesca a misurare contemporaneamente tutti questi parametri.

Teoricamente gli antiossidanti a struttura polifenolica contenenti molti gruppi ossidrilici dovrebbero dare risultati di elevata capacità antiossidante, in quanto contengono diversi siti reattivi, ma questo valore non considera la velocità con la quale possono reagire che potrebbe essere lentissima, quindi ritardare notevolmente la loro azione.

Quando si confrontano due antiossidanti sarebbe quindi corretto tener conto anche della cinetica della loro reazione in quanto, come mostrato ad esempio nella Figura 12, a tempi diversi, l'azione di antiossidanti a struttura e reattività diversa può risultare invertita. Al tempo  $t_1$  l'antiossidante A (contenente meno siti reattivi ma che reagisce più velocemente) rallenta la perossidazione in modo più efficace rispetto all'antiossidante B (contenente più siti reattivi ma che reagisce meno velocemente); al tempo  $t_3$  la situazione è esattamente rovesciata e risulta più efficace l'antiossidante B. Infine confrontando le due specie al tempo  $t_2$  non si evidenziano delle differenze. Da ciò deriva l'importanza di confrontare l'azione di diversi antiossidanti utilizzando gli stessi metodi.

Inoltre come già accennato sopra non esiste un metodo che prende in esame l'insieme di questi fattori e in letteratura i termini capacità e reattività spesso vengono utilizzati come sinonimi; tuttavia in genere si parla di attività antiossidante. È quindi per questo importante anche utilizzare più metodi per confrontare l'azione di diversi antiossidanti.

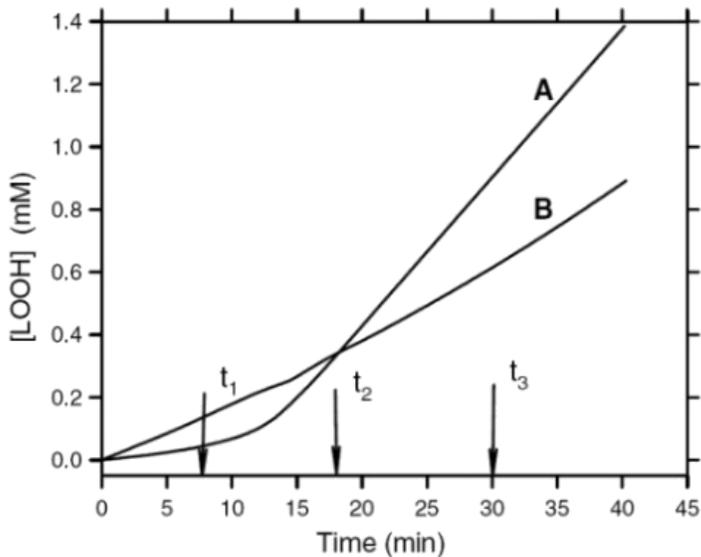


Figura 12: Azione a diversi tempi di antiossidanti diversi.

In generale per attività antiossidante (*AntiOxidant Activity*) si intende quindi la capacità di un composto (o di un sistema) di inibire la degradazione ossidativa. Questa può essere descritta attraverso:

- la misura della reattività dell'antiossidante nei confronti dei radicali che propagano la catena ossidativa;
- la misura della durata dell'azione antiossidativa che è data dalla capacità dell'antiossidante di bloccare più di un radicale propagatore.

La determinazione dell'attività antiossidante può essere effettuata utilizzando due diversi approcci: diretto o indiretto.

I metodi diretti studiano l'effetto degli antiossidanti sulla degradazione ossidativa di un dato sistema (si valuta dunque come l'antiossidante interviene nel processo). Questi danno una misura più realistica della capacità antiossidante di un sistema anche se spesso sono difficilmente ripetibili e di difficile interpretazione.

I metodi indiretti studiano processi che non sono direttamente associati con la vera degradazione ossidativa di un substrato biologico (si studia la reattività intrinseca dell'antiossidante nei confronti di alcuni radicali).

## **5.1 METODI AOA: APPROCCIO DIRETTO**

Nell'approccio diretto si promuove la degradazione ossidativa di un dato substrato e si studia l'effetto dovuto alla presenza dell'antiossidante. Tra i substrati di ossidazione troviamo: lipidi, proteine, DNA o specie biologicamente rilevanti contenenti lipidi, come il plasma sanguigno, le LDL, le membrane biologiche, ecc. Tra questi metodi troviamo quelli basati sullo studio cinetico del processo di perossidazione dei lipidi e i metodi diretti di competizione.

### ***5.1.1 Metodi diretti basati sullo studio cinetico***

Questi metodi studiano come varia la cinetica del processo di perossidazione in presenza di un antiossidante.

Naturalmente per ottenere risultati veritieri si devono tenere in considerazione le diverse variabili che possono essere modificate al fine di influenzare il processo di perossidazione quali:

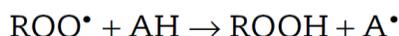
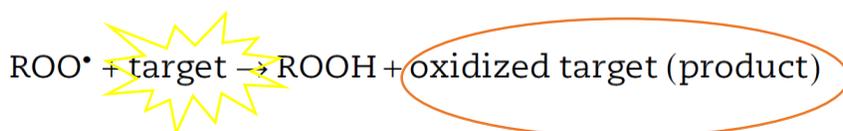
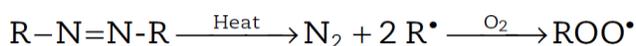
- ✓ il tipo di perossidazione (autossidazione spontanea che difficilmente si utilizza a causa della scarsa ripetibilità, o reazione a catena controllata che permette di ottenere, dati affidabili, ripetibili e facilmente interpretabili);
- ✓ il substrato di ossidazione che viene scelto in funzione delle caratteristiche del campione (liposolubili o idrosolubili). Preferibilmente si sceglie un substrato semplice come l'acido linoleico. È sconsigliato l'uso di miscele di lipidi;
- ✓ il tipo di iniziatore che può essere un azo-composto termolabile (AAPH o AMVN) o i metalli di transizione ( $\text{Cu}^+$ );
- ✓ la velocità d'iniziazione che è uno dei parametri più importanti che devono essere determinati in ogni saggio che usi il modello della reazione a catena controllata;
- ✓ il monitoraggio della perossidazione (in continuo misurando i dieni coniugati o il consumo di ossigeno, oppure utilizzando marker per misurare lo stadio finale del processo come la malondialdeide, o le TBARS) (Roginsky V. et al., 2005).

Tra i test più utilizzati troviamo lo studio dell'ossidazione delle LDL attraverso il monitoraggio della formazione di dieni coniugati e il test basato sul monitoraggio delle TBARS (sostanze reattive all'acido

tiobarbiturico - TioBarbituric Acid Reactive Substances) su sistemi lipidici ossidati come la fosfatidilcolina o l'acido linoleico.

### 5.1.2 Metodi diretti di competizione

Sono metodi basati sullo studio della cinetica di processi non a catena. La reazione consiste nel generare un radicale per riscaldamento di un azo-composto termolabile che si decompone portando alla formazione di due radicali centrati al carbonio (R•) i quali in presenza di ossigeno, sono convertiti a una velocità controllata dalla diffusione in radicali perossilici. Il saggio si basa sulla competizione tra l'antiossidante e una molecola target (monitorabile) cromofora a reagire con i perossi radicali. La presenza nel campione di un antiossidante, interruttore di catena, ritarda il decadimento del segnale della molecola target. Tanto più il substrato sarà "intatto", vale a dire non ossidato, tanto maggiore sarà la capacità antiossidante del campione (Roginsky V. et al., 2005).



Esistono diversi saggi di questo tipo che si differenziano per la molecola target di utilizzo o per la modalità con cui viene misurata l'attività antiossidante:

- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
- Metodo Spin trapping
- TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)
- Sbiancamento Crocina
- $\beta$ -carotene bleaching

Ora approfondiremo uno di questi test che personalmente ho potuto utilizzare nell'ambito della mia tesi di dottorato per l'analisi di pollini d'ape e di succhi e polpe di melagrane.

#### 5.1.2.1 *TEST ORAC*

In questo saggio (Ghiselli A. et al., 1995) si misura la degradazione ossidativa di una molecola fluorescente, la fluoresceina o la ficoeritrina. La reazione di ossidazione viene innescata da azo-iniziatori come l'AAPH che producono perossi radicali che ossidano la molecola target, attenuandone la fluorescenza.

La presenza di un campione contenente un antiossidante interruttore di catena ritarda la diminuzione della fluorescenza della molecola. Il fluorimetro misura la fluorescenza per un determinato periodo e i

risultati sono riportati in un grafico (Figura 13) definito come curva di decadimento (intensità di fluorescenza vs tempo).

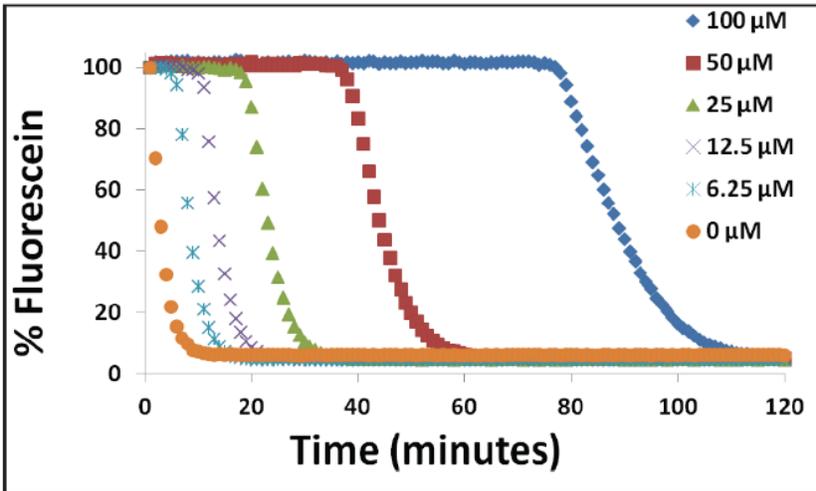


Figura 13: Curve cinetiche di decadimento della fluorescenza di campioni a diversa concentrazione di antiossidante.

Nel protocollo ORAC, l'AOA è misurata come *Oxygen Radical Absorbance Capacity*. Per la sua determinazione si calcola l'area sottesa dalla curva (AUC, Area Under Curve) quantificata attraverso la seguente equazione:

$$AUC = 1 + \frac{f_1}{f_0} + \frac{f_2}{f_0} + \frac{f_3}{f_0} + \frac{f_4}{f_0} + \dots + \frac{f_n}{f_0}$$

Dove  $f_0$  è la lettura di fluorescenza all'inizio della reazione (tempo 0) e  $f_n$  è l'ultima lettura della misurazione.

La differenza tra l'area calcolata per il campione in esame e quella per il campione di controllo (non addizionato con l'antiossidante) prende il

nome di Net AUC e viene utilizzata per la determinazione dell'ORAC in riferimento ad uno standard.

Questo protocollo è stato ampiamente utilizzato per testare antiossidanti fenolici naturali e campioni alimentari come tè, vegetali e frutta.

Tra i vantaggi troviamo: si misura la reattività dell'antiossidante nei confronti dei perossi radicali che sono i radicali che agiscono durante il processo di perossidazione nei sistemi biologici; la possibilità di utilizzare il test sia con antiossidanti lipofili che idrofili (modificando il solvente, la molecola target, la fonte radicalica) e il fatto che può essere facilmente automatizzato per analisi di routine.

Tra gli svantaggi abbiamo che il test richiede un controllo delle condizioni di reazione (es. temperatura) per garantire una riproducibilità e accuratezza dei risultati e che la chimica della reazione non è ben definita quindi è difficile standardizzare i protocolli (Schaich K. M. et al., 2015).

## **5.2 METODI AOA: APPROCCIO INDIRETTO**

Nell'approccio indiretto si misura la capacità di un antiossidante di reagire con determinati radicali liberi o la reattività nei confronti dei metalli di transizione e quindi si studiano processi che non sono direttamente associati con la vera degradazione ossidativa di un substrato biologico. Si utilizzano pertanto dei radicali liberi stabili o dei

composti che danno un'ossidazione monoelettronica e che assumono una colorazione nella regione del visibile.

In questa categoria possiamo distinguere diversi test:

- Saggio TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) che utilizza il radicale catione dell'ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico));
- Saggio DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl);
- FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power);
- Saggio Folin-Ciocalteu per la misura dei polifenoli totali;
- Metodo dell'alluminio cloruro per la misura dei flavonoidi;
- Saggio della Ferrozina (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfonic acid monosodium salt hydrate) per la misura dell'attività chelante.

### ***5.2.1 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)***

(Moon J. K. et al., 2009; Prior R. L. et al., 2005; Re R. et al., 1999)

Questo saggio è stato messo a punto da Miller N. J., (1993) con la finalità di analizzare la capacità antiossidante di campioni biologici. La possibilità di poterlo utilizzare sia in sistemi acquosi che lipofili, lo rende uno dei metodi indiretti più comunemente utilizzati per l'analisi di composti fenolici idrosolubili di origine naturale ed alimentare.

Il metodo si basa sul monitoraggio del decadimento dell'assorbanza del radicale catione cromoforo  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-solfonato)) avente una colorazione blu-verde (Figura 14).

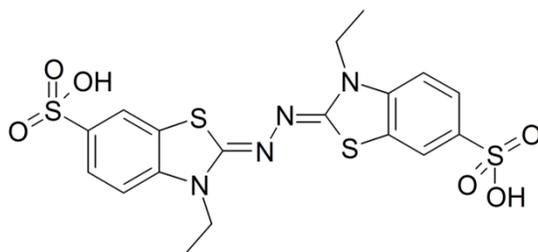


Figura 14: Struttura dell'ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-solfonato)).

L' $\text{ABTS}^{\bullet+}$  può essere generato per ossidazione utilizzando diversi metodi ma di solito per lo studio di campioni alimentari viene utilizzato come agente ossidante il potassio persolfato ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ).

Per quanto riguarda invece la lunghezza d'onda di analisi, nonostante il radicale presenti massimi di assorbimento alle lunghezze d'onda 414, 645, 734 e 815 nm, la determinazione a 734 nm è quella che viene preferita poiché minimizza le interferenze dovute alla presenza di altri componenti e alla torbidità del campione.

Il radicale catione in assenza di composti fenolici è abbastanza stabile; quando sono presenti composti antiossidanti donatori di atomi di H o di elettroni, il radicale si riduce trasformandosi in una forma non colorata. Di conseguenza tanto maggiore è la concentrazione di antiossidanti nel sistema, tanto più la soluzione si decolora. La quantità di  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  consumata nella reazione, è espressa in relazione ad un antiossidante di

riferimento, che è di consuetudine il Trolox (Figura 15), come Trolox Equivalenti o come TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). I Trolox Equivalenti esprimono la concentrazione di Trolox che dà la stessa percentuale d'inibizione del campione in esame. La percentuale d'inibizione dell'assorbanza a 734 nm viene calcolata con la seguente formula:

$$\% \text{ In } A_{734} = (1 - A/A_0) * 100$$

dove A è la media dell'assorbanza del campione preso in esame e A<sub>0</sub> è la media dell'assorbanza del controllo vale a dire di tutti i reagenti fatta eccezione per l'antiossidante.

Il TEAC esprime invece la concentrazione di antiossidante che dà la stessa percentuale d'inibizione di una soluzione 1mM di Trolox.

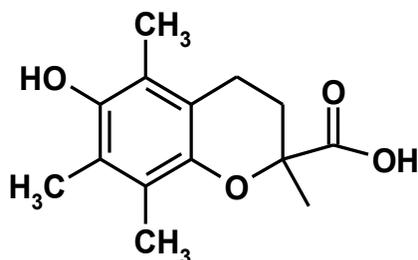


Figura 15: Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico).

Uno dei maggiori vantaggi di questo test è la sua semplicità che lo rende facilmente applicabile per analisi di routine in ogni laboratorio.

Tra i svantaggi sottolineiamo che:

- l'ABTS essendo un radicale grande, stericamente impedito, non rappresenta bene i piccoli radicali altamente reattivi (es. HO•, NO•, O<sub>2</sub>•, LO(O)•) presenti nei tessuti biologici e negli alimenti (limitazione valida per tutti i test indiretti);
- il radicale non è disponibile commercialmente, ma deve essere preparato in situ;
- la reazione di molti composti fenolici con l'ABTS è abbastanza lenta e il test non tiene conto della velocità della reazione che dipende del meccanismo (HAT o SET), dalla struttura elettronica e dall'ingombro sterico del sito reattivo dell'antiossidante. Ne consegue che il risultato del test può essere influenzato dal tempo d'incubazione e dal rapporto tra la quantità di campione e la concentrazione di ABTS<sup>+</sup>•;
- è un metodo molto sensibile alla temperatura e alla luce.

In particolare confrontando diverse concentrazioni di un singolo antiossidante, in alcuni casi, si può notare che l'ossidazione viene ritardata in modo non proporzionale alla concentrazione dell'antiossidante (Figura 16). Questo accade in presenza di antiossidanti che hanno una struttura complessa o in miscele il cui l'ingombro sterico del sito reattivo, la presenza di più gruppi idrossilici fenolici e il meccanismo per trasferimento di un atomo di idrogeno, non

sono omogenei mentre nel caso di piccole molecole la risposta al test è pressoché proporzionale alla concentrazione.

Per questi motivi alcuni autori sconsigliano l'uso di questo test per confrontare antiossidanti di struttura diversa, ma piuttosto per monitorare in un alimento il cambiamento del contenuto in antiossidanti causato dal trattamento o dalla conservazione.

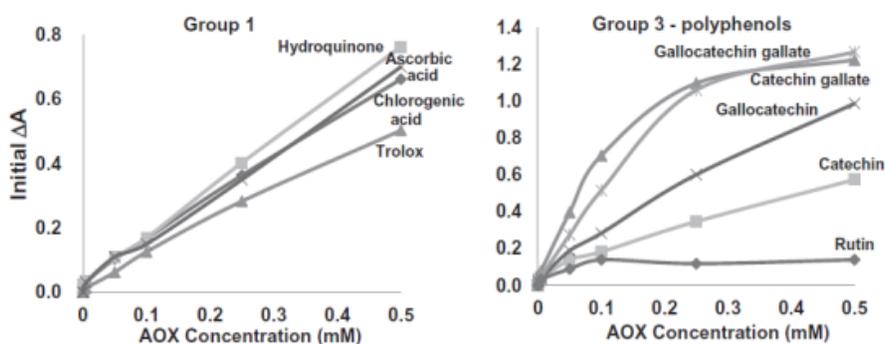


Figura 16: Risposta al test ABTS rispetto alla concentrazione degli antiossidanti con struttura semplice (sinistra) e complessa (destra).

### 5.2.2 Saggio DPPH

(Moon J. K. et al., 2009; Prior R. L. et al., 2005)

Questo test prevede l'utilizzo del radicale all'azoto DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile), un radicale persistente di sintesi intensamente colorato di violetto che si riduce quando reagisce con i composti donatori di H come i fenoli presenti nella matrice alimentare, decolorandosi (Figura

17). Il suo decadimento può essere valutato sia per via spettrofotometrica in quanto mostra un picco di assorbimento massimo alla lunghezza d'onda di 515 nm, che per via spettrometrica attraverso la risonanza di spin elettronico (EPR). Rispetto al radicale  $ABTS^{+\bullet}$ , il radicale  $DPPH\bullet$  è più selettivo.

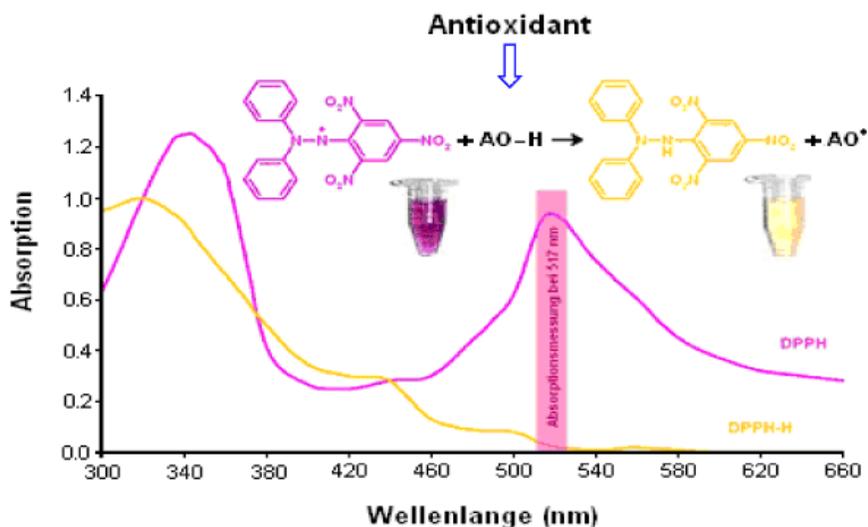


Figura 17: Spettro di assorbimento del radicale DPPH.

Sono state messe a punto due versioni del test, dinamica e statica: nella prima si determina la reattività dell'antiossidante misurando la velocità iniziale di decadimento del DPPH che si osserva dopo l'aggiunta dell'antiossidante (Figura 18 a).

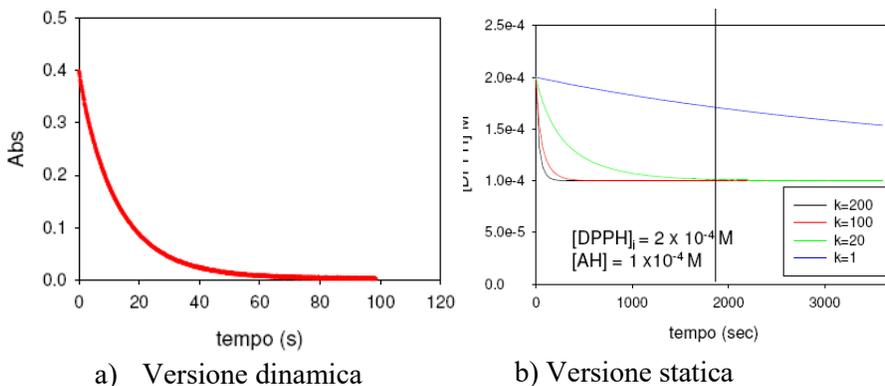


Figura 18: Versione dinamica e statica del test DPPH.

Invece, nella versione statica (Figura 18b) si determina la quantità di DPPH che ha reagito con il campione dopo un certo tempo. In questa versione, il potere H-donatore del campione testato è espresso solitamente come  $IC_{50}$  che rappresenta la quantità di antiossidante necessario a dimezzare la concentrazione di DPPH del 50%. Dato che la concentrazione iniziale di DPPH che viene usata può cambiare, il confronto diretto tra gli  $IC_{50}$  non è realistico pertanto il potere H-donatore può essere meglio espresso come la quantità di DPPH che può reagire con un certo campione. In questo caso viene utilizzato un antiossidante di riferimento, solitamente il Trolox. Nella versione statica, non si tiene conto del tempo che impiega l'antiossidante a reagire con il DPPH; in Figura 18b possiamo vedere per esempio come antiossidanti diversi, dopo mezz'ora (1800 sec), hanno reagito con la stessa quantità di DPPH nonostante le velocità di reazione siano molto diverse.

Per quanto riguarda le limitazioni:

- il DPPH reagisce con entrambi i meccanismi (SET e HAT) che danno risposte quantitativamente diverse a seconda dell'ambiente di reazione;
- la velocità della reazione è strettamente legata all'ingombro sterico dell'antiossidante;
- quando la reazione è veloce viene richiesto l'uso di tecniche di rapida miscelazione automatizzate;
- le curve non sempre sono lineari ma variano in funzione della concentrazione dell'antiossidante e delle condizioni di reazione rendendo l'elaborazione dei dati non semplice;
- il saggio può dare interferenze a causa della presenza di sostanze con un forte assorbimento nel range di assorbimento del radicale che sono, in genere, tipiche dei campioni contenenti carotenoidi e antocianine (475-485 nm).

Nonostante tali limitazioni, il metodo del DPPH è ampiamente utilizzato in quanto il radicale DPPH• è stabile, disponibile commercialmente e non deve essere generato in situ; inoltre è un metodo che permette una buona riproducibilità ed è facile da eseguire (Castiglioni S., AA. 2011/2012).

Nella versione statica il decadimento del segnale del radicale DPPH può essere monitorato anche per mezzo della spettroscopia di risonanza paramagnetica EPR (Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy), (Cimpoi C. et al., 2013, Zalibera M. et al., 2008).

Il radicale in questione mostra infatti uno spettro EPR caratterizzato da 5 picchi di intensità variabile (Figura 19), in quanto l'elettrone è delocalizzato su entrambi gli atomi di azoto.

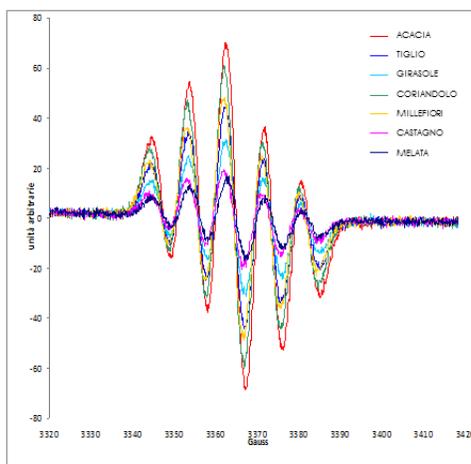


Figura 19: Spettro EPR del radicale DPPH.

La misura dell'intensità del segnale di DPPH è inversamente proporzionale al contenuto di antiossidanti nel campione che vengono espressi come percentuale di inibizione (vedere test precedenti) e sono in genere riferiti a un antiossidante di riferimento come il Trolox.

### ***5.2.3 Contenuto in Polifenoli Totale (TPC)***

(Prior R. L. et al., 2005; Singleton V. L. et al., 1999)

Il saggio che utilizza il reagente di Folin-Ciocalteu è molto popolare ed è comunemente, ma erroneamente, conosciuto come saggio dei fenoli totali (TPC).

Questo metodo infatti non è specifico per i composti fenolici, a causa dei numerosi interferenti come le ammine aromatiche, l'acido ascorbico, la vitamina C, il Cu(II), che aumentano il valore di fenoli determinato. Per questo motivo, qualora gli interferenti non siano rimossi, il metodo non sarebbe applicabile per la determinazione del TPC, ma potrebbe misurare un generico potere riducente totale.

Questo metodo si basa, sull'ossidazione dei composti fenolici da parte di una miscela di reagenti, chiamata reattivo di Folin-Ciocalteu, che contiene una miscela di fosfomolibdato ( $\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) e fosfotungstato ( $\text{Na}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) di sodio che formano dei complessi misti polifosfotungstato-molibdato e che riducendosi portano alla formazione di una miscela di ossidi ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$  e  $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ) colorata di azzurro avente un assorbimento massimo nella regione 745-760 nm. Si suppone che sia il complesso del molibdeno che si riduce da  $\text{Mo}^{+6}$  a  $\text{Mo}^{+5}$  per reazione con l'antiossidante determinando il viraggio della soluzione da giallo a blu (Figura 20).

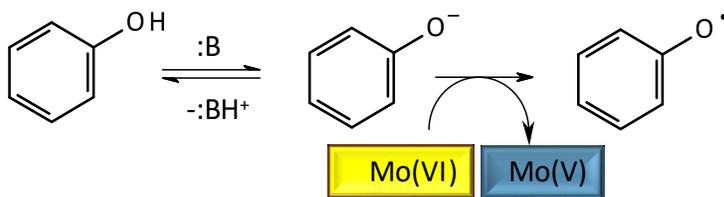


Figura 20: Reazione di ossidoriduzione tra antiossidante e il molibdeno del reattivo di Folin-Ciocalteu.

I composti fenolici reagiscono con il FCR solo in condizioni basiche (date di solito da una soluzione di sodio carbonato) che promuovono la formazione dello ione fenolato più reattivo nei confronti del FCR (Figura 20): questo permette di confermare che la reazione avviene per trasferimento elettronico.

Il contenuto di polifenoli nel campione in esame viene riferito a un composto di riferimento, di solito l'acido gallico.

Tra le limitazioni si menzionano i lunghi tempi di analisi (circa 2 ore), la necessità di un pH basico, il vincolo del solvente acquoso (purtroppo non è utilizzabile con antiossidanti lipofili) e la mancata definizione del meccanismo della reazione.

Data la semplicità, la convenienza e la riproducibilità questo metodo è però ampiamente utilizzato. Spesso gli autori trovano una buona correlazione lineare tra questo saggio e quelli che misurano l'attività antiossidante, e questo è plausibile in quanto alcuni saggi si basano su meccanismi molto simili.

In altri casi invece analizzando lo stesso campione con due metodi può accadere di non ottenere gli stessi risultati in quanto i test sono caratterizzati da diversi tempi di risposta, radicali e meccanismi di reazione.

### ***5.2.4 Metodo dell'alluminio cloruro per la determinazione dei flavonoidi***

Il metodo dell'alluminio cloruro, descritto da Barnum D. W. (1977) permette di determinare il contenuto di flavonoidi totali, separando il loro contributo da quello di polifenoli generici. Il principio di base si fonda sulla capacità dell'alluminio cloruro di formare complessi con i flavonoidi (Figura 21) che posseggono gruppi orto-diidrossi, peri-idrossi-osso e orto-idrossi-osso.

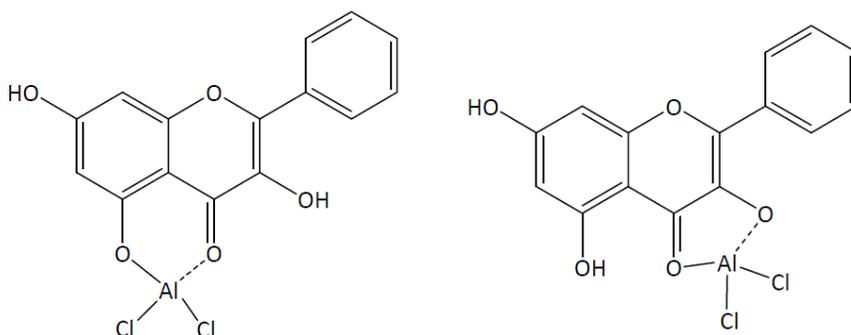


Figura 21: Esempio di complessi tra galangina e AlCl<sub>3</sub>.

Il metodo, nonostante sia stato introdotto per la quantificazione dei flavonoidi, è in grado di identificare solo alcune sottoclassi di

flavonoidi, i flavoni (flavonoidi che contengono un carbonile in C4 come la luteolina, l'orientina e la tricina) e i flavonoli (flavoni che contengono un ossidrilico in C3 come il campeferolo, la quercetina, la miricetina), che possiedono le caratteristiche strutturali indispensabili per la formazione dei complessi con l'alluminio.

La formazione dei complessi alluminio-flavonoidi è accompagnata da uno spostamento della banda di assorbimento nello spettro UV (Figura 22) del flavonoide. In molti esperimenti si adotta la lettura spettrofotometrica del campione a una lunghezza d'onda intorno a 415-420 nm. Il valore di concentrazione dei flavonoidi che si ricava in alcuni casi è espresso in Quercetina Equivalente (QE) in altri in Catechina Equivalenti.

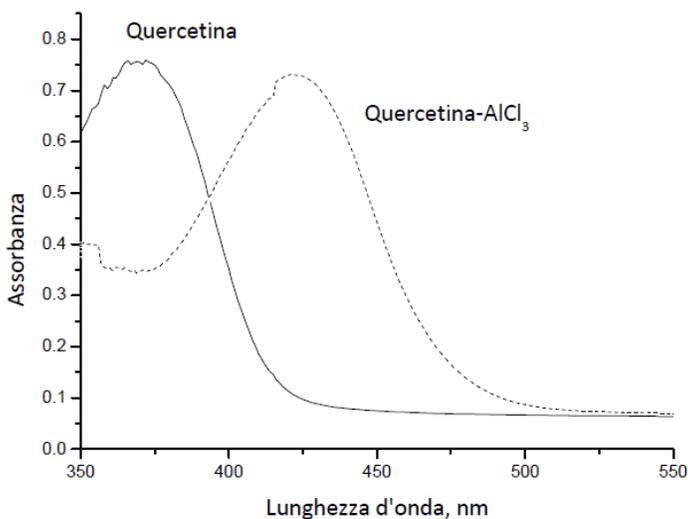


Figura 22: Spostamento della banda di assorbimento nello spettro UV del complesso alluminio-quercetina.

In conclusione indipendentemente dalle limitazioni oggettive i test indiretti che misurano l'attività antiossidante sono un valido strumento per misurare l'effetto antiossidante di matrici complesse come gli alimenti purché vengano utilizzati per il confronto di matrici simili. Questi saggi possono dare indicazioni preliminari ma globali del contenuto in antiossidanti in quanto nelle matrici complesse gli antiossidanti spesso agiscono in maniera sinergica o antagonista e non solamente con effetti additivi. Infatti, lo studio dei singoli antiossidanti non rispecchia ciò che succede nelle matrici complesse e questo spiega perché spesso gli integratori alimentari contenenti singoli antiossidanti non danno effetti analoghi a quelli dati dall'assunzione di alimenti ricchi in antiossidanti. Per questo motivo spesso viene privilegiata una ricerca rivolta all'analisi degli alimenti nel loro complesso anziché ai singoli composti.

### **5.3 SAGGIO DEL pH DIFFERENZIALE PER LA DETERMINAZIONE DELLE ANTOCIANINE MONOMERICHE**

La determinazione delle antocianine è stata effettuata per mezzo del metodo del pH differenziale (Giusti M.M. et al., 2001). Tale metodo può essere usato per la determinazione della quantità totale di antocianine monomeriche; esse infatti modificano la loro struttura, in

funzione del pH, assumendo colorazioni diverse e assorbendo quindi a diversa lunghezza d'onda (Figura 23).

In pratica, la forma chinoide blu, a pH 1 viene protonata dando il catione flavilium che assume una colorazione rosso-arancio; questo a pH 4.5 subisce addizione di acqua e deprotonazione dando la forma emichetale del calcone che è incolore ed è in equilibrio con il calcone stesso anch'esso incolore. Quindi la differenza di assorbanza alla  $\lambda_{\max}$  del pigmento è proporzionale alla sua concentrazione. Le antocianine polimeriche non subiscono invece il cambiamento di colore al variare del pH e quindi esse non vengono misurate con questo metodo in quanto assorbono sia a pH 1 che a pH 4.5.

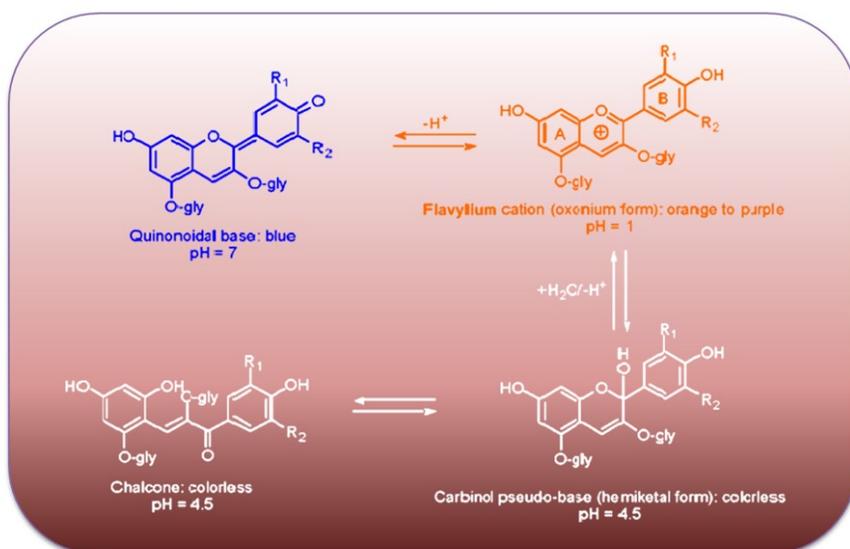


Figura 23: Struttura delle antocianine monomeriche in funzione del pH.

L'assorbanza deve essere misurata alla  $\lambda_{\max}$  della soluzione del pigmento e il contenuto di pigmento deve essere calcolato usando il peso molecolare ed il coefficiente di estinzione dell'antocianina predominante nella matrice. Le matrici naturali normalmente contengono una miscela di antociani, e le proporzioni di questi antociani variano. Questa variazione rende irrealistico assegnare un coefficiente di estinzione specifico o un peso molecolare per i risultati dei test di routine. Per ovviare a tale problema l'assorbanza viene misurata a 520 nm, che è la lunghezza d'onda media delle diverse antocianine e i risultati vengono espressi come equivalenti di cianidina-3-glucoside, che è l'antocianina più comune che si trova in natura. Per correggere il risultato dall'eventuale interferenza dovuta ad una torbidità del campione viene misurata anche l'assorbanza a 700 nm che viene poi sottratta.

La concentrazione di antocianine (TAC = Total Anthocyanin Content), espresse come equivalenti dell'antiossidante di riferimento, viene calcolata con la seguente formula:

$$\text{TAC (mg/l)} = A \times \text{PM} \times \text{DF} \times 1000 / (\epsilon \times l)$$

Dove:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

PM = peso molecolare dell'antocianina di riferimento

DF = fattore di diluizione

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare dell'antocianina di riferimento

l = percorso della cella.

## 6 IL COLORE

I metodi per esprimere numericamente il colore sono stati sviluppati da un'organizzazione internazionale che studia la luce e il colore, la "Commission Internationale de l'Eclairage" detta CIE. I due modelli più conosciuti sono lo spazio di colore  $Yxy$ , ideato nel 1931 misurabile in base ai valori tristimolo XYZ (definiti dalla CIE) e lo spazio di colore  $L^*a^*b^*$ , ideato nel 1976 per uniformare maggiormente le differenze di colore in relazione alla percezione visiva e migliorare l'originale spazio di colori  $Yxy$ . Tali spazi di colore (metodi per esprimere il colore) sono ora usati in tutto il mondo per la comunicazione del colore.

Lo spazio di colore  $L^*a^*b^*$  (noto anche come CIELAB) è attualmente uno dei più diffusi ed è ampiamente usato in tutti i campi:  $L^*$  indica la luminosità mentre  $a^*$  e  $b^*$  sono le coordinate di cromaticità rappresentate a sinistra della Figura 24.

Nel diagramma di cromaticità,  $a^*$  e  $b^*$  indicano le direzioni del colore:  $+a^*$  è la direzione del rosso,  $-a^*$  è la direzione del verde,  $+b^*$  è la direzione del giallo e  $-b^*$  è la direzione del blu. Il centro è acromatico e quando i valori  $a^*$  e  $b^*$  aumentano ed il punto si sposta dal centro, la saturazione del colore aumenta. A destra della Figura 24 è raffigurato il solido dei colori per lo spazio  $L^*a^*b^*$ .

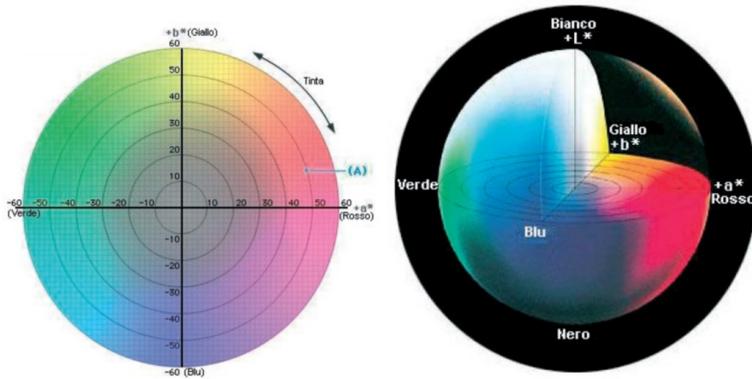


Figura 24: Diagramma di cromaticità  $a^*$  e  $b^*$  (sinistra); solido dei colori per lo spazio  $L^*a^*b^*$  (destra).

Lo spazio tristimolo CIE, può essere definito sia dalle coordinate cromatiche  $L^*a^*b^*$  o da quelle polari  $L^*C_{ab}^*h^{\circ}_{ab}$ . In quest'ultimo caso il colore è descritto per attributi cromatici che sono solitamente suddivisi in tre componenti: la luminosità, il croma e la tonalità. Secondo il CIE del 1976, la luminosità ( $L^*$ ) descrive se il colore è più vicino al nero o al bianco, il croma ( $C^*$ ) descrive la saturazione quindi la vivacità o la purezza di un colore, e la tonalità ( $h^{\circ}$ ) è la percezione del colore di un oggetto (ad esempio giallo, rosso, blu o verde). Valori elevati di croma corrispondono a colori ricchi e pieni, valori bassi invece a colori spenti e grigiastri (Tuberoso C. I. G. et al., 2014).

## 7 ANALISI MULTIVARIATA

(Hair J. F. et al., 2009)

L'analisi multivariata dei dati è una indagine statistica che esamina molte variabili contemporaneamente, al fine di comprendere l'eventuale esistenza di relazioni o differenze tra di loro. Questa analisi può essere semplice se riguarda solo due variabili o più complessa se è relativa ad un numero maggiore.

L'analisi multivariata permette inoltre di riassumere in modo semplice, sfruttando una rappresentazione di tipo grafico, dati complessi evitando una descrizione separata in singoli grafici e permettendo una migliore interpretazione dei risultati.

Esistono diversi tipi di analisi multivariata che possono essere classificati in tre aree principali:

✓ l'analisi esplorativa dei dati (Exploratory Data Analysis - EDA), utile per ottenere una maggiore comprensione di grandi insiemi di dati complessi in quanto i campioni e le variabili sono reciprocamente legati tra loro. Attraverso l'EDA è possibile inoltre stabilire l'importanza delle variabili nella descrizione i campioni.

✓ l'analisi di regressione che sviluppa modelli per prevedere eventi nuovi e futuri e che risulta quindi utile per le analisi di tipo predittivo.

✓ la classificazione, per identificare classi nuove o esistenti, utile nelle analisi di mercato e nel settore della ricerca e dello sviluppo.

Ogni metodo può essere usato da solo oppure associato ad altri per migliorare ulteriormente la comprensione di un sistema.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati in dettaglio i seguenti metodi:

✓ Cluster analisi;

✓ Analisi delle Componenti Principali (PCA);

✓ Analisi discriminante quadratica (DA).

## **7.1 CLUSTER ANALISI**

La Cluster analisi separa i campioni in gruppi (cluster) in modo tale che i campioni assegnati a un particolare cluster siano simili tra loro ma distinti dagli altri.

Vista la natura dei nostri dati abbiamo scelto di utilizzare la cluster analisi gerarchica agglomerativa che si basa sul raggruppamento di individui in modo sequenziale: si parte con la coppia di individui più simili e si procede a formare gruppi sempre più numerosi con un processo a stadi. Una volta che un gruppo si è formato non può più essere suddiviso nuovamente, può solo essere combinato con altri gruppi.

## **7.2 ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI (PCA)**

La PCA è conosciuta come il cavallo di battaglia dei metodi multivariati in quanto fornisce uno dei più potenti strumenti grafici per la comprensione delle relazioni tra campioni e variabili. È uno strumento universale che si può applicare a qualsiasi situazione in cui più di una variabile viene misurata su numerosi campioni. È il metodo più adatto quando si hanno grandi insieme di dati con più di 10 variabili e 100 campioni, come nel nostro caso. La PCA è l'analisi della variabilità in un particolare insieme di dati che viene separato in componenti principali (PC). Ogni PC contribuisce a spiegare la variabilità totale e la prima PC descrive la maggiore fonte di variabilità.

Pertanto una PC:

✓ definisce quali variabili contribuiscono maggiormente a differenziare i dati e quali non portano con sé informazioni importanti;

✓ mostra quali variabili sono collegate tra loro e quelle che non lo sono.

La combinazione di tutte le PC permette di descrivere numerose informazioni del sistema analizzato nel minor numero di componenti principali. Per questo motivo la PCA è uno strumento comodo per la riduzione della dimensione dei dati e la visualizzazione di somiglianze tra campioni, e fornisce una prima valutazione dell'efficacia classificatoria delle variabili considerate.

### **7.3 ANALISI DISCRIMINANTE (DA)**

L'analisi discriminante viene utilizzata per determinare quali variabili discriminano tra due o più gruppi conosciuti. Da tale analisi è inoltre possibile determinare delle funzioni che correlano tali variabili per prevedere l'appartenenza al gruppo.

Da un punto di vista computazionale, essa è molto simile all'analisi della varianza (ANOVA).

L'utilizzo più comune dell'analisi discriminante è quello di determinare tra molte variabili che possono essere incluse in uno studio, quelle che discriminano meglio tra i gruppi, cercando di costruire un "modello" per meglio prevedere a quale gruppo appartiene un campione. Per fare ciò di solito si esegue un'analisi della varianza a stadi nella quale il modello di discriminazione si costruisce passo dopo passo. In particolare, ad ogni passo tutte le variabili sono riviste e valutate per determinare quella che contribuirà maggiormente alla discriminazione tra i gruppi: tale variabile verrà inclusa nel modello, e il processo ripartirà. Tale analisi si dice "in avanti". L'analisi a stadi può essere anche effettuata all'indietro: in questo caso tutte le variabili sono incluse nel modello e poi, ad ogni passo, viene eliminata la variabile che contribuisce di meno alla previsione di appartenenza al gruppo. In entrambi i casi si selezionano solo le variabili "importanti" nel modello, cioè quelle variabili che contribuiscono maggiormente alla discriminazione tra i gruppi.

La procedura a stadi è guidata dal valore di F che viene valutato per inserire o escludere le variabili. Il valore F per una variabile indica la significatività statistica nella discriminazione tra gruppi, cioè, è una misura del contributo della variabile alla previsione di appartenenza al gruppo.

Dall'analisi discriminante si ricavano quindi delle funzioni discriminanti che combinano le variabili attraverso dei coefficienti discriminanti. Quando si esegue un'analisi discriminante tra più gruppi, la prima funzione fornisce la discriminazione più generale tra i gruppi, la seconda discrimina un po' meno, e così via. Inoltre, le funzioni sono indipendenti ed ortogonali, cioè il loro contributo alla discriminazione tra gruppi non si sovrappone. Il numero massimo di funzioni sarà uguale al numero di gruppi meno uno, o al numero di variabili. Le variabili che hanno i coefficienti discriminanti (standardizzati) più grandi sono quelli che maggiormente contribuiscono alla previsione di appartenenza al gruppo. Tuttavia, i coefficienti di ogni funzione non ci dicono tra quali gruppi le rispettive funzioni discriminano meglio. Possiamo identificare la natura della discriminazione per ciascuna funzione discriminante osservando le medie delle funzioni dei vari gruppi. Possiamo anche visualizzare come le prime due funzioni discriminano tra i gruppi mettendo in grafico le coordinate individuali di ogni campione e le medie di gruppo per le due funzioni. Si può verificare il numero di funzioni che si aggiungono significativamente alla discriminazione fra gruppi.

Solo quelle che risultano essere statisticamente significative devono essere utilizzate per l'interpretazione; funzioni non significative dovrebbero essere ignorate.

In conclusione, quando si trovano molteplici funzioni discriminanti, che derivano da un'analisi con più di due gruppi e più di una variabile, è necessario prima testare la significatività statistica delle diverse funzioni e prendere in considerazione solo le funzioni significative per un ulteriore esame. Quindi si analizzano i coefficienti standardizzati per ciascuna variabile e per ogni funzione significativa. Più grande è il coefficiente standardizzato, maggiore è il contributo della rispettiva variabile alla discriminazione specificata dalla rispettiva funzione discriminante. Infine l'analisi delle medie delle funzioni discriminanti significative ci dicono tra quali gruppi le rispettive funzioni possono discriminare. L'analisi discriminante essendo computazionalmente molto simile alla MANOVA deve rispettare le stesse assunzioni e cioè la normalità dei dati e l'omogeneità delle varianze/covarianze anche se in realtà, è possibile utilizzare una vasta gamma di test diagnostici e statistici di ipotesi diversi dalla MANOVA per esaminare i dati per l'analisi discriminante.

## 8 IL MIELE

### 8.1 INTRODUZIONE

#### *8.1.1 Storia e uso*

Il miele era nell'antichità l'unico dolcificante naturale disponibile e rappresentava quindi un alimento importante per l'Homo sapiens: per questo, il rapporto tra le api e l'uomo è iniziato già a partire dall'età della pietra. Il primo riferimento scritto sul miele, risale a una tavoletta sumera del 2100-2000 a.C., la quale menziona l'uso del miele come farmaco e unguento. Nelle culture più antiche il miele è stato utilizzato sia per fini nutrizionali che medici. Secondo la Bibbia, il re Salomone ha detto: "Mangia il miele mio figlio, perché è buono" (Vecchio Testamento, proverbio 24:13). Per lungo tempo nella storia è stato una fonte importante di carboidrati e l'unico dolcificante ampiamente disponibile, fino alla produzione di zucchero industriale che ha iniziato a sostituirlo dopo il 1800. Il miele è stato utilizzato in molte culture, come quella Egizia, per le sue proprietà medicinali, tra cui come rimedio per le ustioni, la cataratta, le ulcere e le guarigioni delle ferite, perché ha un effetto calmante se applicato su ferite aperte. Date le sue caratteristiche fisiche, il miele fornisce una barriera di protezione e, grazie alla sua elevata osmolarità, crea un ambiente umido di guarigione formando uno strato che non si attacca ai tessuti delle ferite e previene

la colonizzazione batterica. Così, il miele riduce l'infiammazione e la formazione dell'essudato della ferita anche più rapidamente, rispetto ai trattamenti standard (Alvarez-Suarez J. M. et al., 2010a; Pyrzynska K. et al., 2009).

L'apiterapia (l'utilizzo medico dei prodotti dell'alveare) ha recentemente riscosso una certa attenzione come medicina preventiva popolare e per il trattamento di determinate malattie, nonché per la promozione della salute (Pyrzynska K. et al., 2009).

### **8.1.2 Definizione e composizione**

Secondo quanto stabilito dalla Direttiva Miele CE n. 2001/110/CE, "Il miele è la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera* L.) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante, e che esse bottinano, trasformano combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare".

Questo alimento contiene più di 200 composti ed è considerato uno degli alimenti più completi (Bueno-Costa F. M., et al., 2016). È costituito principalmente da fruttosio e glucosio, ma sono in esso presenti anche altri composti come enzimi (l' $\alpha$ -glucosidasi, la  $\beta$ -glucosidasi, la catalasi e la fosfatasi), aminoacidi, acidi organici (l'acido gluconico), carotenoidi, vitamine (specialmente la vitamina B6, la

tiamina, la niacina, la riboflavina e l'acido pantotenico), minerali (calcio, rame, ferro, magnesio, manganese, fosforo, potassio, sodio e zinco), granuli di polline, cera, sostanze aromatiche, flavonoidi e altre sostanze fitochimiche (da Silva P. M. et al., 2016).

In particolare nei mieli l'attività antiossidante è attribuibile alla presenza di acidi fenolici (derivati dell'acido benzoico e cumarico, acido caffeico, acido gallico, acido vanillico, acido siringico e acido clorogenico) e flavonoidi tra cui l'apigenina, la pinocembrina, la crisina, la luteolina, la quercetina, il kampeferolo e la miricetina (Alvarez-Suarez J. M. et al., 2010a). Il miele è spesso usato come conservante naturale in molti preparati alimentari in quanto può prevenire la reazione di ossidazione degli alimenti (ad esempio, l'ossidazione dei lipidi nella carne e l'imbrunimento enzimatico di frutta e verdura) (Pyrzynska K. et al., 2009).

La composizione chimica dipende da molti fattori, come la composizione in nettare della fonte floreale, la specie di api, il clima, le condizioni ambientali e stagionali, le pratiche agronomiche e il trattamento del miele durante l'estrazione e lo stoccaggio (de Almeida-Muradian L. B. et al., 2013; Escriche I. et al., 2014; Escuredo O. et al., 2014, Pellerano R. G. et al., 2012; Wilczynska A., 2014).

### ***8.1.3 Effetti benefici***

Negli ultimi anni molta attenzione è stata data all'uso di antiossidanti alimentari naturali come protezione efficace contro il danno ossidativo. Infatti, numerosi studi epidemiologici hanno indicato che una dieta ricca di antiossidanti fitochimici è in grado di prevenire o ritardare le malattie croniche (Slavin J. L. et al., 2012). Di conseguenza, l'interesse per l'identificazione e la quantificazione di questi composti in campioni di miele è notevolmente aumentato e ha portato a dimostrare che i composti fenolici (soprattutto flavonoidi) costituiscono la classe più importante di composti che donano attività antimicrobica, antinfiammatoria, antimutagenica, antitumorale, e antiossidante a tale alimento oltre ad attribuirgli altri effetti benefici sulla salute umana (Alvarez-Suarez J. M. et al., 2010). L'attività antiossidante del miele varia in modo significativo in base alla sua origine floreale (Chaikham P. et al., 2016): infatti, il nettare e le secrezioni delle piante contengono una grande varietà di diversi composti polifenolici che le api riescono a trasferire al miele. I composti fenolici sono stati quindi proposti da diversi autori per caratterizzare i mieli uniflorali insieme ai parametri chimico fisici (Manzanares A. B. et al., 2014). Diversi studi hanno infatti identificato alcuni composti fenolici come marker di mieli uniflorali: ad esempio la quercetina per il miele di girasole, l'esperitina per il miele di agrumi, l'acido ellagico per l'erica e l'acido caffeico e l'acido p-cumarico per il castagno (Kečkeš S. et al., 2013; Cavazza A. et al., 2012; Pyrzynska K. et al., 2009; Pichichero E. et al., 2009).

Diversi studi suggeriscono quindi l'uso di tali composti come biomarcatori dell'origine botanica (Kečkeš S. et al., 2013).

Per quanto riguarda le proprietà salutari del miele, diversi studi effettuati su mieli italiani hanno permesso di attribuire a tale alimento alcune proprietà biologiche, dimostrando in particolare la biodisponibilità dei flavonoidi presenti (Fiorani M. et al., 2006; Blasa M. et al., 2007) che possono essere disponibili in vari compartimenti del corpo umano dove potrebbero esercitare diversi effetti fisiologici (Blasa M. et al., 2007). Alcuni autori hanno dimostrato che l'estratto fenolico di miele italiano ha proprietà benefiche come agente antifungineo nei confronti della *Candida albicans* (Candiracci M. et al. 2012a; Canonico B. et al., 2014) e potrebbe costituire un potenziale agente preventivo-terapeutico delle malattie neurodegenerative che coinvolgono le neuro-infiammazioni (Candiracci M. et al. 2012b). È stato inoltre studiato l'utilizzo del miele come coadiuvante per l'igiene dentale e per il trattamento di dermatiti e psoriasi vulgaris (Pipicelli G. et al., 2009; Al-Dany A. et al., 2014).

In una ricerca di Filadeo M. et al. 2015 è stata determinata anche l'attività antibatterica contro gli agenti patogeni comunemente associati con le infezioni da ferite e bruciature, di diversi mieli provenienti dall'Italia. Tali ricercatori sostengono che a causa del basso costo di miele, rispetto agli antibiotici, lo sviluppo di prodotti antibatterici a base di questo alimento (per esempio per trattare le infezioni che non

rispondono alla terapia antibiotica) potrebbe anche avere importanti implicazioni economiche per il sistema sanitario.

#### ***8.1.4 Produzione***

La produzione mondiale di miele è in aumento. L'unione Europea copre il 13.3% della produzione totale mondiale di miele (Figura 25) ed i tre principali produttori sono la Spagna, la Germania e la Romania; l'Italia si colloca nei posti centrali (Figura 26). Tra l'altro l'Unione Europea è un importatore di miele, in quanto la sua produzione copre solamente il 61.6% del consumo (dati della FAO - Food and Agriculture Organization del 2013; [www.fao.org](http://www.fao.org)). Questo è uno dei motivi per il quale ci auspichiamo che la ricerca in oggetto sui prodotti apicoli possa contribuire alla loro valorizzazione attraverso l'aumento delle conoscenze nutrizionali di tali alimenti al fine di favorire lo sviluppo del settore apistico.

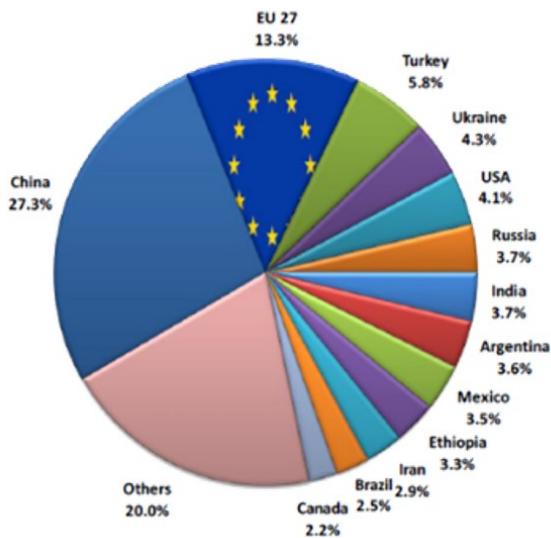


Figura 25: Produzione mondiale di miele (FAO 2013).

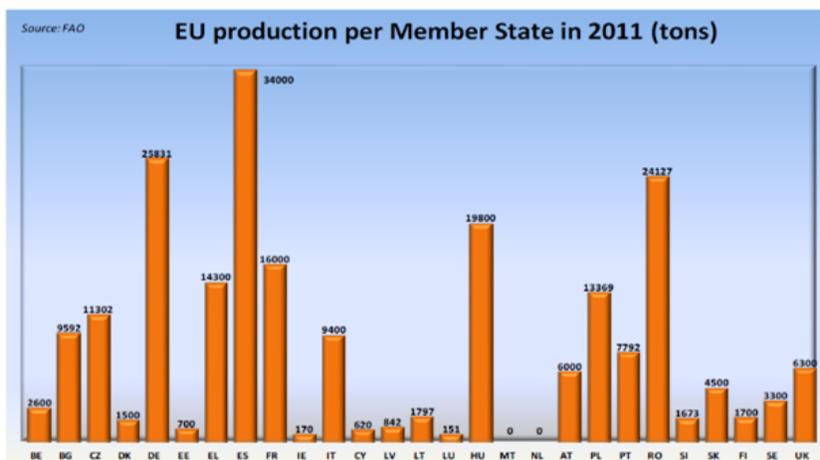


Figura 26: Produzione di miele degli stati Europei nel 2011.

L'Italia possiede condizioni geografiche e climatiche idonee all'apicoltura con una produzione nell'anno 2013 di 9.4 mila tonnellate di miele ([www.informamiele.it/index.php/crt/i-numeri-dell-apicoltura-italiana/numero-alveari](http://www.informamiele.it/index.php/crt/i-numeri-dell-apicoltura-italiana/numero-alveari)), ottenuta da un numero esiguo (~ 1 560 000) di alveari (Osservatorio Nazionale Miele, 2013), detenuti da 11 – 12 mila apicoltori professionisti e 30-40 mila apicoltori che producono per auto-consumo. Nello stesso anno, la produzione mondiale di miele è stata di circa 1.66 milioni di tonnellate, e in Europa, la produzione annuale ha raggiunto circa 372 mila tonnellate (nell'Unione europea 204 mila tonnellate nel 2014, 268 mila nel 2015) ([http://ec.europa.eu/agriculture/honey/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/honey/index_en.htm)). La produzione media di miele in Italia varia negli anni da 9 a 12 mila tonnellate, a seconda delle condizioni meteorologiche (Cosmina M. et al., 2015). In Italia il consumo annuo pro capite è medio (0.3 – 0.4 kg) rispetto agli altri paesi europei (Alvarez-Suarez J. M. et al., 2010a).

Nel mondo sono noti centinaia di diversi mieli uniflorali (Gok S. et al., 2015), e almeno la metà di questi possono essere prodotti in Italia unitamente ad infinite variazioni di miele millefiori (CREA, 2012). I più comuni mieli uniflorali italiani sono: la robinia (acacia), gli agrumi, l'ailanto, l'asfodelo, il cardo, il castagno, la colza, il corbezzolo, l'edera, l'erica, l'eucalipto, il girasole, la lavanda, la melata d'abete, la melata di bosco, il melo, il rododendro, il rosmarino, la sulla, il tarassaco, il tiglio, il timo e il trifoglio. I mieli rari sono invece quelli di borragine,

calluna, ciliegio, cipolla, erica carnea, lupinella, mandorlo, melata di quercia, marasca, marruca, nespolo del Giappone, rovo, santoreggia e stregonia (<http://www.ambasciatorimieli.it/index.php/miele-e-prodotti-delle-api/mieli-italiani>).

In generale, i mieli uniflorali sono molto richiesti per le loro particolari caratteristiche organolettiche e sul mercato hanno un alto valore commerciale; i consumatori italiani inoltre mostrano delle forti preferenze per i mieli di produzione locale (Cosmina M. et al., 2015). Gli autori suppongono che i prodotti alimentari locali sono preferiti soprattutto dai consumatori eco-consapevoli, perché sono più rispettosi dell'ambiente. Inoltre, tali alimenti sono generalmente ottenuti da produttori locali rispettando le tradizioni originarie. (Cosmina M. et al., 2015).

### ***8.1.5 Colore***

Anche il colore del miele è caratteristico della sua fonte floreale e può essere espresso in millimetri Pfund o secondo la classificazione del Dipartimento di Agricoltura degli USA (White W. J., 1984). Il colore del miele può essere classificato quindi come bianco acqua, extra bianco, bianco, ambra extra chiaro, ambra chiaro, ambra e ambra scuro. Il miele durante la cristallizzazione diventa più chiaro a seconda della composizione del miele e del suo colore iniziale. Il miele inoltre è generalmente sensibile alla temperatura, che è responsabile di un suo

imbrunimento che avviene più rapidamente quando il miele è conservato a elevate temperature. La determinazione del colore è un utile criterio di classificazione dei mieli uniflorali. Il colore del miele è inoltre correlato al suo sapore: i mieli di colore chiaro hanno un sapore delicato mentre quelli più scuri hanno sapori forti (Belay A. et al., 2015). In molti paesi nei quali vi è un grande mercato di miele, le preferenze dei consumatori sono determinate dal colore del miele (Belay A. et al., 2015): i mieli chiari come ad esempio la robinia e gli agrumi sono i più ricercati ed hanno quindi i prezzi più alti, mentre i mieli scuri come ad esempio le melate e il castagno sono apprezzati maggiormente in alcune regioni (Tuberoso C. I. G et al., 2014).

## **8.2 ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E DEL COLORE DI MIELI UNIFLORALI ITALIANI**

(Castiglioni S. et al., 2017)

Esistono in letteratura diverse ricerche relative ai mieli uniflorali prodotti in diversi paesi, tuttavia, nonostante la grande varietà di mieli prodotti in Italia, sono stati effettuati solo pochi studi sulla caratterizzazione e la classificazione dei mieli italiani in base alla loro origine botanica (Perna A. et al., 2013; Rosa A. et al., 2011; Truzzi C. et al., 2014).

Nell'ambito del progetto di ricerca di dottorato è stato pertanto scelto di caratterizzare e classificare, attraverso un approccio multivariato, le proprietà antiossidanti (e in alcuni casi il colore) di diversi mieli uniflorali italiani e di mieli multiflorali provenienti dalla regione Marche; alcuni studi (Di Bella G. et al., 2015; Zhao J. et al., 2016) suggeriscono infatti l'uso dell'analisi multivariata per una caratterizzazione più affidabile di miele.

L'articolo scientifico relativo a questo progetto è in corso di stampa nella rivista, *International Journal of Food Science and Technology* (Castiglioni S. et al., 2017).

### 8.2.1 Campioni

Per questo progetto sono stati analizzati 117 campioni di miele uniflorali di cui:

28 di Robinia (*Robinia pseudoacacia* L.);

07 di Agrumi (*Citrus* spp.);

33 di Girasole (*Helianthus annuus* L.);

07 di Coriandolo (*Coriandrum sativum* L.);

07 di Eucalipto (*Eucalyptus* spp.);

07 di Corbezzolo (*Arbutus unedo* L.);

10 di Castagno (*Castanea sativa* Mill.);

07 di Melata di Abete (*Abies alba* Mill. e/o *Picea abies* L.);

11 di Melata di Bosco (prodotta dalla doppia elaborazione di due insetti, l'*Apis mellifera* e la *Metcalfa pruinosa*).

I campioni di miele sono stati raccolti direttamente dagli apicoltori durante le stagioni apistiche 2012, 2013 e 2014 in diverse regioni italiane (Marche, Basilicata, Calabria, Emilia Romagna, Piemonte, Puglia, Sardegna e Trentino Alto Adige): l'origine geografica dei campioni è mostrata in Figura 27.

L'origine botanica del miele è stata confermata dall'analisi mellissopalinoologica (Pubblicazioni Standard Italiani, 2008) o mediante l'analisi sensoriale. È stata determinata l'umidità e il contenuto in HMF (idrossimetilfurfurale) dei campioni per verificare il rispetto dei limiti secondo gli standard stabiliti dal Regolamento CE n. 110 del 2001 (Comunità Economica Europea, 2001).

I campioni, conservati in tubi di polietilene a 4°C al buio, erano di alta qualità in quanto hanno partecipato ai concorsi annuali "Premio Qualità Miele Marchigiano" (i campioni provenienti dalle Marche) o "Grandi Mieli d'Italia Tre Gocce d'Oro" e ci sono stati forniti rispettivamente dall'ASSAM (Agenzia per i Servizi nel Settore Agroalimentare delle Marche) e da una società di consulenza privata (Piana Ricerca e consulenza srl) specializzata nel settore dell'apicoltura.

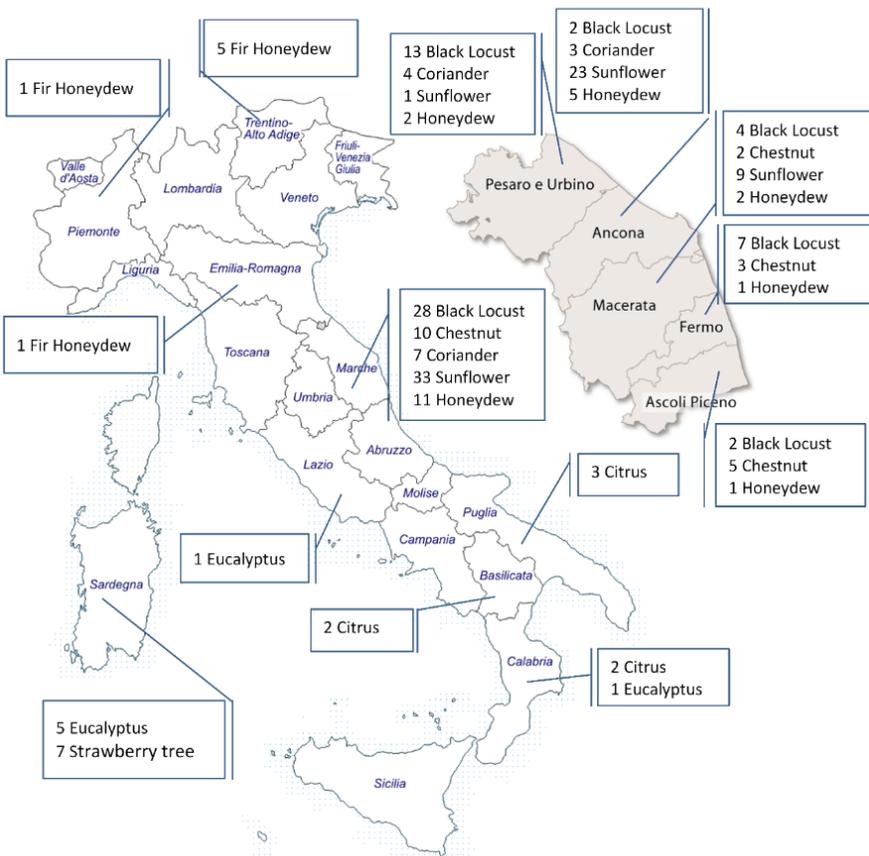


Figura 27: Origine geografica dei campioni uniflorali italiani oggetto di studio.

## **8.2.2 *Materiali e metodi***

Sui campioni di miele è stato determinato il contenuto fenolico totale (TPC), l'attività antiossidante utilizzando diversi test (ABTS, DPPH-Vis e DPPH-EPR) e il colore (Lovibond e Spettro nel visibile).

### **8.2.2.1 *Contenuto in Polifenoli Totale (TPC)***

Il contenuto fenolico totale nei campioni di miele è stato determinato utilizzando il reagente Folin-Ciocalteu (Singleton V. L. et al., 1999) con la metodica descritta nel paragrafo 5.2.3.

Per l'analisi, 50  $\mu$ l di miele al 5% p/v (in acqua) o di una soluzione opportunamente diluita (0 – 0.5 mM in acqua) di acido gallico 60 mM in etanolo (utilizzato come standard) sono stati posti in ciascun pozzetto di una piastra trasparente a 96 pozzetti e ad essi sono stati quindi addizionati 150  $\mu$ l di una soluzione del reagente Folin-Ciocalteu diluita 10 volte. La piastra è stata agitata per 10 secondi ed è stata lasciata riposare per 10 minuti al buio. Sono stati quindi aggiunti in ciascun pozzetto 100  $\mu$ l di una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10% e la piastra, dopo essere stata agitata, è stata lasciata per 120 minuti a temperatura ambiente al buio. Trascorso tale tempo è stata letta l'assorbanza a 760 nm contro l'acqua come bianco. I risultati sono stati espressi in mg di Acido Gallico Equivalenti per kg di miele (mg GAE/kg) utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuto dalla curva di calibrazione dell'acido gallico (0-70  $\mu$ M).

### 8.2.2.2 *Attività antiossidante (AA)*

#### **Saggio ABTS**

L'attività antiossidante dei diversi campioni di miele è stata determinata utilizzando il test ABTS (Re R. et al., 1999), basato sulla capacità degli antiossidanti di decolorare una soluzione del radicale catione dell'ABTS (per approfondimenti vedere paragrafo 5.2.1).

Il radicale catione colorato ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) è stato generato miscelando una soluzione acquosa 7.0 mM di ABTS con una soluzione acquosa 24.5 mM di persolfato di potassio, utilizzato come agente ossidante, rispettivamente in rapporto di 9:1. La miscela è stata lasciata a temperatura ambiente al buio per 12-16 h. La soluzione è stata quindi diluita  $\approx 50$  volte con acqua, prima dell'uso, per ottenere un'assorbanza di  $0.9 \pm 0.1$  a 734 nm.

Per l'analisi, 30  $\mu\text{l}$  di soluzione di miele al 2.5 o al 5% p/v (a seconda del tipo di miele) o di una soluzione di Trolox 1.8 mM (in etanolo) opportunamente diluita (0 – 0.30 mM in acqua), come standard, o di acqua come controllo sono stati aggiunti in ciascun pozzetto di una piastra trasparente a 96 pozzetti; a questi sono stati quindi aggiunti 270  $\mu\text{l}$  di soluzione di  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  diluita. La piastra è stata agitata per 10 secondi e lasciata per 120 minuti al buio a temperatura ambiente, prima di leggere l'assorbanza a 734 nm contro l'acqua come bianco.

L'attività antiossidante è stata determinata come percentuale di inibizione usando la seguente equazione:

$$\% \text{ Inibizione } A_{734} = (1 - A_s / A_c) \times 100$$

dove  $A_s$  è l'assorbanza dei campioni contenenti il miele o lo standard e  $A_c$  è l'assorbanza del controllo.

I risultati sono espressi come millimoli di Trolox Equivalenti per kg di miele (mmol TXE/kg) utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuta dalla curva di calibrazione del Trolox (0-30 mM).

### **Test DPPH**

L'attività antiossidante dei campioni di miele è stata valutata utilizzando anche il test DPPH (Prior R. L. et al., 2005) monitorato leggendo l'assorbanza del radicale a 517 nm (metodo DPPH-Vis) o registrando il suo segnale all'EPR (metodo DPPH-EPR). Per il saggio, 100  $\mu$ l di una soluzione di miele al 2.0, al 2.5 o al 5.0 % p/v (a seconda del tipo di miele), o di una soluzione etanolica di Trolox 0.45 mM, opportunamente diluita (0 – 0.15 mM in acqua) utilizzata come standard o di acqua come controllo, sono stati miscelati con 200  $\mu$ l di una soluzione etanolica di DPPH 0.2 mM preparata di fresco. Dopo una incubazione di 15 minuti al buio a temperatura ambiente, l'assorbanza a 517 nm delle soluzioni contro l'acqua come bianco, è stata letta su piastra trasparente a 96 pozzetti (DPPH-Vis) oppure è stato registrato lo spettro del DPPH all'EPR (DPPH- EPR) misurandone l'area. Per le misure all'EPR, effettuate per mezzo di uno spettrometro Bruker EMX, i campioni sono stati trasferiti in capillari da 50  $\mu$ l e sono state utilizzate le seguenti impostazioni strumentali: frequenza 9.78 GHz, potenza 25

mW, modulazione di ampiezza 2 Gauss, gain  $5 \times 10^5$ , ampiezza del campo 100 G, costante di tempo 0.64 ms, tempo di scansione 21 s.

L'attività antiossidante è stata determinata come percentuale di inibizione usando la seguente equazione:

$$\% \text{ Inibizione} = (1 - A_s/A_c) \times 100$$

dove  $A_s$  è l'assorbanza a 517 nm o l'area dello spettro EPR dei campioni contenenti il miele o lo standard e  $A_c$  del controllo.

I risultati sono espressi come mmol Trolox Equivalenti per kg di miele (mmol TXE/kg) utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuto dalla curva di calibrazione del Trolox (0-50  $\mu\text{M}$ ).

### 8.2.2.3 *Analisi del colore (Lovibond)*

Il colore dei campioni di miele è stato misurato con un comparatore ottico Lovibond® Comparator System 2000 (The Tintometer Ltd, Amesbury, UK). Circa 3 g di ogni campione di miele sono stati versati in cuvette di plastica e sono stati riscaldati (max 65°C) per dissolvere i cristalli di zucchero. Il colore del campione è stato visivamente confrontato con dei filtri colorati forniti in dotazione con lo strumento in modo da determinarne la classificazione in mm Pfund.

#### *8.2.2.4 Misura spettrofotometrica per l'analisi del colore*

Il colore dei campioni di miele è stato misurato anche per via spettrofotometrica misurando l'assorbanza dei campioni nel campo del visibile. Per tale analisi, 200  $\mu$ l di soluzione di miele al 50% p/v sono stati introdotti nei pozzetti di una piastra trasparente a 96 pozzetti e l'assorbanza da 350 a 700 nm è stata misurata a intervalli costanti ( $\Delta\lambda = 5$ ). I risultati sono stati espressi come AU (Arbitrary Units).

Tutte le misure spettrofotometriche sono state registrate per mezzo di un lettore per micropiastre (Synergy HT, Biotek, Winooski, VT, USA).

#### **8.2.3 *Analisi dei dati***

In tutti gli esperimenti descritti, sono stati analizzati gli appropriati controlli. Per scartare i dati anomali, è stata effettuata una analisi esplorativa preliminare utilizzando i box plot, sulla base delle mediana e dei quartili (Pellerano R. G. et al., 2012). I risultati dei test TPC, ABTS, DPPH-Vis, DPPH-EPR e Lovibond (Tabella 2) sono stati espressi come valori medi di almeno tre esperimenti indipendenti ( $n=3$ ) ed è stata indicata la deviazione standard (SDS). I campioni di miele sono stati classificati in base alla loro origine botanica ed i risultati sono stati mediati per le diverse classi e per i diversi anni di produzione. Le differenze statistiche sono state ottenute mediante l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di confronto multiplo Tukey

utilizzando un livello di confidenza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). La normalità dei dati è stata verificata con la procedura di Jarque-Bera e l'omogeneità della varianza con il test di Box. Dove l'assunzione dell'omogeneità della varianza non era soddisfatta, in alternativa all'ANOVA, è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis. I risultati sono stati anche trattati con analisi chemiometriche multivariate quali l'analisi discriminante (DA), la cluster analysis (CA) e l'analisi delle componenti principali (PCA). Prima dell'analisi chemiometrica, i dati sono stati normalizzati. Tutte le elaborazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft SARL).

## **8.2.4 Risultati**

### *8.2.4.1 Contenuto in Polifenoli Totale (TPC)*

Il contenuto in fenoli totali (TPC) dei campioni di miele è stato determinato utilizzando il reagente di Folin-Ciocalteu: nonostante questo reagente non sia specifico per fenoli ma sia in grado di ridurre i diversi substrati, viene comunemente usato per quantificare tali composti (Everette J. D. et al., 2010). In Tabella 2 sono riportati i valori medi del TPC dei mieli della stessa origine botanica e dello stesso anno di produzione. I valori medi di ogni classe botanica sono inoltre riassunti nel diagramma box plot in Figura 28, dove i mieli sono stati ordinati dal più chiaro al più scuro sulla base dei valori medi del colore

espresso in mm Pfund, riportati nella zona in alto della figura. La quantità di fenoli totali aumenta nell'ordine: agrumi  $\approx$  robinia < girasole  $\approx$  eucalipto  $\approx$  coriandolo < melata d'abete  $\approx$  castagno < melata  $\approx$  corbezzolo e mostra alcune differenze significative tra i vari tipi di miele. Il miele amaro (Persano Oddo L. et al., 1995) di corbezzolo (850.2 mg GAE/kg) e il miele scuro di melata (800.8 mg GAE/kg) mostrano il contenuto fenolico significativamente più elevato mentre i mieli chiari come gli agrumi (156.6 mg GAE/kg) e la robinia (197.3 mg GAE/kg), mostrano valori di TPC significativamente più bassi. I mieli di castagno (618.4 mg GAE/kg) e di melata di abete (595.8 mg GAE/kg), mostrano valori di TPC intermedi ma significativamente diversi da quelli di girasole (302.9 mg GAE/kg), di coriandolo (403.6 mg GAE/kg) e di eucalipto (378.7 mg GAE/kg). In particolare, dal boxplot (Figura 28) si può osservare una grande variabilità nei risultati ottenuti per i campioni di miele di melata e la presenza di un campione con un TPC molto basso all'interno dei mieli di corbezzolo (563.3 mg GAE/kg). Inoltre, può essere osservata per alcuni tipi di miele una variabilità del TPC, sulla base delle diverse stagioni di raccolta (Tabella 2). Nella fattispecie i mieli di melata ( $p = 0.0842$ ) e di girasole ( $p = 0.0731$ ) mostrano delle differenze tra gli anni di raccolta 2012 e 2013: i mieli raccolti nel 2012 hanno valori più elevati rispetto a quelli raccolti nel 2013.

HONEY SAMPLES	n	TPC mg GAE/kg	ABTS mmol TXE/kg	DPPH-Vis mmol TXE/kg	DPPH-EPR mmol TXE/kg	LOVIBOND mm Pfund
<b>BLACK LOCUST (L)</b>	<b>28</b>	<b>197.3± 33.1<sup>E</sup></b>	<b>1.81±0.62<sup>D</sup></b>	<b>0.259±0.061<sup>F</sup></b>	<b>0.223±0.063<sup>G</sup></b>	<b>7.7 ± 6.7<sup>E</sup></b>
2012	9	200.3± 40.1	1.60±0.67	0.242±0.075	0.228±0.101	8.9 ± 8.2
2013	19	195.9± 30.7	1.91±0.62	0.267±0.050	0.221±0.039	7.1 ± 6.1
<b>CITRUS (C)</b>	<b>7</b>	<b>156.6± 6.8<sup>E</sup></b>	<b>1.24±0.32<sup>D</sup></b>	<b>0.162±0.017<sup>F</sup></b>	<b>0.215±0.085<sup>F, G</sup></b>	<b>11.4 ± 4.8<sup>E</sup></b>
2014	7	156.6± 6.8	1.24±0.32	0.162±0.017	0.215±0.085	11.4 ± 4.8
<b>SUNFLOWER (C)</b>	<b>33</b>	<b>302.9± 49.7<sup>D</sup></b>	<b>4.73±0.70<sup>C</sup></b>	<b>0.490±0.109<sup>E, F</sup></b>	<b>0.440±0.110<sup>E, F</sup></b>	<b>51.1 ± 6.7<sup>D</sup></b>
2012	11	326.2± 51.7	4.53±0.62	0.464±0.124	0.504±0.090	51.8 ± 4.6
2013	22	291.2± 45.9	4.82±0.73	0.503±0.102	0.408±0.107	50.7 ± 7.6
<b>CORIANDER (C)</b>	<b>7</b>	<b>403.6± 64.4<sup>C</sup></b>	<b>4.28±0.44<sup>C</sup></b>	<b>0.632±0.132<sup>E, F</sup></b>	<b>0.589±0.126<sup>E, F</sup></b>	<b>53.6 ± 10.7<sup>D</sup></b>
2012	1	455.0	4.13	0.537	0.561	50
2013	6	395.1±66.07	4.30±0.48±	0.648±0.137	0.594±0.137	54.2± 11.6
<b>EUCALYPTUS (C)</b>	<b>7</b>	<b>378.7± 70.0<sup>C, D</sup></b>	<b>5.80±0.34<sup>B</sup></b>	<b>0.787±0.179<sup>D, E</sup></b>	<b>0.761±0.180<sup>D, E</sup></b>	<b>53.6 ± 10.3<sup>D</sup></b>
2014	7	378.7± 70.0	5.80±0.34 <sup>B</sup>	0.787±0.179	0.761±0.180	53.6 ± 10.3
<b>STRAWBERRY TREE (C)</b>	<b>7</b>	<b>850.2±133.0<sup>A</sup></b>	<b>7.46± 1.03<sup>A</sup></b>	<b>4.613±0.906<sup>A</sup></b>	<b>4.262±0.624<sup>A</sup></b>	<b>70.0 ± 7.1<sup>C</sup></b>
2014	7	850.2±133.0	7.46± 1.03	4.613±0.906	4.262±0.624	70.0 ± 7.1
<b>CHESTNUT (L)</b>	<b>10</b>	<b>618.4± 49.4<sup>B</sup></b>	<b>4.44±0.79<sup>C</sup></b>	<b>1.197±0.334<sup>C, D</sup></b>	<b>1.133±0.259<sup>C, D</sup></b>	<b>71.5 ± 7.5<sup>C</sup></b>
2012	6	621.6± 53.3	3.94±0.46	1.000±0.115	0.994±0.105	67.5 ± 6.1
2013	4	613.7± 50.4	5.18±0.52	1.493±0.345	1.341±0.294	77.5 ± 5.0
<b>FIR HONEYDEW (L)</b>	<b>7</b>	<b>595.8± 42.4<sup>B</sup></b>	<b>5.12±0.16<sup>B, C</sup></b>	<b>1.504±0.180<sup>C</sup></b>	<b>1.431±0.292<sup>C</sup></b>	<b>84.3 ± 5.3<sup>B</sup></b>
2014	7	595.8± 42.4	5.12±0.16	1.504±0.180	1.431±0.292	84.3 ± 5.3
<b>HONEYDEW (L)</b>	<b>11</b>	<b>800.8±131.0<sup>A</sup></b>	<b>6.02±0.20<sup>D</sup></b>	<b>2.215±0.743<sup>B</sup></b>	<b>1.831±0.543<sup>B</sup></b>	<b>97.5 ± 9.8<sup>A</sup></b>
2012	3	922.5±105.0	6.06±0.42	2.500±0.930	1.960±0.660	93.3 ± 2.9
2013	8	755.2±112.3	6.00±0.07	2.108±0.703	1.783±0.536	99.1 ± 11.1

Tabella 2: Contenuto di fenoli totale (TPC), dell'attività antiossidante determinata mediante test ABTS, DPPH-Vis e DPPH-EPR e colore dei mieli misurato con Lovibond, mediati per origine botanica e per anno di produzione.

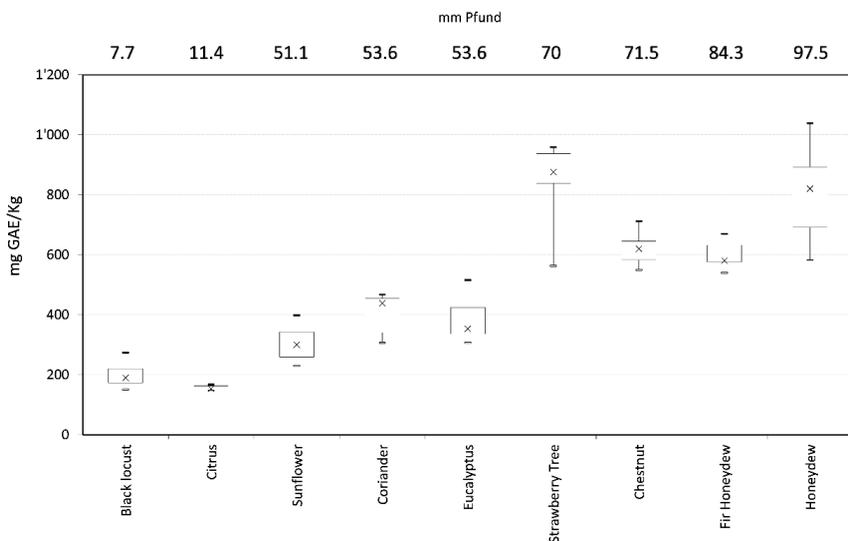


Figura 28: Diagramma box-plot del contenuto di polifenoli totali (espressi in mmol GAE/kg) dei mieli testati, raggruppati per origine botanica. La croce rappresenta la mediana dei valori, il 50% dei dati sono contenuti all'interno del rettangolo e i segmenti (baffi) indicano il quartile più basso e il più alto ognuno dei quali corrisponde al 25% dei dati. I valori riportati nella parte superiore del grafico riportano il valore medio del colore espresso in mm Pfund.

### 8.2.4.2 Attività antiossidante

Una grande varietà di metodi di analisi sono stati proposti ed utilizzati per determinare l'attività antiossidante delle matrici alimentari tuttavia al momento non vi è alcun metodo universale, ma diversi metodi ognuno dei quali ha dei vantaggi e delle limitazioni in base alla chimica e al meccanismo delle reazioni. Per questo motivo, per ottenere risultati affidabili riguardanti questa attività è consigliabile testare i campioni studiati con metodi diversi e confrontare i risultati (Amorati R. et al.,

2015). In questo studio, l'attività antiossidante dei mieli è stata determinata per mezzo dei saggi ABTS e DPPH e quest'ultimo è stato monitorato sia con tecniche spettrofotometriche che spettrometriche (EPR). Questi metodi sono spesso usati per studiare le matrici alimentari.

#### 8.2.4.3 *Test ABTS*

L'attività antiossidante (AA) dei campioni di miele è stata misurata utilizzando la reazione del radicale catione dell'ABTS con gli antiossidanti presenti nei campioni di miele. Prima dell'analisi, a causa della grande differenza di attività antiossidante tra i diversi campioni, è stata controllata la linearità della risposta del test con diluizioni diverse di campione. I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di miele sono riportati mediati per origine botanica (Figura 29) e per anno di produzione nella Tabella 2 dalla quale è evidente che l'attività antiossidante dei mieli dipende molto dalla fonte floreale. I valori vanno da 0.81 a 8.42 mmol TXE/kg e correlano bene con il contenuto in polifenoli totali ( $r = 0.7724$ ,  $p < 0.0001$ ).

I valori medi dell'attività antiossidante dei campioni aumenta nell'ordine: agrumi  $\approx$  robinia  $<$  coriandolo  $\approx$  castagno  $\approx$  girasole  $\leq$  melata di abete  $\leq$  eucalipto  $\approx$  melata  $<$  corbezzolo.

Anche in questo caso, i mieli di agrumi (1.24 mmol TXE/kg) e di robinia (1.81 mmol TXE/kg) mostrano i livelli di attività antiossidante

significativamente più bassi, mentre i mieli di corbezzolo (7.46 mmol TXE/kg) hanno quelli più alti. Da sottolineare che con questo test sono stati ottenuti rispetto agli altri saggi valori più alti nei mieli di eucalipto e di girasole. È evidente inoltre solo per i mieli di castagno (Tabella 2), una differenza significativa ( $p = 0.0041$ ) in termini di attività antiossidante tra i campioni raccolti nei diversi anni, con valori più bassi (3.94 mmol TXE/kg) nel 2012 rispetto al 2013 (5.18 mmol TXE/kg).

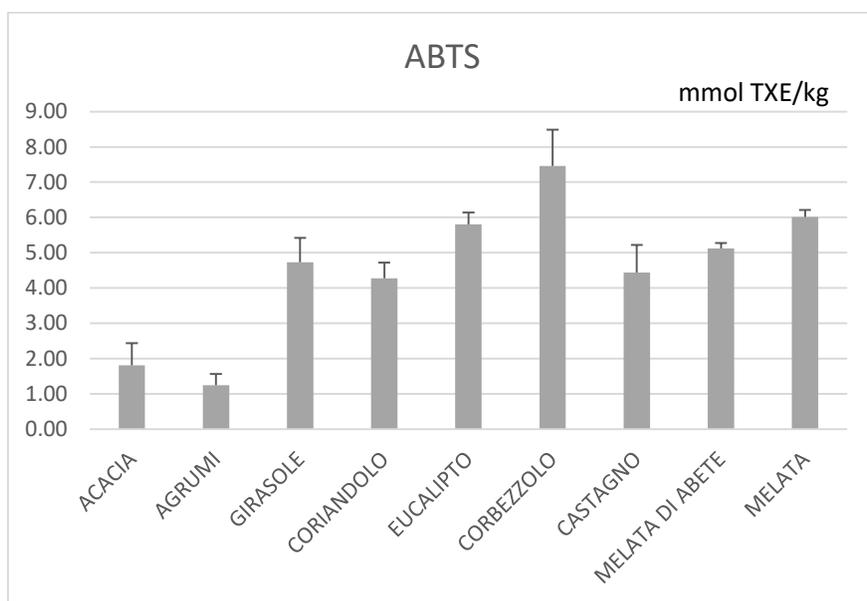


Figura 29: Attività antiossidante (mmol TXE/kg) ottenute mediante test ABTS, dei mieli suddivisi per origine botanica.

#### 8.2.4.4 *Test DPPH*

In questo test il DPPH, un radicale stabile centrato all'azoto reagisce con gli antiossidanti presenti nel campione e durante la reazione la scomparsa del radicale può essere monitorata per mezzo di uno spettrofotometro (DPPH-Vis) o di uno spettrometro di risonanza paramagnetica (DPPH-EPR) (Alvarez-Suarez J. M. et al., 2012). Anche per questo saggio, è stato testato che la risposta del campione a diverse concentrazioni fosse linearmente proporzionale alla sua concentrazione. Come si può notare dai dati riportati in Tabella 2 e dai grafici in Figura 30 e Figura 31, i risultati ottenuti con entrambi i metodi DPPH sono strettamente correlati ( $r = 0.9926$ ;  $p < 0.0001$ ) e sono dello stesso ordine di grandezza. Inoltre, questi due test correlano sia con attività antiossidante misurata con il test ABTS (DPPH-Vis:  $r = 0.7114$ ,  $p < 0.0001$ ; DPPH-EPR:  $r = 0.7019$ ;  $p < 0.0001$ ) e, in misura maggiore, con il contenuto in polifenoli (DPPH Vis:  $r = 0.8728$ ,  $p < 0.0001$ ; DPPH-EPR:  $r = 0.8603$ ;  $p < 0.0001$ ).

La media dei valori dei mieli della stessa origine botanica mostra che i mieli di agrumi e di robinia possiedono il più basso potere antiossidante ( $\approx 0.2$  mmol TXE/kg), mentre quelli di corbezzolo ( $\approx 4$  mmol TXE/kg) e di melata ( $\approx 2$  mmol TXE/kg) hanno l'attività antiossidante più alta. Inoltre, con questi test, i mieli con alti valori di AA vengono meglio differenziati mentre la risposta dei campioni con una bassa AA risulta un po' appiattita.

Dal confronto dei valori di AA dei mieli raccolti in anni diversi, sono state riscontrate inoltre differenze significative solo per i mieli di castagno ( $p = 0.031$ ) monitorati con il metodo DPPH-Vis, con valori più bassi nel 2012 (1.0 mmol TXE/kg) rispetto al 2013 (1.5 mmol TXE/kg). Questa differenza non è stata confermata nel metodo DPPH-EPR.

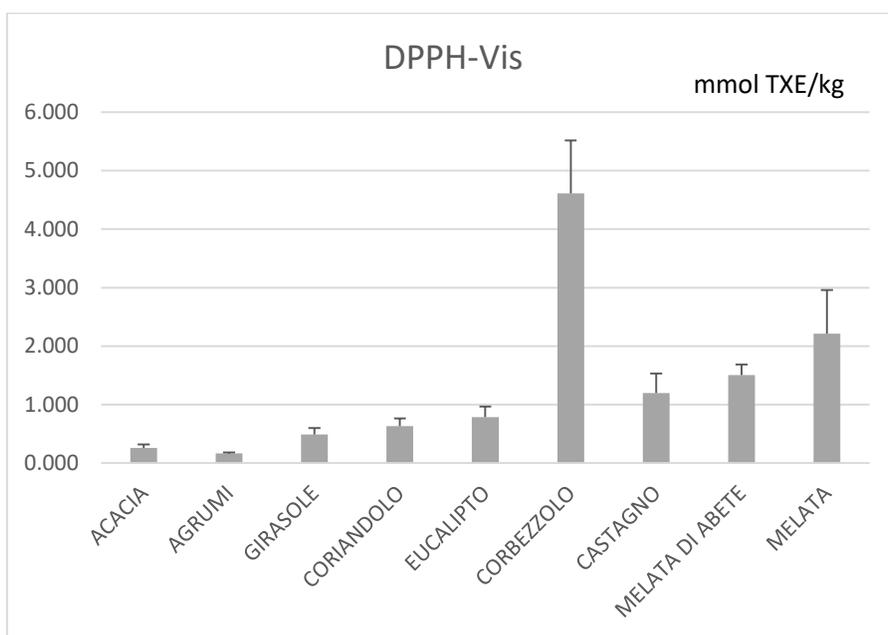


Figura 30: Attività antiossidante (mmol TXE/kg) ottenute mediante test DPPH-Vis, dei mieli suddivisi per origine botanica.

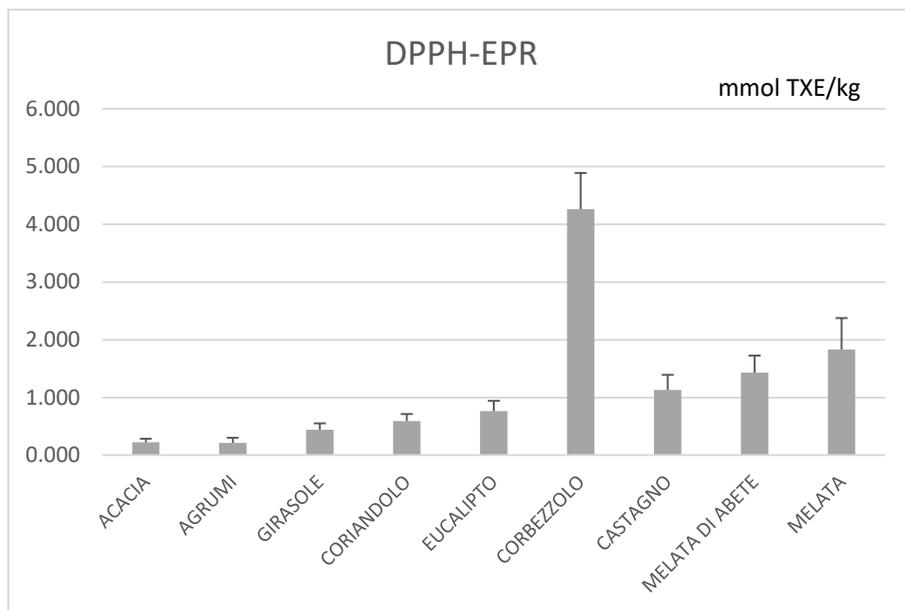


Figura 31: Attività antiossidante (mmol TXE/kg) ottenuta mediante test DPPH-EPR, dei mieli suddivisi per origine botanica.

#### 8.2.4.5 *Analisi del colore (Lovibond)*

Il colore dei campioni di miele è stato misurato con un comparatore ottico ed i valori ottenuti sono riportati nella Tabella 2 e nella Figura 32 sia in mm Pfund che con il sistema di classificazione USDA. I valori ottenuti dalla misura del colore di ogni campione sono stati mediati in base all'origine botanica dei mieli e sono stati utilizzati per classificare i mieli dal più chiaro al più scuro: questo ordine è stato utilizzato per riportare i dati ottenuti in tutte le diverse analisi.

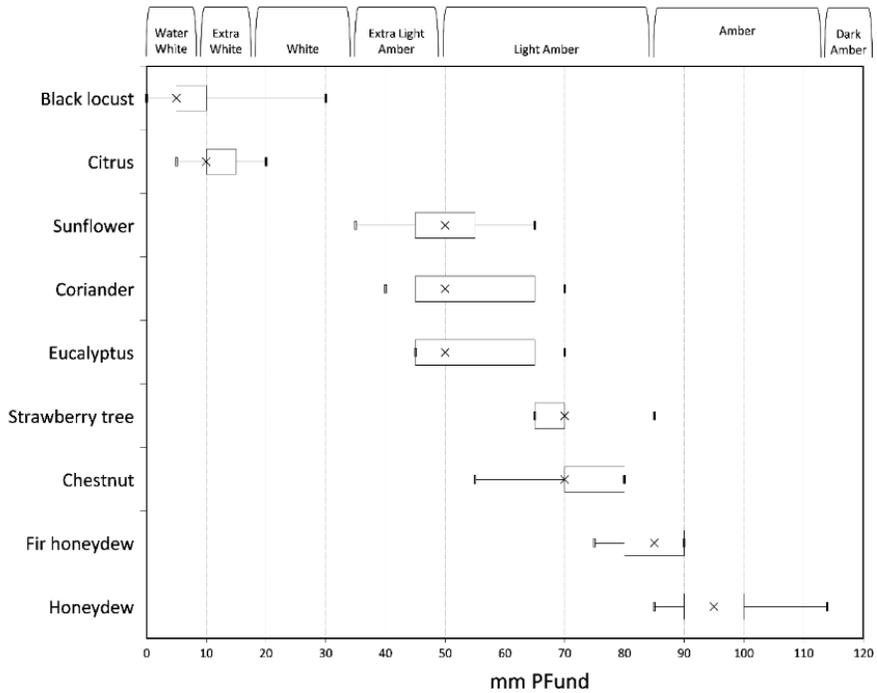


Figura 32: Diagramma box-plot del colore (mm Pfund) dei mieli testati misurato con comparatore ottico e raggruppati per origine botanica. La croce rappresenta la mediana dei valori, il 50% dei dati sono contenuti all'interno del rettangolo e i segmenti (baffi) indicano il quartile più basso e più alto ognuno corrispondente al 25% dei dati. Le didascalie sopra il grafico descrivono il colore del miele con il sistema di classificazione USDA.

#### 8.2.4.6 *Misurazione spettrofotometrica per l'analisi del colore*

Per determinare il colore del miele molti autori riportano l'uso degli assorbimenti a 450 o a 635 nm (Beretta G. et al., 2005). In questo lavoro per caratterizzare meglio questo parametro, è stato usato un approccio multivariato che utilizza l'intero range di assorbimento nel visibile dei mieli. A questo scopo sono stati registrati gli spettri di assorbimento dei campioni di miele nel visibile da 350 a 700 nm ad intervalli di 5 nm, e i dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando l'analisi discriminante (DA) in modo da determinare le variabili (lunghezze d'onda) che meglio riescono a discriminare tra i gruppi di mieli di diversa origine botanica. Per effettuare tale analisi l'insieme di dati raggruppato per origine botanica è stato sottoposto ad analisi discriminante quadratica, selezionando le variabili ( $\lambda$ ) a passi successivi in avanti, in base al valore di F, utilizzando una soglia di tolleranza di 0.01 e una probabilità associata a ciascuna delle classi pari alla frequenza. Con questo modello sono state selezionate le sette variabili  $\lambda_{350}$ ,  $\lambda_{360}$ ,  $\lambda_{365}$ ,  $\lambda_{385}$ ,  $\lambda_{445}$ ,  $\lambda_{490}$ ,  $\lambda_{645}$  che riescono a classificare correttamente il 100% dei campioni di miele (Tabella 3).

<b>Variabile</b>	<b>Lambda</b>	<b>F</b>	<b>DF1</b>	<b>DF2</b>	<b>p-value</b>
350	0.050	255.121	8	108	< 0.0001
360	0.067	189.216	8	108	< 0.0001
365	0.071	175.560	8	108	< 0.0001
385	0.082	151.783	8	108	< 0.0001
445	0.133	88.301	8	108	< 0.0001
490	0.170	65.689	8	108	< 0.0001
645	0.193	56.547	8	108	< 0.0001

Tabella 3: Analisi Discriminante. Test unidimensionale di uguaglianza delle medie delle classi ottenuto dell'analisi discriminante eseguita sull'intero insieme di dati costituito da 117 campioni di miele classificati in 9 gruppi e 71 variabili (da  $\lambda_{350}$  a  $\lambda_{700}$ , ogni 5 nm).

### **8.2.5 *Discussione***

I risultati che sono stati ottenuti (Tabella 2) dall'analisi dell'attività antiossidante e del colore sono in linea con la maggior parte dei dati presenti in letteratura (Baek Y. et al., 2015; Can Z. et. al., 2015; Persano Oddo L. et. al., 1995; Petretto G. L. et. al., 2015; Wilczynska A., 2014) e mostrano dipendenze dall'origine botanica del miele. In generale, i mieli di corbezzolo mostrano i valori più alti in tutti i test, in particolare nel test DPPH, nonostante questi mieli non abbiano una colorazione particolarmente scura, tuttavia, si può notare che tali mieli hanno un sapore molto amaro che può essere attribuito alla presenza di grandi quantità di polifenoli (Drewnowski A. et al., 2000). Al contrario i mieli di agrumi e robinia, caratterizzati da colori chiari e da un sapore delicato

(Persano Oddo L. e al., 1995), mostrano i valori più bassi in tutti i test. I mieli di castagno possiedono una elevata attività antiossidante e un colore scuro e le melate di abete e di bosco, che differiscono dagli altri tipi di miele poiché non sono prodotte dal nettare dei fiori, ma dall'elaborazione da parte dell'ape di resine di alberi o di secrezioni di insetti, mostrano valori elevati in tutte le analisi compreso il colore, anche se la loro attività antiossidante è inferiore a quella dei mieli di corbezzolo. Gli altri tipi di mieli analizzati danno valori intermedi sia per quanto riguarda l'attività antiossidante che il colore.

I risultati ottenuti indicano che l'origine floreale dei mieli influenza il loro colore, la loro attività antiossidante e le loro caratteristiche sensoriali. Tuttavia, piccole deviazioni nella correlazione tra i diversi test, probabilmente dovute alla presenza di diversi fitochimici nei vari tipi di miele impedisce di ottenere delle relazioni semplici tra questi fattori ma suggerisce la possibilità di classificare i mieli con l'analisi multivariata.

### ***8.2.6 Analisi multivariata***

Per ottenere quindi un quadro più semplificato del rapporto tra le diverse variabili analizzate, i risultati ottenuti sono stati elaborati mediante analisi multivariata.

### 8.2.6.1 *Cluster Analisi*

Prima di tutto, i dati sono stati sottoposti a Cluster analisi gerarchica per verificare se la struttura di dati è in grado di identificare diversi gruppi tra i campioni di miele. La Cluster analisi separa infatti i campioni in gruppi (cluster) in modo tale che i componenti assegnati a un particolare cluster siano simili tra loro ma distinti dagli altri.

Vista la natura dei nostri dati abbiamo scelto di utilizzare il raggruppamento gerarchico agglomerativo con il metodo del legame singolo utilizzando la misura della distanza Euclidea nello spazio del cluster. Per l'analisi sono stati utilizzati i dati relativi a tutti i campioni di miele e come variabili, quelle relative all'attività antiossidante (TCP, ABTS, DPPH-Vis, DPPH-EPR) e quelle legate al colore (Lovibond,  $\lambda_{350}$ ,  $\lambda_{360}$ ,  $\lambda_{365}$ ,  $\lambda_{385}$ ,  $\lambda_{445}$ ,  $\lambda_{490}$ ,  $\lambda_{645}$ ). È stato inoltre aggiunto come ulteriore variabile per aiutare a differenziare i tipi di miele, il loro stato di cristallizzazione, determinato all'incirca dopo sei mesi dalla raccolta. Questo in quanto l'origine botanica del miele contribuisce alla sua composizione in zuccheri con una conseguente influenza sulla velocità del processo di cristallizzazione che può essere rapido, medio o lento (Belay A. et al. 2015): tra i due carboidrati principalmente presenti, il glucosio ne promuove la cristallizzazione mentre il fruttosio la rallenta. Il risultato ottenuto dalla Cluster analisi, rappresentato come dendrogramma (Figura 33) e descritto in Tabella 4, mostra la presenza di undici gruppi di miele.

I mieli di robinia, castagno, agrumi, corbezzolo e di melata di abete sono tutti raggruppati ognuno nel proprio gruppo, mentre la melata di bosco forma cinque gruppi vicini. I mieli di eucalipto, coriandolo e girasole sono invece raggruppati nello stesso cluster. La possibilità di raggruppare la maggior parte dei campioni di miele in cluster separati indica che le proprietà antiossidanti e il colore del miele contengono informazioni utili per la classificazione dei campioni.

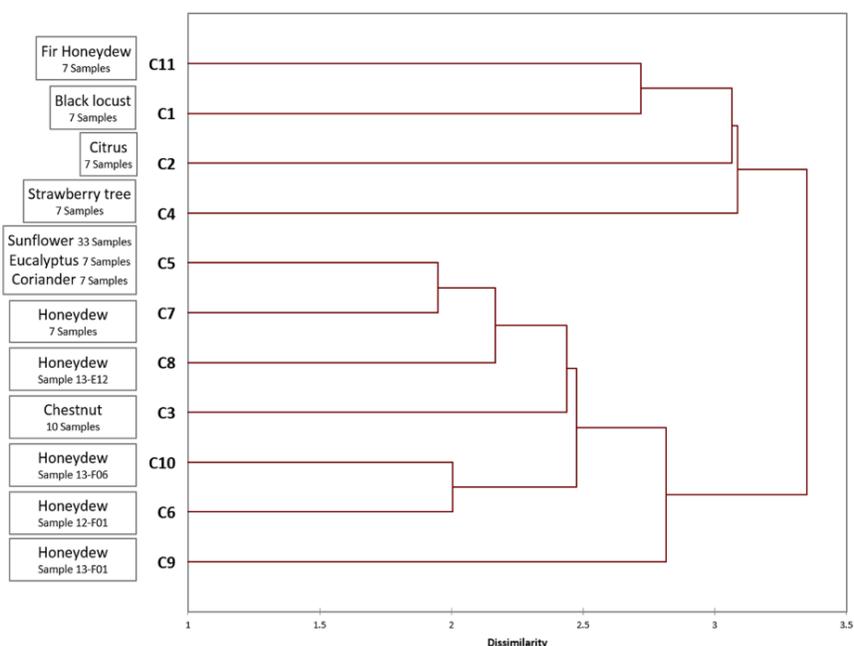


Figura 33: Dendrogramma ottenuto dalla Cluster analisi effettuata, utilizzando l'algoritmo di legame singolo (distanza Euclidea), sull'intero insieme di dati comprendente 117 campioni di miele e 13 variabili (TPC, ABTS, DPPH-Vis, DPPH-EPR, Lovibond,  $\lambda_{350}$ ,  $\lambda_{360}$ ,  $\lambda_{365}$ ,  $\lambda_{385}$ ,  $\lambda_{445}$ ,  $\lambda_{490}$ ,  $\lambda_{645}$  e lo stato di cristallizzazione).

Cluster	Numero dei campioni	Varianza tra classi	Distanza minima dal centroide	Distanza media dal centroide	Distanza massima dal centroide	Campioni
1	28	0.351	0.185	0.521	1.304	Acacia
2	7	0.170	0.190	0.355	0.595	Agrumi
3	10	1.636	0.385	1.171	1.586	Castagno
4	7	2.067	0.530	1.157	2.623	Corbezzolo
5	47	1.775	0.281	1.228	2.308	Coriandolo, Eucalipto, Girasole
6	1	0.000	0.000	0.000	0.000	Melata (12-F01)
7	7	2.204	0.289	1.249	2.328	Melata
8	1	0.000	0.000	0.000	0.000	Melata (13-E02)
9	1	0.000	0.000	0.000	0.000	Melata (13-F01)
10	1	0.000	0.000	0.000	0.000	Melata (13-F06)
11	7	0.412	0.355	0.568	0.822	Melata d'abete

Tabella 4: Descrizione statistica della Cluster analisi effettuata usando l'algoritmo a legame singolo (distanza Euclidea) su l'intero insieme di dati comprendenti 117 campioni di miele uniflorale e 13 variabili.

### 8.2.6.2 *Analisi delle componenti principali (PCA)*

L'analisi delle componenti principali è uno strumento utile per ridurre la dimensione dei dati e visualizzare le somiglianze tra campioni, e fornisce una prima valutazione dell'efficacia classificatoria delle variabili considerate.

Con questo scopo, i risultati ottenuti nelle diverse analisi (TPC, ABTS, DPPH, Lovibond, e i dati spettrofotometrici selezionati mediante analisi DA) e lo stato di cristallizzazione dei campioni di miele sono

stati sottoposti a PCA; inoltre la variabile DPPH-Vis è stata esclusa a causa della sua stretta correlazione con la variabile DPPH-EPR. Questo modello di PCA che utilizza l'intero insieme di dati (117 campioni) e 9 variabili (Tabella 5) ha portato all'ottenimento di tre componenti principali significative, con un autovalore  $\geq 1$ , che spiegano il 94% della variabilità totale del sistema. La Tabella 5 mostra la varianza spiegata e la matrice dei coefficienti per le prime tre componenti principali. La prima PC1 (72.6%) comprende la maggior parte delle informazioni derivanti dai risultati sperimentali. Lo stato di cristallizzazione del miele è invece prevalentemente spiegato dalla PC2 (12.2%). Inoltre, in questa componente principale diventa importante anche il contributo della variabile ABTS mentre la variabile TPC non viene considerata. La terza componente (PC3) infine descrive l'attività antiossidante e il contenuto in polifenoli in contrasto con gli assorbimenti a lunghezze d'onda  $> 400$  nm che contribuiscono alla formazione della tonalità bruna nel miele (09.1%).

<b>Variance explained</b>	PC1	PC2	PC3
Eigenvalues	8.716	1.467	1.096
% of variance	72.637	12.228	9.136
Cumulative %	72.637	84.865	94.001
<b>Factor loading</b>			
TPC	0.894	-0.026	0.432
ABTS	0.793	-0.506	0.170
DPPH-EPR	0.621	-0.279	0.702
Lovibond	0.947	-0.146	0.009
Crystallization	0.068	0.896	0.276
$\lambda_{350}$	0.843	0.388	-0.033
$\lambda_{360}$	0.932	0.282	-0.027
$\lambda_{365}$	0.970	0.196	-0.032
$\lambda_{385}$	0.985	0.117	-0.055
$\lambda_{445}$	0.959	-0.067	-0.212
$\lambda_{490}$	0.882	-0.143	-0.383
$\lambda_{645}$	0.901	-0.034	-0.339

Tabella 5: Analisi delle componenti principali. Autovalori, varianza spiegata e cumulata, pesi fattoriali per le prime tre componenti principali (PC).

L'analisi dei diagrammi dei pesi fattoriali (a) e di dispersione (b) delle prime due componenti, visualizzati in Figura 34, mostra che i campioni di differente origine botanica, vengono ben differenziati formando diversi gruppi, anche se alcuni campioni vengono racchiusi in gruppi diversi e per questi tipi di miele i gruppi quindi si sovrappongono. In particolare il miele di castagno e le melate sia di abete che di bosco, caratterizzati da un elevato contenuto di polifenoli e da un colore scuro, si trovano nella parte superiore a destra del grafico (Figura 34b).

Al contrario, i mieli di robinia e di agrumi caratterizzati da un colore chiaro e da una bassa attività antiossidante si trovano nella zona di sinistra del grafico (Figura 34) e sono separati solo dal loro stato di cristallizzazione. I mieli di girasole, di eucalipto e di coriandolo si trovano un po' sovrapposti evidenziando caratteristiche simili ed intermedie, nonostante i mieli con più bassi valori ABTS (vale a dire i mieli di coriandolo) si trovano più alto nel diagramma di PC1 vs PC2 (Figura 34b). I mieli di corbezzolo infine, che mostrano i valori più alti di ABTS (negativo in PC2) e che si trovano allo stato solido, si trovano sul lato in basso a destra del grafico (Figura 34b). Inoltre, il diagramma di dispersione di PC2 vs PC3 (Figura 35) evidenzia i bassi valori di assorbanza a  $\lambda > 400$  nm e l'alto potere antiossidante di questo tipo di mieli.

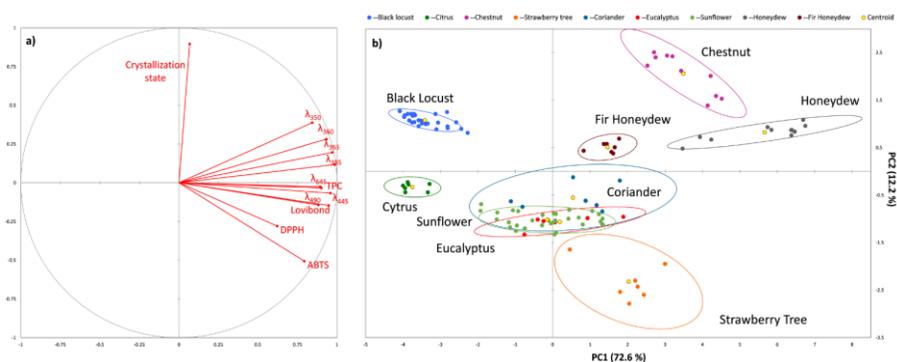


Figura 34: Analisi delle componenti principali. Diagramma dei pesi fattoriali (a) e di dispersione (b) delle prime due componenti. FOLIN: contenuto totale di fenoli (TPC); ABTS: test ABTS; DPPH-EPR: test DPPH monitorato mediante EPR; Lovibond: colore; Stato di cristallizzazione: liquido (0) cristallizzato (1);  $\lambda_{350}$ ,  $\lambda_{360}$ ,  $\lambda_{365}$ ,  $\lambda_{385}$ ,  $\lambda_{445}$ ,  $\lambda_{490}$ ,  $\lambda_{645}$ : assorbanza alla  $\lambda$  descritta.

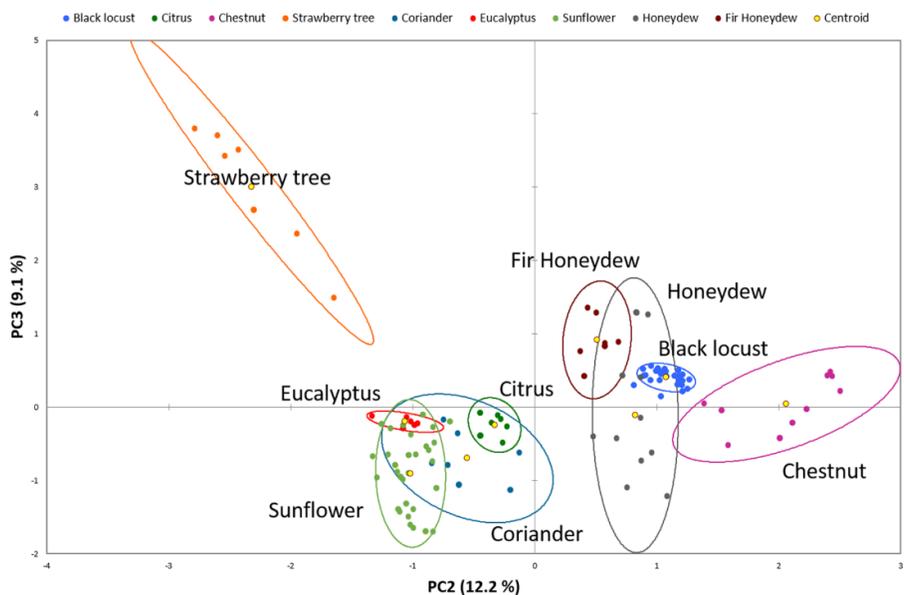


Figura 35: Analisi delle componenti principali. Diagramma di dispersione della seconda vs. la terza componente. FOLIN: contenuto totale di fenoli TPC; ABTS: test ABTS; DPPH-EPR: test DPPH monitorato mediante EPR; Lovibond: colore; Stato di cristallizzazione: liquido (0) cristallizzato (1);  $\lambda_{350}$ ,  $\lambda_{360}$ ,  $\lambda_{365}$ ,  $\lambda_{385}$ ,  $\lambda_{445}$ ,  $\lambda_{490}$ ,  $\lambda_{645}$ : assorbanza alla  $\lambda$  descritta.

### **8.2.7 Conclusioni**

In questo studio sono stati analizzati nove tipi di mieli, prodotti in diverse regioni d'Italia e raccolti in tre diversi anni, ottenendo una caratterizzazione delle proprietà antiossidanti e del colore dei principali tipi di miele italiani. In particolare è stato caratterizzato il miele di coriandolo, tipico del centro Italia e raramente descritto in letteratura.

Per determinare l'attività antiossidante dei mieli sono stati utilizzati più test in modo da avere un quadro più affidabile degli antiossidanti presenti nei diversi campioni poiché diversi antiossidanti possono reagire diversamente a seconda del test utilizzato.

Per caratterizzare il colore è stata effettuata un'analisi DA con il fine di scegliere le variabili spettrofotometriche in grado di differenziare meglio i diversi tipi di miele.

Per caratterizzare e differenziare i vari mieli sono stati quindi utilizzati tutti i parametri valutati: l'analisi multivariata dell'attività antiossidante, del contenuto fenolico, del colore e dello stato di cristallizzazione ha permesso la differenziazione tra l'origine botanica di alcuni dei campioni di miele, vale a dire corbezzolo, agrumi, robinia, castagno e melata di abete e di bosco.

L'elaborazione dei risultati ottenuti dalle analisi sui campioni confermano i presupposti che sono alla base di questo progetto vale a dire che i composti fenolici, responsabili dell'attività antiossidante, contribuiscono alla formazione del colore del miele: i mieli uniflorali

più chiari, come per esempio la robinia e gli agrumi mostrano infatti un minor potere antiossidante mentre il corbezzolo, la melata di abete e di bosco, solitamente sulle tonalità dell'ambrato, mostrano un elevato contenuto in antiossidanti.

Il metodo conferma inoltre come sia possibile caratterizzare e classificare mieli uniflorali con tecniche strumentali facili ed a basso costo, come l'analisi dell'attività antiossidante e del colore che richiedono tempi brevi e possono essere utilizzati in analisi di routine. Questo tipo di analisi potrebbe inoltre essere utilizzato per caratterizzare mieli di altre origini botaniche.

Ciò non toglie che ulteriori studi saranno necessari per valutare altre variabili che possano meglio contribuire alla caratterizzazione floreale. I risultati del progetto possono essere utili al fine di promuovere la produzione e il consumo di questi prodotti apicoli e per sensibilizzare i consumatori alla conoscenza delle tipicità e delle caratteristiche che differenziano i mieli uniflorali, puntando non solo sulle peculiarità organolettiche del prodotto ma ponendo l'accento anche sui valori nutrizionali in termini di attività antiossidante. Il colore infatti potrebbe essere usato come indicatore per trasmettere al consumatore in modo semplice e immediato un importante valore nutrizionale quale l'attività antiossidante.

## **8.3 ANALISI DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E DEL COLORE DI MIELI MULTIFLORALI MARCHIGIANI**

### **8.3.1 *Introduzione***

Storicamente, i prodotti alimentari sono da sempre legati alla loro specifica origine geografica. Le abitudini alimentari spesso derivano dalle risorse naturali locali e da fattori sociali o culturali della comunità. Purtroppo nell'ultimo secolo il legame con il territorio è andato a scomparire per diversi motivi: la globalizzazione, la produzione di cibo a livello industriale e la crescita estensiva di mezzi tecnologici hanno portato le popolazioni ad acquisire abitudini alimentari comuni nei diversi luoghi. Come conseguenza, il consumo alimentare degli abitanti di una regione non riflette più la produzione alimentare di tale zona. Negli ultimi anni tuttavia, i consumatori hanno riniziato a preferire e ad utilizzare gli alimenti strettamente legati al loro luogo di origine. La tendenza al consumo di prodotti biologici e/o salutari, la preoccupazione per il benessere degli animali e il rispetto dell'ambiente e dei metodi di produzione sembrano essere le ragioni di questa nuova tendenza da parte dei consumatori. Tutto ciò ha fatto in modo che i prodotti locali di tutto il mondo riacquistassero la loro fama, portando così ricchezza ai produttori locali (Drivelos S. A. et al., 2012).

L'Unione Europea (UE) per salvaguardare e sostenere la diversificazione territoriale e di produzione dei prodotti alimentari ha quindi introdotto la denominazione d'origine protetta (DOP), l'indicazione geografica protetta (IGP) e la specialità tradizionale garantita (STG) che sono dei marchi che permettono di legare le caratteristiche di un alimento alla sua origine geografica e al particolare metodo di produzione.

Tali prodotti per la loro composizione unica e/o per le caratteristiche tipiche date loro dalle particolari tecniche di trasformazione sono venduti sui mercati nazionali e internazionali a prezzi più elevati.

A causa della preoccupazione dei consumatori riguardo l'autenticità degli alimenti, tra i quali anche il miele, è quindi diventato importante negli ultimi anni determinare e riconoscere la loro provenienza geografica (Drivelos S. A. et al., 2012; Jandric Z. et al., 2015; Kaškonienė V. et al., 2010). Il problema dell'autenticità dei prodotti alimentari ha portato quindi all'insorgenza di diverse problematiche che riguardano il controllo delle sofisticazioni e dell'etichettatura, nella quale possono essere riportate indicazioni fuorvianti (Drivelos S. A. et al., 2012). Per questo motivo l'autenticità dell'alimento, è un attributo di qualità per i prodotti alimentari ed in ogni parte del mondo è sempre più tutelata dalla legislazione, insieme alla qualità e alla sicurezza alimentare.

Per quanto riguarda il miele, di recente si sono verificati diversi casi, su larga scala, di “miele riciclato” cioè filtrato per rimuoverne il polline,

che è l'indicatore utilizzato per risalire all'origine botanica e geografica del prodotto.

Come è ben noto, i mieli costituiti da una miscela di nettare e/o di melata di diverse specie di piante, che rappresentano la maggior parte dei mieli sul mercato, sono detti "millefiori". Qualora al miele venga attribuita la denominazione botanica, oppure il nome della zona geografica nella quale è stato prodotto, possiederà delle proprietà che dipenderanno non solo dalla fonte floreale, ma anche da fattori come la sottospecie di ape, l'area geografica, la stagione di produzione, le condizioni climatiche e le tecniche apistiche adottate per la sua produzione (Juan-Borrás M. et al., 2014; Jandri Z. et al., 2015). Pertanto, la classificazione sulla base dell'origine floreale e geografica nonostante possa essere molto difficile (Jandri Z. et al., 2015; Kaškonienė V. et al., 2010) è diventata una buona alternativa per tutelare e promuovere la cucina tradizionale dei diversi paesi (Juan-Borrás M. et al., 2014).

Di conseguenza, la determinazione dell'origine botanica e geografica del miele è diventata di grande interesse in tutto il mondo (Drivelos-Spiritos A. et al., 2012).

Diverse ricerche infatti, (Wei Z. et al., 2014; Kropf U. et al., 2010; Karabagias K. I. et al., 2014; Karabagias K. I. et al., 2017; Wei Z. et al., 2010; Fechner C. D. et al., 2016; Jandri Z. et al., 2015; Juan-Borrás M. et al., 2014; Castro-Vázquez L. et al., 2010; Karabournioti A. et al., 2006) negli ultimi anni si sono rivolte allo studio della determinazione

dell'origine geografica di mieli uniflorali e multiflorali provenienti da tutto il mondo (Grecia, Cina, Spagna, Argentina, Australia, Nuova Zelanda, Francia, Turchia, Romania, Repubblica Ceca, Egitto, Marocco e Italia) attraverso l'analisi dei parametri chimico-fisici (es. composizione volatile, colore, pH, acidità libera e totale, conducibilità elettrica, umidità, ceneri, contenuto minerale, HMF, attività diastatica, zuccheri, rapporti isotopici, ecc.), dell'origine botanica (analisi melissopalinoologica), delle caratteristiche sensoriali e/o delle proprietà reologiche.

A tal proposito, ad esempio, i “Mieli di Granada” riconosciuti come DOP sono stati analizzati (de Alda-Garcilope C. et al., 2012) per il contenuto in metalli al fine di caratterizzare l'origine geografica dei mieli di questa zona con dei parametri oggettivi e quindi aumentarne le conoscenze. Analogamente, da uno studio (Di Bella G. et al., 2015) del 2015 è emerso che la presenza di minerali nei mieli italiani è correlata dall'origine geografica (Sicilia o Calabria).

Un altro studio condotto su mieli di tre diverse fonti floreali provenienti da diversi paesi (Italia, Ungheria, Sud America e Cina), ha permesso una corretta discriminazione geografica dei campioni di miele sulla base del contenuto saccaridico determinato attraverso l'NMR (Consonni R. et al., 2013).

Visto che sembrerebbe che nel miele la quantità di composti responsabili dell'attività antiossidante non sia influenzata solo dall'origine botanica ma anche da quella geografica (Bertoncelj J. et al.,

2007) e vista la scarsità dei dati in letteratura che riportano (Blasa M. et al., 2006) la determinazione del potere antiossidante di millefiori italiani, è nato il progetto di ricerca sulla determinazione dell'attività antiossidante di mieli millefiori italiani e in particolare marchigiani.

Questo progetto si propone quindi di determinare l'attività antiossidante ed il colore di campioni di mieli millefiori provenienti da diverse zone della regione Marche e di trovare una possibile relazione tra tali parametri, la provenienza geografica e la specie botanica prevalentemente presente nei campioni.

### **8.3.2 *Campioni***

In questo progetto sono stati analizzati 96 mieli millefiori prodotti esclusivamente dalla regione Marche nelle stagioni apistiche 2012 e 2013. I campioni sono stati raccolti direttamente dagli apicoltori e sono stati conservati in tubi di polietilene a 4°C al buio fino all'uso: essi hanno partecipato al concorso annuale "Premio Qualità Miele Marchigiano" organizzato dall'ASSAM e sono quindi di alta qualità. Per verificare il rispetto dei limiti secondo gli standard stabiliti dal Regolamento CE n. 110 del 2001 (Comunità Economica Europea, 2001) ne è stata determinata l'umidità e il contenuto in HMF (idrossimetilfurfurale).

I campioni presi in esame, come si può osservare dalla Figura 36, provengono da tutte le province della regione anche se la maggior parte

sono stati prodotti in apiari presenti nella provincia di Macerata (n. 35) e Ancona (n. 31), in misura minore provengono invece da Pesaro (n. 13), Fermo (n. 12) e Ascoli Piceno (n. 5).

I campioni presi in esame sono stati da noi classificati, in base alla carta regionale delle Marche messa a punto dal Prof. Taffetani dell'Università Politecnica delle Marche (Figura 37), come appartenenti alla fascia “alto-collinare e submontana” oppure a quella “collinare media e costiera”.

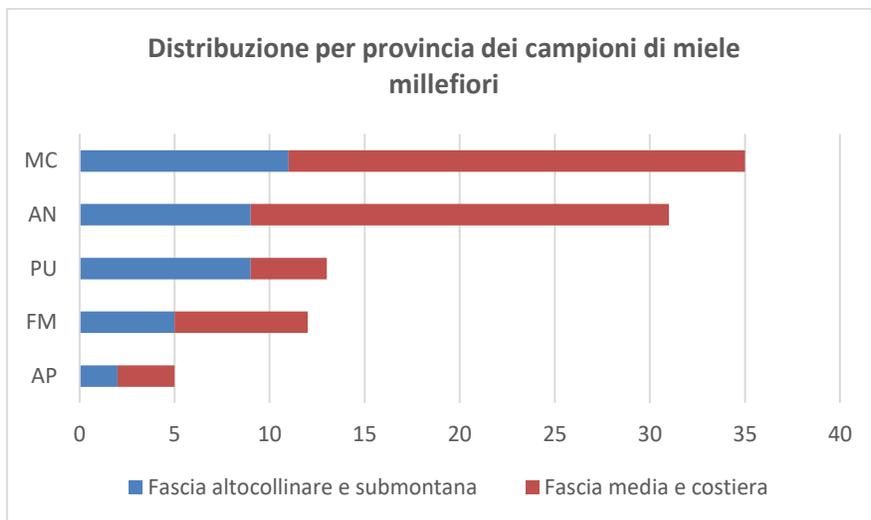


Figura 36: Distribuzione per provincia dei campioni di miele millefiori suddivisi per fasce.

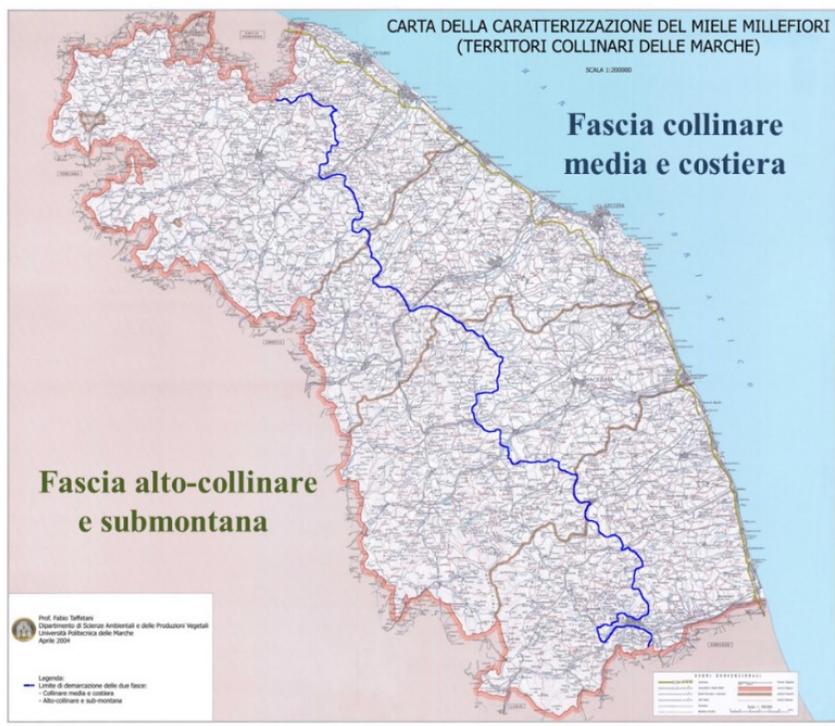


Figura 37: Carta della regione Marche suddivisa in fascia “alto-collinare e submontana” e “collinare media e costiera”.

### 8.3.3 *Materiali e metodi*

Per la determinazione del contenuto totale fenolico, dell’attività antiossidante e del colore, i mieli sono stati analizzati con gli stessi metodi utilizzati per i mieli uniflorali (paragrafo 8.2.2). I risultati ottenuti da tali analisi sono stati quindi elaborati statisticamente con un approccio di tipo multivariato.

### 8.3.4 Risultati

I risultati dei test relativi alla misura dell'attività antiossidante (TPC, ABTS, DPPH, EPR) e del colore (Lovibond) raggruppati per fascia sono riportati in Tabella 6 e nella Figura 38.

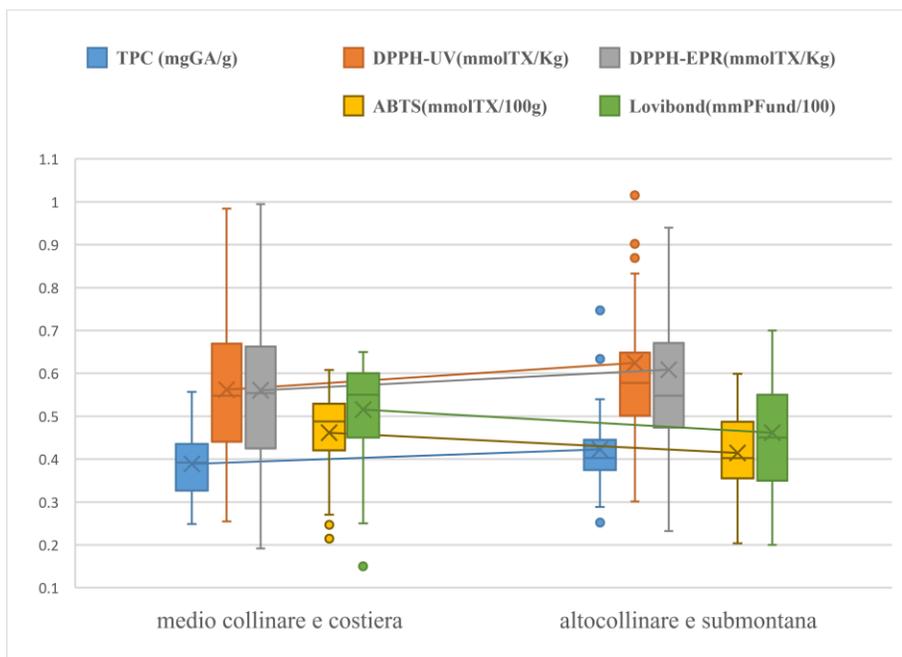


Figura 38: Box plot dei risultati dei test relativi alla misura del contenuto in polifenoli totali (TPC), dell'attività antiossidante (ABTS, DPPH, EPR) e del colore (Lovibond) raggruppati per fascia.

Come risulta evidente dal grafico, i mieli multiflorali mostrano un contenuto di antiossidanti molto variabile a causa della loro provenienza multiflorale; inoltre quelli della fascia altocollinare e submontana mostrano in media valori di poco superiori rispetto a quelli della fascia media e costiera nel test TPC ( $p = 0.0295$ ) (Figura 39) e nei due test DPPH ( $p > 0.05$ ) (Figura 40 e Figura 41), mentre nei test ABTS ( $p = 0.0263$ ) e Lovibond ( $p = 0.02$ ) i mieli della fascia costiera risultano avere valori di poco maggiori (Figura 42 e Figura 43).

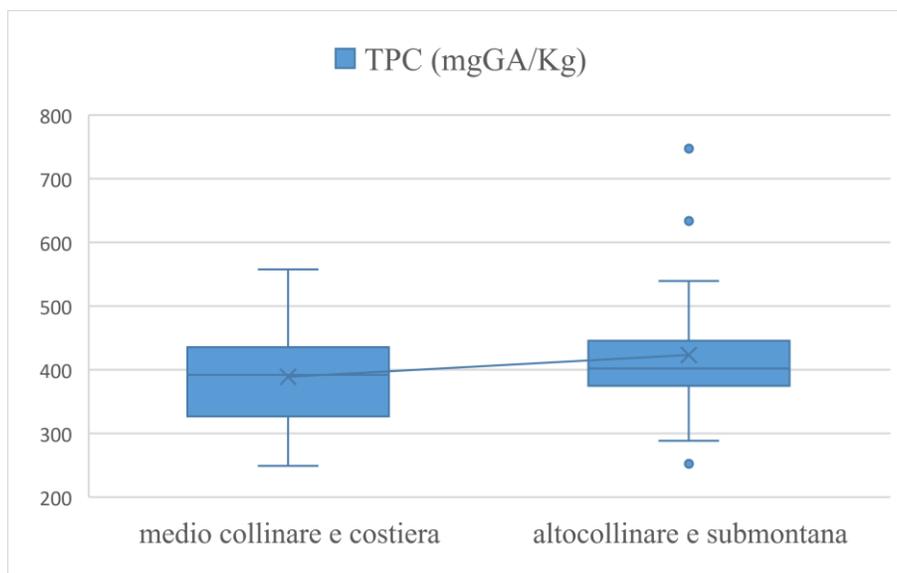


Figura 39: Box plot e significatività dei risultati del test TPC dei campioni di miele millefiori suddivisi per fascia.

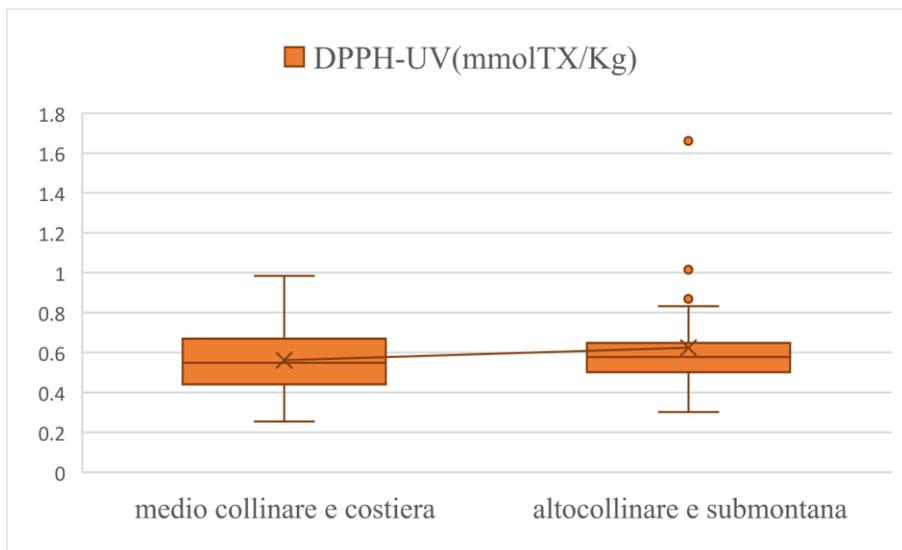


Figura 40: Box plot e significatività dei risultati del test DPPH dei campioni di miele millefiori suddivisi per fascia.

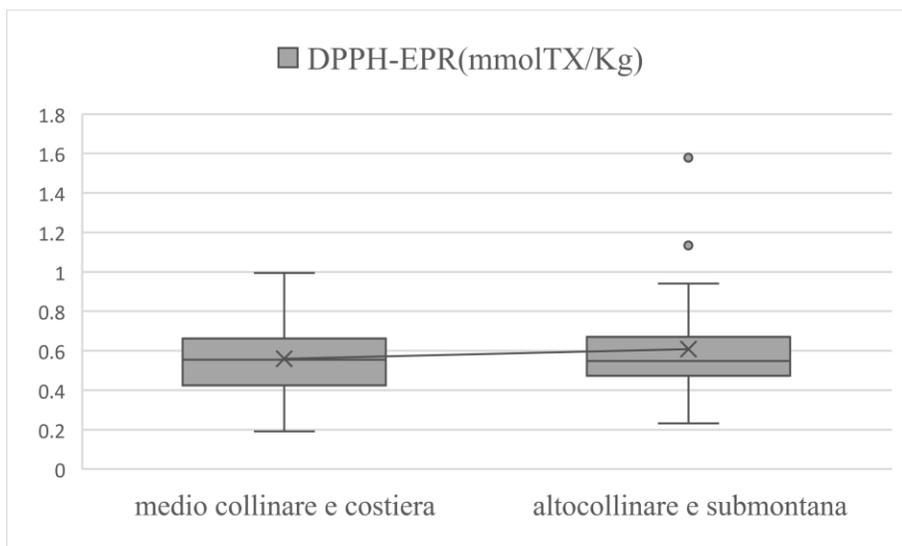


Figura 41: Box plot e significatività dei risultati del test EPR dei campioni di miele millefiori suddivisi per fascia.

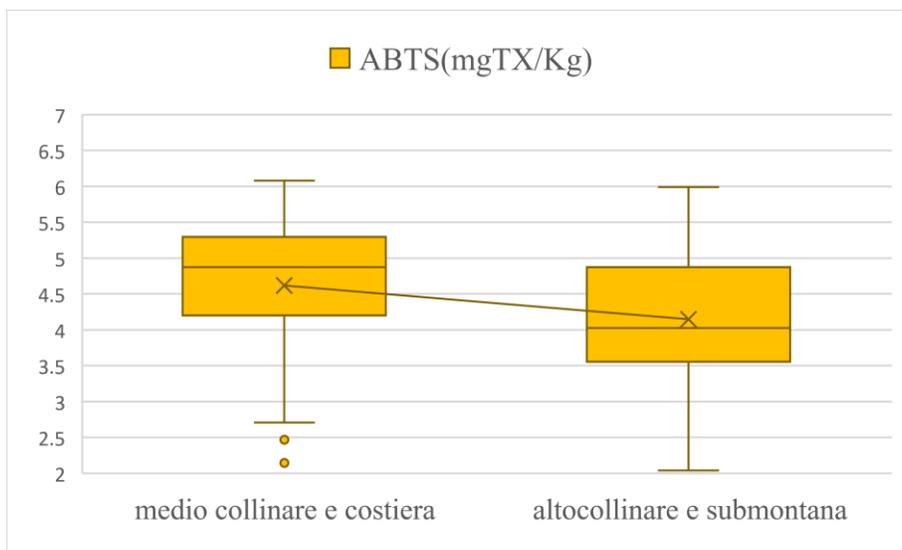


Figura 42: Box plot e significatività dei risultati del test ABTS dei campioni di miele millefiori suddivisi per fascia.

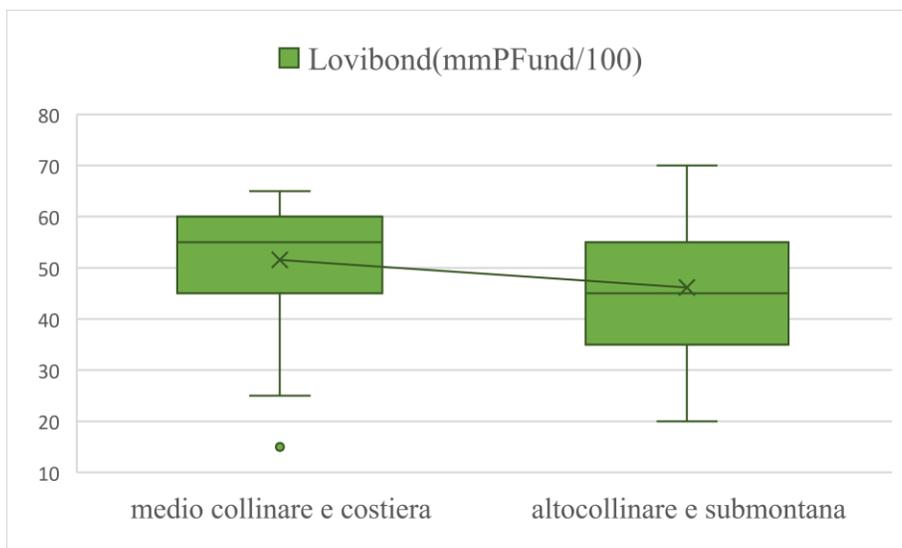


Figura 43: Box plot e significatività dei risultati del test Lovibond dei campioni di miele millefiori suddivisi per fascia.

<b>CAMPIONI MIELE</b>	<b>TPC mg GAE/kg</b>	<b>ABTS mmol TXE/kg</b>	<b>DPPH-Vis mmol TXE/kg</b>	<b>DPPH-EPR mmol TXE/kg</b>	<b>LOVIBOND mm Pfund</b>	<b>PC2</b>
<b>ALTO COLLINARE E SUB-MONTANA</b>	<b>421 ±93</b>	<b>4.2 ±1.06</b>	<b>0.62 ±0.241</b>	<b>0.62 ±0.251</b>	<b>46.4</b>	<b>-1.266<sup>B</sup></b>
12-B02	462 ±31	3.8 ±0.20	0.72 ±0.056	0.67 ±0.035	45	-1.47
12-B04	439 ±22	5.3 ±0.36	0.55 ±0.062	0.49 ±0.001	55	-0.288
12-B05	438 ±15	5.6 ±0.16	0.61 ±0.038	0.54 ±0.025	55	0.463
12-B06	395 ±17	3.7 ±0.14	0.36 ±0.064	0.33 ±0.004	30	-1.634
12-B08	414 ±21	5.4 ±0.22	0.54 ±0.035	0.51 ±0.001	55	0.393
12-B12	634 ±23	5.5 ±0.12	0.90 ±0.044	0.89 ±0.028	65	-3.62
12-C06	524 ±17	5.0 ±0.14	0.83 ±0.044	0.74 ±0.060	50	-2.677
12-C07	397 ±11	4.0 ±0.20	0.58 ±0.024	0.54 ±0.053	35	-1.406
12-C08	372 ±17	3.7 ±0.23	0.55 ±0.028	0.59 ±0.008	35	-1.472
12-C09	539 ±35	5.8 ±0.31	0.69 ±0.068	0.71 ±0.026	55	-0.76
12-C11	421 ±12	3.8 ±0.17	0.58 ±0.044	0.54 ±0.028	40	-1.671
12-C12	451 ±13	4.0 ±0.18	0.61 ±0.026	0.63 ±0.067	50	-1.619
12-D01	375 ±30	4.6 ±0.23	0.49 ±0.024	0.42 ±0.025	40	-0.731
12-E03	376 ±19	3.9 ±0.24	0.46 ±0.053	0.50 ±0.023	45	-0.853
12-E06	445 ±15	3.4 ±0.28	0.49 ±0.054	0.60 ±0.007	45	-3.241
12-E08	520 ±10	4.6 ±0.28	0.78 ±0.071	0.74 ±0.071	60	-1.31
12-F09	424 ±15	4.3 ±0.24	0.55 ±0.009	0.55 ±0.011	35	-1.753
12-G02	376 ±30	2.4 ±0.09	0.52 ±0.042	0.46 ±0.034	35	-1.95
12-G06	348 ±17	2.5 ±0.19	0.60 ±0.084	0.47 ±0.064	35	-2.376
12-G07	364 ±16	3.9 ±0.19	0.65 ±0.053	0.57 ±0.014	55	0.58
12-G12	366 ±18	4.1 ±0.21	0.46 ±0.083	0.43 ±0.080	35	-0.375
12-H03	306 ±18	2.0 ±0.09	0.43 ±0.053	0.35 ±0.047	20	-1.869
12-H04	402 ±14	3.8 ±0.13	0.61 ±0.022	0.64 ±0.100	45	-2.072
12-H11	333 ±10	3.4 ±0.27	0.47 ±0.108	0.48 ±0.133	45	-0.966
12-I05	288 ±19	2.6 ±0.14	0.50 ±0.040	0.47 ±0.124	30	-1.74
12-I07	747 ±21	5.6 ±0.12	1.66 ±0.109	1.58 ±0.188	65	-3.41
12-I10	413 ±17	4.9 ±0.13	0.65 ±0.048	0.63 ±0.050	55	0.767
12-I12	440 ±37	4.4 ±0.48	0.58 ±0.117	0.67 ±0.107	45	-1.16
12-L02	382 ±14	4.4 ±0.12	0.50 ±0.057	0.44 ±0.044	45	-1.18
12-M02	442 ±12	3.6 ±0.08	1.02 ±0.035	1.13 ±0.043	60	-1.833
12-M04	395 ±7	2.7 ±0.12	0.64 ±0.065	0.67 ±0.038	45	-3.026
13-F08	252 ±15	3.1 ±0.28	0.30 ±0.099	0.23 ±0.105	30	0.219

13-F09	384 ±13	4.8 ±0.27	0.53 ±0.146	0.53 ±0.103	50	-0.753
13-F10	421 ±19	6.0 ±0.13	0.58 ±0.128	0.63 ±0.030	65	0.912
13-F11	536 ±30	5.6 ±0.21	0.87 ±0.197	0.94 ±0.112	70	-0.721
13-F12	397 ±20	4.2 ±0.30	0.53 ±0.108	0.52 ±0.128	45	-0.98

<b>MEDIO COLLINARE E COSTIERA</b>	<b>388 ±75</b>	<b>4.6 ±0.98</b>	<b>0.56 ±0.171</b>	<b>0.56 ±0.173</b>	<b>51.6</b>	<b>0.760<sup>A</sup></b>
12-A01	477 ±28	5.8 ±0.27	0.98 ±0.118	0.99 ±0.078	65	0.791
12-A05	293 ±21	4.2 ±0.30	0.37 ±0.088	0.47 ±0.028	40	-0.063
12-A06	414 ±27	4.7 ±0.44	0.40 ±0.075	0.64 ±0.006	65	1.417
12-A07	423 ±22	4.8 ±0.37	0.72 ±0.099	0.82 ±0.025	60	0.767
12-A08	385 ±26	4.9 ±0.25	0.55 ±0.095	0.70 ±0.013	55	1.321
12-A10	293 ±25	4.8 ±0.16	0.46 ±0.016	0.47 ±0.117	45	0.909
12-A11	483 ±16	4.9 ±0.20	0.77 ±0.122	0.85 ±0.094	60	0.079
12-A12	357 ±34	5.5 ±0.20	0.45 ±0.080	0.61 ±0.085	55	1.497
12-B01	369 ±28	5.5 ±0.24	0.48 ±0.041	0.42 ±0.018	55	1.604
12-B07	459 ±13	5.3 ±0.19	0.63 ±0.045	0.56 ±0.037	65	0.332
12-B09	374 ±13	5.2 ±0.18	0.39 ±0.083	0.42 ±0.002	50	1.988
12-B10	392 ±13	5.1 ±0.14	0.50 ±0.051	0.48 ±0.025	55	0.333
12-B11	426 ±22	4.9 ±0.24	0.71 ±0.036	0.66 ±0.098	65	0.797
12-C01	404 ±19	4.9 ±0.24	0.61 ±0.044	0.61 ±0.022	55	1.819
12-C03	450 ±15	4.3 ±0.24	0.60 ±0.027	0.59 ±0.067	55	1.599
12-C04	456 ±12	4.4 ±0.20	0.60 ±0.035	0.66 ±0.027	60	1.669
12-C05	391 ±6	4.9 ±0.18	0.56 ±0.044	0.55 ±0.066	55	1.024
12-C10	487 ±13	5.9 ±0.17	0.80 ±0.018	0.76 ±0.059	40	0.696
12-D02	514 ±41	5.9 ±0.21	0.96 ±0.055	0.92 ±0.014	60	0.249
12-D04	403 ±38	5.7 ±0.25	0.61 ±0.031	0.59 ±0.052	55	0.264
12-D06	347 ±34	4.2 ±0.19	0.49 ±0.053	0.44 ±0.034	45	-0.918
12-D07	368 ±28	5.1 ±0.21	0.50 ±0.019	0.43 ±0.062	55	1.889
12-D08	369 ±44	4.2 ±0.17	0.50 ±0.045	0.50 ±0.002	55	0.165
12-D09	431 ±38	5.4 ±0.25	0.63 ±0.034	0.66 ±0.034	55	0.669
12-D10	419 ±45	5.7 ±0.22	0.72 ±0.025	0.66 ±0.068	60	1.11
12-D11	392 ±38	6.0 ±0.19	0.53 ±0.028	0.52 ±0.057	55	1.421
12-D12	356 ±40	4.7 ±0.19	0.56 ±0.022	0.51 ±0.129	55	1.672
12-E01	337 ±13	4.3 ±0.25	0.43 ±0.054	0.42 ±0.015	45	1.5
12-E02	315 ±10	3.7 ±0.24	0.42 ±0.067	0.38 ±0.062	35	-0.166

12-E04	298 ±13	3.3 ±0.26	0.37 ±0.053	0.34 ±0.107	45	0.268
12-E05	478 ±16	6.1 ±0.19	0.67 ±0.066	0.65 ±0.067	55	0.466
12-E09	266 ±11	2.5 ±0.26	0.26 ±0.035	0.19 ±0.123	15	-0.074
12-E10	525 ±21	5.3 ±0.30	0.83 ±0.120	0.88 ±0.033	65	-0.234
12-E12	439 ±15	4.6 ±0.30	0.56 ±0.072	0.61 ±0.044	60	1.408
12-F06	298 ±12	4.6 ±0.27	0.33 ±0.074	0.39 ±0.096	45	0.577
12-F07	347 ±11	5.4 ±0.21	0.49 ±0.064	0.55 ±0.008	55	1.071
12-F08	342 ±5	5.3 ±0.22	0.43 ±0.062	0.43 ±0.015	50	1.467
12-F10	316 ±13	4.4 ±0.28	0.41 ±0.027	0.37 ±0.021	45	0.861
12-F11	359 ±14	4.2 ±0.16	0.48 ±0.029	0.43 ±0.042	45	0.073
12-G01	301 ±15	3.3 ±0.16	0.51 ±0.031	0.40 ±0.022	45	0.913
12-G04	311 ±9	3.8 ±0.20	0.49 ±0.036	0.41 ±0.025	45	1.465
12-G05	469 ±29	3.5 ±0.20	0.73 ±0.044	0.61 ±0.011	50	-0.698
12-G09	384 ±19	4.5 ±0.10	0.59 ±0.054	0.59 ±0.034	50	1.142
12-H05	421 ±12	3.7 ±0.17	0.64 ±0.129	0.59 ±0.168	55	-0.182
12-H07	253 ±18	2.2 ±0.10	0.45 ±0.134	0.37 ±0.093	25	-0.72
12-H08	293 ±13	2.9 ±0.14	0.40 ±0.083	0.41 ±0.061	30	0.028
12-H10	450 ±17	4.9 ±0.05	0.69 ±0.055	0.82 ±0.070	65	1.538
12-H12	302 ±9	2.9 ±0.25	0.36 ±0.097	0.45 ±0.102	35	-0.308
12-I04	300 ±37	2.1 ±0.13	0.27 ±0.066	0.29 ±0.104	15	-1.082
12-I09	425 ±24	4.9 ±0.24	0.69 ±0.016	0.68 ±0.087	60	1.271
12-L01	486 ±16	5.2 ±0.17	0.72 ±0.050	0.69 ±0.061	65	0.766
12-L04	420 ±16	5.6 ±0.11	0.61 ±0.038	0.56 ±0.046	55	0.507
12-L05	402 ±15	5.2 ±0.30	0.57 ±0.042	0.55 ±0.055	55	1.351
12-L07	368 ±11	5.0 ±0.33	0.51 ±0.032	0.47 ±0.014	55	2.565
12-L08	309 ±12	3.7 ±0.16	0.39 ±0.055	0.38 ±0.021	45	1.905
12-L09	557 ±25	5.3 ±0.28	0.95 ±0.092	0.92 ±0.038	65	0.219
12-L10	426 ±6	5.0 ±0.40	0.61 ±0.018	0.56 ±0.058	50	0.651
12-L11	501 ±20	5.3 ±0.12	0.67 ±0.022	0.68 ±0.070	60	0.65
12-M01	249 ±8	2.7 ±0.10	0.38 ±0.045	0.38 ±0.062	45	0.879
12-M03	409 ±14	4.1 ±0.10	0.75 ±0.037	0.73 ±0.077	65	0.404

Tabella 6: Risultati dei campioni di mieli millefiori raggruppati e mediati in base alla fascia geografica di origine. I campioni sono stati numerati con una sigla che identifica l'anno di produzione e un codice. TPC: Contenuto totale in polifenoli; ABTS: test ABTS; DPPH-VIS: test DPPH monitorato per via spettrofotometrica; DPPH-EPR: test DPPH monitorato mediante EPR; Lovibond: colore; GAE: Acido Gallico Equivalenti; TXE: Trolox Equivalenti. I valori sono espressi come media ± SD (n=3).

### **8.3.5 *Analisi multivariata***

I risultati ottenuti nelle diverse analisi (TPC, ABTS, DPPH, EPR, Lovibond e le 7 variabili spettrofotometriche selezionate per il progetto mieli uniflorali) sono stati quindi sottoposti all'analisi delle componenti principali (PCA). L'analisi effettuata con un modello che utilizza l'intero insieme di dati (96 campioni) e 12 variabili (Tabella 7) ha portato all'ottenimento di due componenti principali significative, con un autovalore  $> 1$ , che spiegano l'86.04% della variabilità totale del sistema. La Tabella 7 mostra la varianza spiegata e gli autovalori per le prime tre componenti principali. La prima PC1 (70.82%) comprende la maggior parte delle informazioni derivanti da tutti i risultati sperimentali, mentre nella seconda componente principale vengono evidenziate le differenze tra la variabile ABTS (che viene considerata positiva) e le altre variabili relative all'AA (che vengono considerate in negativo) e tra le variabili spettrofotometriche  $\lambda < 400$  nm (giallo) e  $\lambda > 400$  nm (bruno). Tale varianza viene così spiegata dalla PC2 (15.21%) e permette di differenziare i mieli per fasce (Figura 44). La terza componente (PC3; 5.79%) evidenzia infine il contrasto tra l'attività antiossidante e il colore.

	PC1	PC2	PC3
Autovalore	8.50	1.83	0.70
Varianza (%)	70.82	15.21	5.79
% cumulata	70.82	86.04	91.83
TPC	<b>0.314</b>	-0.201	0.132
ABTS	<b>0.247</b>	0.295	-0.085
DPPH	<b>0.280</b>	-0.199	0.574
EPR	<b>0.286</b>	-0.162	0.566
Lovibond	<b>0.290</b>	0.250	0.065
$\lambda_{350}$	<b>0.240</b>	-0.408	<b>-0.377</b>
$\lambda_{360}$	<b>0.304</b>	-0.295	<b>-0.270</b>
$\lambda_{365}$	<b>0.311</b>	-0.245	<b>-0.230</b>
$\lambda_{385}$	<b>0.325</b>	-0.100	<b>-0.204</b>
$\lambda_{445}$	<b>0.296</b>	0.350	<b>-0.055</b>
$\lambda_{490}$	<b>0.267</b>	0.434	<b>-0.072</b>
$\lambda_{645}$	<b>0.292</b>	0.331	<b>-0.056</b>

Tabella 7: Analisi delle componenti principali. Autovalori, varianza spiegata e cumulata, e autovettori per le prime tre componenti principali (PC).

Dall'analisi dei diagrammi dei pesi fattoriali (in alto) e di dispersione (in basso) delle prime due componenti, visualizzati in Figura 44 possiamo osservare che la maggior parte dei campioni di mieli millefiori si differenziano in funzione della fascia (le ellissi racchiudono i campioni che appartengono alla fascia con una probabilità dell'80%); inoltre l'analisi statistica (ANOVA) delle coordinate della seconda componente principale (Tabella 7) dei campioni dei mieli suddivisi per fascia mostra delle medie significativamente diverse ( $p < 0.0001$ ).

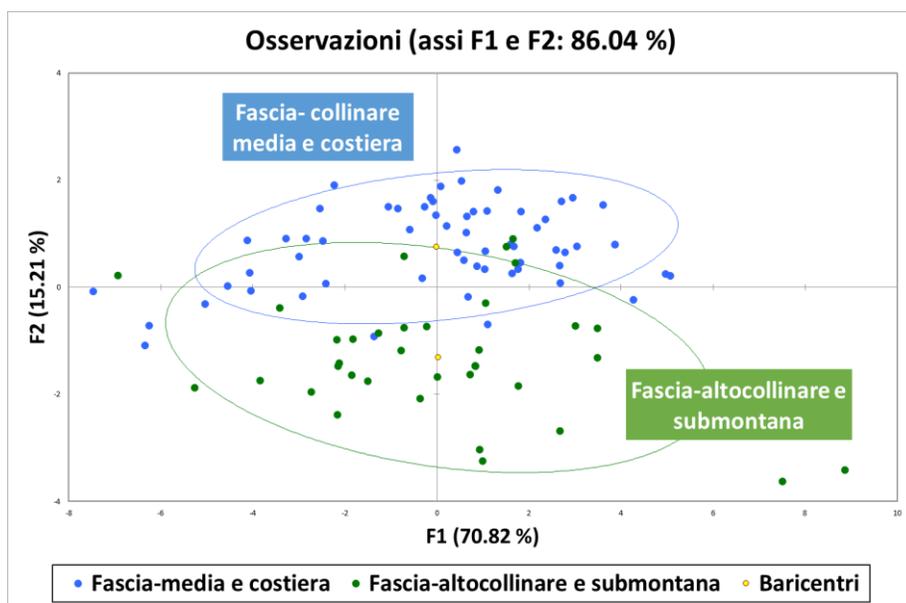
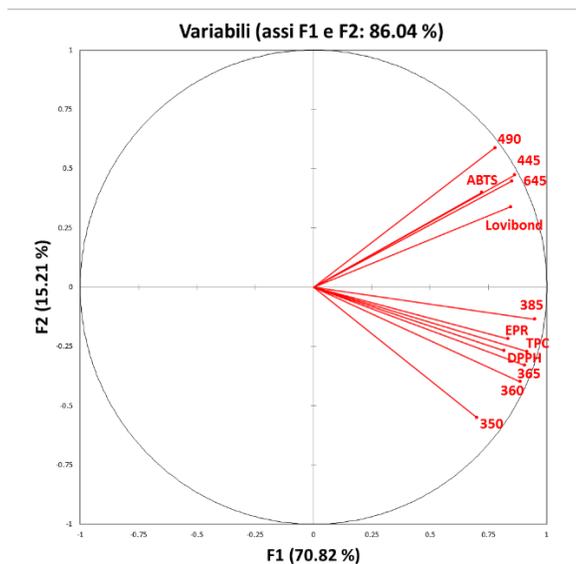


Figura 44: Analisi delle componenti principali. Diagramma dei pesi fattoriali (in alto) e di dispersione (in basso) delle prime due componenti principali dei mieli suddivisi per fascia. FOLIN: contenuto totale di fenoli TPC; ABTS: test ABTS; DPPH: test DPPH spettrofotometrico; EPR test DPPH monitorato mediante spettroscopia EPR; Lovibond: colore;  $\lambda_{350}$ ;  $\lambda_{360}$ ;  $\lambda_{365}$ ;  $\lambda_{385}$ ;  $\lambda_{445}$ ;  $\lambda_{490}$ ;  $\lambda_{645}$ : assorbanza alla  $\lambda$  descritta.

I risultati ottenuti dall'analisi dei mieli uniflorali e multiflorali sono stati quindi riuniti ed elaborati contestualmente con lo scopo di trovare una classificazione dei mieli multiflorali in base alle proprietà che i diversi nettari attribuiscono al miele. A questo scopo i risultati ottenuti nelle diverse analisi (TPC, ABTS, DPPH-Vis, DPPH-EPR, Lovibond e le 7 variabili spettrofotometriche selezionate mediante DA) dei mieli uniflorali (campioni di stima), sono stati sottoposti ad analisi discriminante (DA) con lo scopo di caratterizzare l'origine floreale dei mieli millefiori (Figura 45) (campioni di previsione).

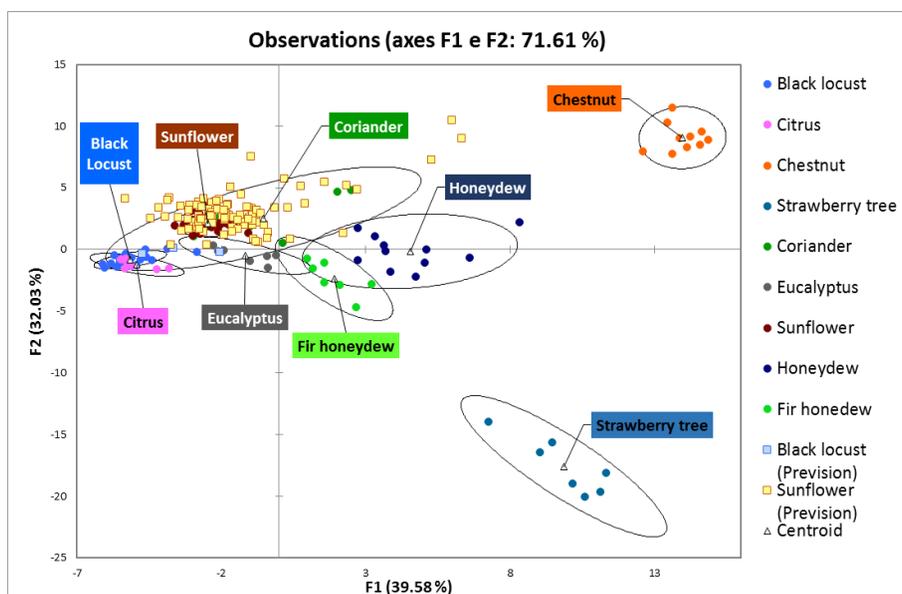


Figura 45: Analisi discriminante quadratica dei mieli uniflorali e previsione dei mieli millefiori. Diagramma di dispersione delle prime due componenti. FOLIN: contenuto totale di fenoli TPC; ABTS: test ABTS; DPPH: test DPPH monitoraggio spettrofotometrico; EPR test DPPH monitorato mediante spettroscopia EPR; Lovibond: colore;  $\lambda_{350}$ ;  $\lambda_{360}$ ;  $\lambda_{365}$ ;  $\lambda_{385}$ ;  $\lambda_{445}$ ;  $\lambda_{490}$ ;  $\lambda_{645}$ : assorbanza alla  $\lambda$  descritta.

Per tale elaborazione si è scelto di utilizzare un modello quadratico in quanto è risultato da un'analisi preliminare mediante test di Box che le matrici di covarianza differiscono per almeno due dei gruppi di mieli uniflorali. L'analisi ha portato ad una classificazione della maggior parte dei campioni di miele millefiori come mieli di girasole mentre solamente tre sono stati classificati come mieli di acacia. Tale classificazione può essere considerata soddisfacente e sufficiente realistica. Per quanto riguarda i mieli classificati come acacia, è possibile infatti che essi contengano una buona percentuale di tale polline: uno di questi era stato effettivamente classificato come miele di acacia dal produttore ed era stato poi riclassificato come millefiori in quanto non perfettamente rispondente all'origine botanica secondo le verifiche effettuate sui campioni partecipanti al premio. Per quanto riguarda i mieli classificati come girasole è possibile affermare che effettivamente questa è una delle coltivazioni più diffuse nelle Marche seguita da quella del coriandolo mentre l'eucalipto è una specie poco presente in regione. Considerando che l'analisi discriminante quadratica risente di gruppi di dati poco numerosi che non garantiscono informazioni sufficienti per ottenere una matrice di covarianza stabile, come nel nostro caso il gruppo del coriandolo, è plausibile ipotizzare che tra i mieli classificati come girasole ci possano essere campioni non correttamente classificati, anche a causa delle caratteristiche piuttosto simili di questi due tipi di mieli uniflorali.

### **8.3.6 Conclusioni**

I risultati dell'analisi PCA sui mieli multiflorali marchigiani mostrano come l'attività antiossidante e il colore del miele può essere influenzata dalla sua origine geografica. L'analisi dell'attività antiossidante mediante test diversi che possano evidenziare una variegata composizione chimica e quindi la reattività nei confronti di diverse sonde ha permesso infatti di distinguere i mieli per fascia di provenienza; anche un'analisi colorimetrica accurata che mette in risalto le varie tonalità dei mieli ha inoltre contribuito a tale diversificazione.

Inoltre dai risultati dell'analisi discriminante quadratica si evidenzia come tra i nettari presenti nei mieli millefiori marchigiani prevalga come specie botanica il girasole. L'esecuzione di un'analisi mellissopalnologica dei campioni analizzati porterebbe alla conferma di tale ipotesi.

## 9 IL POLLINE

### 9.1 STRUTTURA

Il polline d'api è un prodotto apicolo derivante dalle microspore che l'*Apis mellifera* L. raccoglie dagli stami di fiori di gimnosperme e angiosperme e utilizza per l'alimentazione delle larve nella fase iniziale di sviluppo e per la produzione di pappa reale (Yang K. et al., 2013; de Arruda V. A. S. et al., 2013).

Quando le api visitano i fiori, toccano gli stami e il loro corpo si ricopre di granuli di polline che vengono compressi con le zampette nelle «cestelle» (“pollen baskets”, una concavità della parte esterna della tibia delle zampe posteriori) formando delle pallottole (Figura 46 e Figura 47).

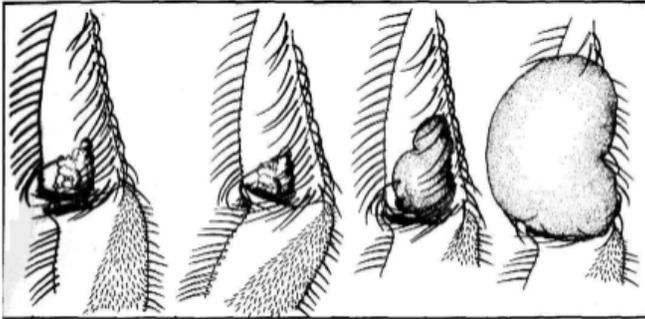


Fig. 3 — Formazione della pallottola di polline nella cestella. (dis. A. SENSIDONI).

Figura 46: Formazione della pallottola di polline nella cestella delle zampe posteriori.



Figura 47: Ape in volo con due pallottole di polline ancorate alle zampe posteriori.

Le api, mentre lo raccolgono, umettano il polline con secrezioni salivari e nettare (Negri G. et al., 2011; Campos R. G. M. et al., 2010) per renderlo più adesivo al pelo della zampa su cui viene ancorato. Queste secrezioni contengono diversi enzimi come ad esempio l'amilasi e la catalasi. Una pallottola contiene fino al 10% di nettare, che è necessario per la sua formazione.

Nell'arnia l'ape bottinatrice stacca la pallottola dalle zampe e le api giovani la immagazzinano nelle celle del foglio di cera dopo averle umettate con il miele.

Una pallottola pesa circa 7.5 mg e in un viaggio l'ape porta nell'arnia circa 15 mg di polline.

Il granulo di polline (Figura 48) è costituito da una parete chiamata sporoderma che avvolge il citoplasma. Lo sporoderma in sezione è costituito da due strati principali (doppia membrana): l'esina e l'intina.

La prima più esterna, perforata da uno o più pori di germinazione a seconda della specie vegetale, è formata da un biopolimero molto resistente, detto sporopollenina (Negri G. et al., 2011); l'intina più interna invece è costituita da cellulosa e pectina ed è generalmente di colore bianco brillante.

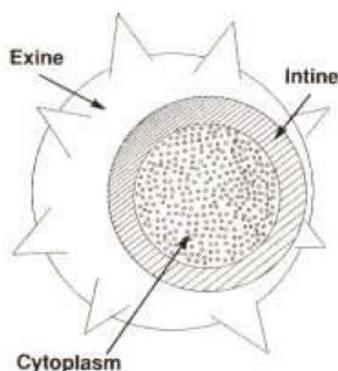


Figura 48: La struttura di un granulo di polline.

La forma (rotonda, triangolare, ovale, allungata, ecc.), la struttura (striata, reticolata, spinosa) e lo spessore di entrambi gli strati, ma in particolare quello dell'esina variano in funzione della specie botanica (Figura 49) conferendo ai granuli pollinici di ogni specie una fisionomia pressoché unica. La struttura del polline è tale da consentirgli di resistere al degrado tanto che spesso i granuli sopravvivono per milioni di anni (Istituto nazionale apicoltura, 2006; Piana L., 2007; Roulston T. H., 2000).

All'interno del granulo di polline troviamo il citoplasma, ricco di sostanze nutritive e materiale genetico. Esso contiene due nuclei: uno formerà il frutto, l'altro il seme ([www.mieliditalia.it](http://www.mieliditalia.it)). All'esterno è presente il pollenkitt, un rivestimento semi-solido composto principalmente di lipidi neutri, idrocarburi, terpenoidi, flavonoidi (flavonoli) glicosilati e pigmenti.



Figura 49: Le diverse forme dei granuli pollinici al microscopio elettronico.

Per raccogliere il polline, gli apicoltori installano una trappola davanti all'ingresso dell'alveare, in modo che le api bottinatrici, di ritorno all'alveare, siano costrette a passare attraverso una griglia, perdendo così le loro pallottole di polline che cadranno in un cassetto che verrà in seguito prelevato dall'apicoltore (Almeida-Muradian L. B. et al., 2005).

Per ottenere un polline di ottima qualità il processo di raccolta, purificazione e stoccaggio è molto importante.

Una volta eliminate le impurità, il polline viene immediatamente riposto in un congelatore per due giorni in modo da uccidere gli insetti parassiti, prevenirne il deterioramento e favorirne la conservazione in quanto l'elevata umidità (il polline d'api appena raccolto contiene circa il 20-30% di acqua) lo rende un terreno di coltura ideale per microrganismi come batteri e lieviti.

Dopo lo scongelamento, il polline deve subire un trattamento di disidratazione, a una temperatura massima di 40°C, entro poche ore e può quindi essere conservato in un luogo fresco e asciutto, in opportuno recipiente. Il confezionamento può essere effettuato anche sotto azoto e un tale trattamento permette una miglior conservazione delle proprietà biologiche e nutritive, ma in Italia questo processo non viene ancora molto utilizzato.

La produzione mondiale di polline si aggira intorno alle 1500 tonnellate all'anno (Estevino L. M. et al., 2012). In letteratura diversi autori (Yang K. et al., 2013; Estevino L. M. et al., 2012) riportano che la Cina e la Spagna sono i più grandi produttori al mondo di polline seguiti dall'Australia e dall'Argentina (Estevino L. M. et al., 2012).

## 9.2 COMPOSIZIONE

Il polline d'api è considerato, fin dai tempi memorabili, una buona fonte di sostanze nutritive e di energia (Pascoal A. et al., 2014; Negri G. et al., 2011). Gli antichi egizi descrivevano il polline come “la polvere che dà la vita” (Bogdanov S., 2011).

La composizione chimica del polline d'api dipende fortemente dalla fonte vegetale, ma è influenzata anche da altri fattori, come le condizioni ambientali (posizione, stagione, clima, composizione del suolo), l'età e lo stato nutritivo della pianta e il trattamento che subisce da parte dell'apicoltore (Pascoal A. et al., 2014). In letteratura diversi studi, evidenziano differenze apprezzabili nella composizione di pollini provenienti da diverse regioni o nazioni (Yang K. et al., 2013).

Genericamente possiamo dire che i componenti principali del polline d'api sono i carboidrati (13-55%), le proteine (10-40%), i lipidi (1-10%) e le fibre (0.3-20%) (Pascoal A. et al., 2014).

Il polline è l'unico alimento proteico che entra nell'alveare e, come tale, riveste un ruolo fondamentale per la nutrizione della colonia. Esso viene impiegato nell'alimentazione delle larve e delle giovani api ed oltre a contribuire al completamento dello sviluppo corporeo in generale, è determinante per lo sviluppo e la funzionalità di particolari organi, quali il corpo adiposo, gli ovari e soprattutto le ghiandole ipofaringee, che svolgono l'importante funzione di secernere la pappa reale.

Il polline viene definito da Pascoal A. et al. 2014 come “l’unico alimento del tutto “completo”, in quanto contiene tutti gli aminoacidi essenziali necessari all'organismo umano.

Nelle pallottole di polline possono essere presenti infatti fino a 22 aminoacidi diversi e composti minori come vitamine (provitamina A, vitamine del gruppo B, vitamine C, E e H), minerali (Zn, Cu, Fe e un alto rapporto di K/Na), acidi nucleici, enzimi, composti fenolici e pigmenti (clorofille e carotenoidi) (Bobis O. et al., 2010; Yang K. et al., 2013; Campos R. G. M. et al., 2010).

Tra i minerali, alcuni studi riportano nel polline secco un contenuto importante di Zn (da 16 a 20 mg/kg) e Fe (da 20 a 30 mg/kg).

Per quanto riguarda gli antiossidanti quelli più presenti nel polline sono i polifenoli quali i derivati degli acidi fenolici (acido cinnamico e cumarico) e i flavonoidi glicosilati (es. rutina e quercitrina) e gli agliconi (quercetina, isoquercetina, kampeferolo, luteolina, selangina e miricetina) (Figura 50) che si formano per idrolisi ad opera della alfa e beta-glucosidasi, enzima secreto dalle ghiandole ipofaringee delle api (Bonvehi J. S. et al., 2001; Negri G. et al., 2011).

I flavonoidi sono in genere glicosidati con D-glucosio, D-galattosio e L-ramnosio, ma talvolta possono legare anche trisaccaridi o disaccaridi, come per esempio la rutina (Bonvehi J. S. et al., 2001).

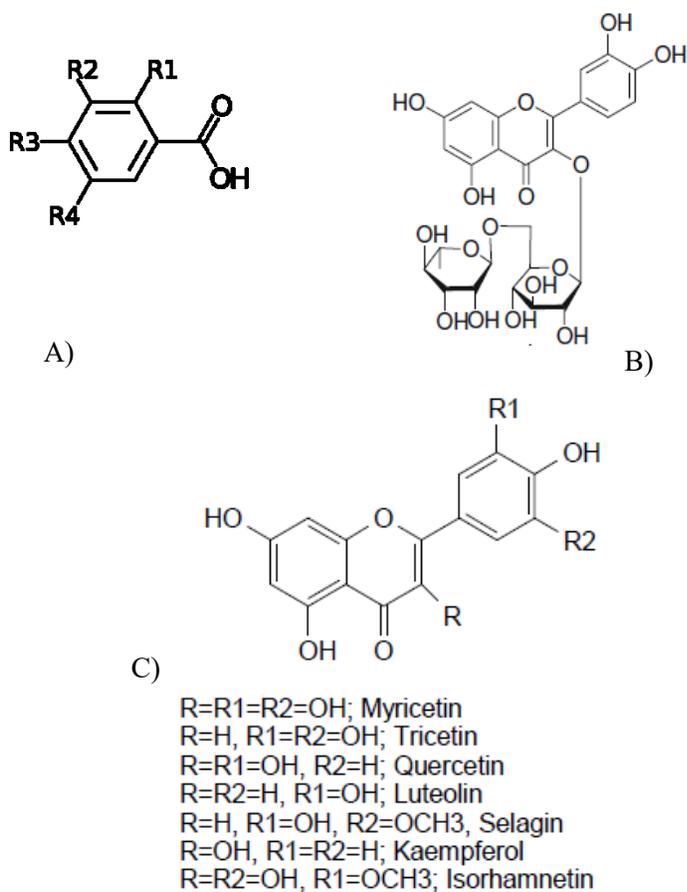


Figura 50: Struttura chimica di un acido fenolico (A), di un flavonoide glicosilato, la rutina (B) e di alcuni flavonoidi agliconi liberi.

La ricerca bibliografica sul polline ha portato alla pubblicazione dell'articolo "Il polline: fattori che ne influenzano la composizione" sulla rivista l'Apis (Castiglioni S. et al., 2015).

### 9.3 EFFETTI TERAPEUTICI

(Morais M. et al., 2011; Campos R. G. M. et al., 2010)

Recenti studi documentano che il polline è un alimento che possiede proprietà terapeutiche: è stato dimostrato infatti che il polline ha attività antimicrobica, per esempio nei confronti di *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella sp.*, antinfiammatoria (prostata), chemioprotettiva e/o preventiva, ed effetti positivi nei confronti dell'anemia, delle allergie, dell'osteoporosi e dei problemi digestivi. Il polline d'api è stato inoltre utilizzato con successo per la desensibilizzazione dei bambini che soffrono di allergie (Morais M. et al., 2011). Studi su ratti soggetti ad anemia emolitica hanno dimostrato inoltre che l'assunzione orale di 10 g polline/kg peso corporeo al giorno induce un aumento significativo dei globuli rossi. L'ingestione giornaliera di polline viene inoltre raccomandata in quanto il polline può regolare le funzioni intestinali e ha effetti benefici sul sistema cardiovascolare, sulla pelle e sulla vista (Negri G. et al., 2011). Alcuni studi sono stati incentrati in particolare sugli effetti del polline nei confronti della prostatite (l'infiammazione della ghiandola prostatica), e dell'iperplasia benigna prostatica. La somministrazione di polline ha portato alla riduzione della dimensione della prostata sia in pazienti anziani che in specie canine affetti da iperplasia benigna della prostata. In questo caso la bioattività è stata attribuita al 2,4-diidrossi-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one (DIBOA), un acido ciclico

idrossammico. Tra le altre sostanze bioattive troviamo la quercetina, il kampeferolo, la rutina ed i fitosteroli (in particolare nel polline sono presenti il fucosterolo, il  $\beta$ -sterolo, lo stigmasterolo e il campesterolo). In effetti, sembra che molti degli effetti terapeutici e protettivi siano associati alla presenza di antiossidanti, in particolare della classe dei polifenoli (Negri G. et al., 2011).

## 9.4 CARATTERIZZAZIONE DI POLLINI UNIFLORALI E STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E DEL COLORE

Molti studi sono stati condotti in diversi paesi quali Spagna, Turchia, Brasile, ecc. con lo scopo di determinare il potere e il profilo antiossidante di diversi pollini raccolti in diverse aree geografiche e provenienti da diverse fonti botaniche.

Alcuni ricercatori (Campos G. M. et al., 2003) hanno condotto uno studio su pollini di diverse origini botaniche (raccolti in Portogallo e in Nuova Zelanda) dimostrando che l'attività antiossidante diminuisce del 50% dopo un anno; i pollini che mostrano inizialmente una maggior attività antiossidante sono inoltre quelli che si degradano in misura maggiore.

Alcuni anni dopo altri autori hanno dimostrato che l'attività antiossidante del polline d'api è specie-specifica e indipendente dalla sua origine geografica (Campos R. G. M. et al., 2010).

Un'altra ricerca condotta in Messico (Alvarez-Abarca N. et al., 2004) su diversi campioni di pollini suddivisi in base al colore in pollini monoflorali (*Amarantus hybridus* < *Zea mais*, *Bidens onorata* e *Ranunculus p.* < *Solanum r.* < *Tagetes*) ha mostrato differenze significative in termini di attività antiossidante nelle diverse specie, valutando che il profilo antiossidante, piuttosto che la concentrazione

in antiossidanti, potrebbe costituire il fattore determinante nella differenziazione dei pollini.

Queste informazioni ci hanno motivato ad approfondire lo studio dell'attività antiossidante di pollini di api provenienti da singole specie botaniche attraverso l'analisi di pollini proveniente dalla regione Marche, suddivisi per colore in pollini monoflorali o a prevalenza di una specie botanica.

#### ***9.4.1 Campioni***

La prima parte del lavoro di ricerca ha riguardato il reperimento dei campioni da analizzare. A questo scopo sono stati contattati circa 60 apicoltori marchigiani che svolgono la loro attività nella Regione Marche. Quindici di questi pari al 25% (Figura 51) dei soggetti contattati hanno aderito al progetto. Questo consiste nella raccolta, nella stagione apistica 2014 e 2015, di pollini a prevalenza uniflorale eseguendo un campionamento mirato, sulla base delle diverse epoche di fioritura, nella loro separazione in base al colore e alla forma delle pallottole e, dopo caratterizzazione, nell'analisi delle loro proprietà antiossidanti. Per curare al meglio la fase di campionamento sono state fornite agli apicoltori le istruzioni di campionamento e una scheda tecnica personalizzata al fine di identificare in modo univoco il campione. I campioni freschi subito dopo la raccolta sono stati conservati in congelatore fino al momento del trattamento.



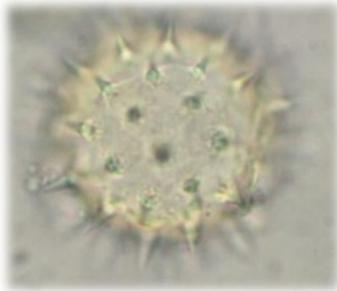
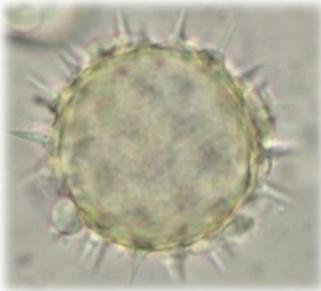
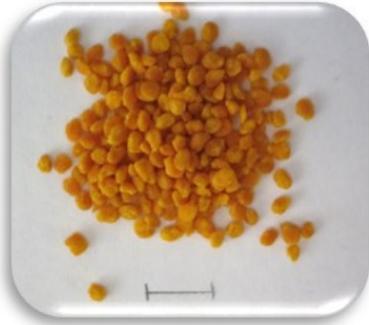
Figura 51: Identificazione punti di campionamento.

I campioni sono stati quindi disidratati in stufa a 35°C per 3 giorni al fine di ridurne l'umidità sotto il 10% e conservati al buio a temperatura ambiente.

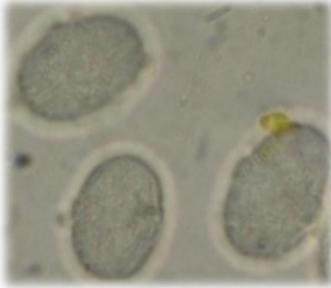
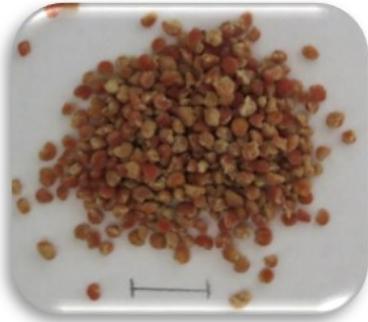
Tali campioni sono stati successivamente suddivisi manualmente, con un notevole dispendio di tempo, in base alla colorazione e alla forma delle pallottole ottenendo 32 campioni a prevalenza uniflorale.

Di seguito per ogni campione di polline d'ape sono riportati in alto le foto delle pallottole (il segmento di riferimento corrisponde a un centimetro), e in basso le immagini dei granuli pollinici effettuate al microscopio con diverse messe a fuoco.

Campione HEU(01-02) - Girasole (*Helianthus annuus* L.)



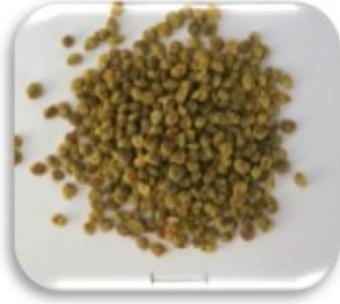
Campione HSU(03-04) – Sulla (*Hedysarum coronarium* L.)



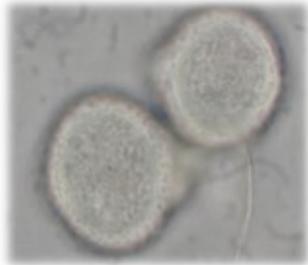
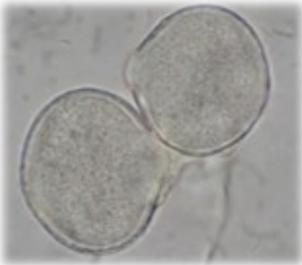
Campioni TRU(05-11) – Trifoglio (*Trifolium alexandrinum* L.)



TRU07



TRU11



Campione GLU12 – Spino di Giuda (*Gleditsia triacanthos* L.)



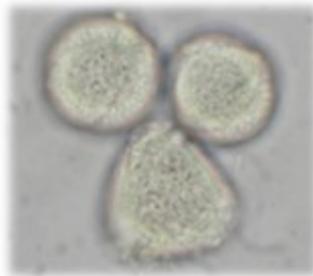
Campioni PAU(13-14) – Papavero (*Papaver rhoea* L.)



PAU13

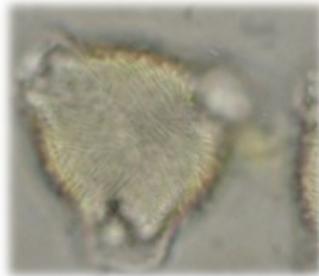


PAU14

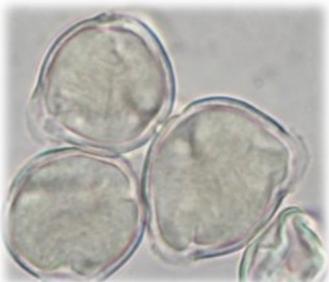
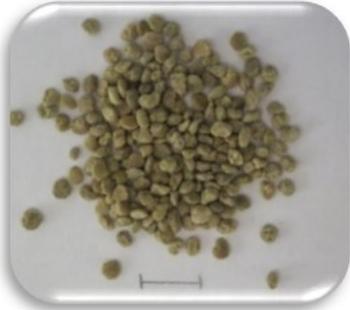


Campioni PRU(15-16) *Prunus* f.

Questo tipo pollinico detto “*Prunus* forma” raggruppa tutte le drupacee coltivate e non (pesco, mandorlo, susino, prugnolo ecc.).



Campione RUU (17-18) – Rovo (*Rubus ulmifolius* Schott.)



Campione CRU19 – Biancospino comune (*Crataegus monogyna* Jacq.)



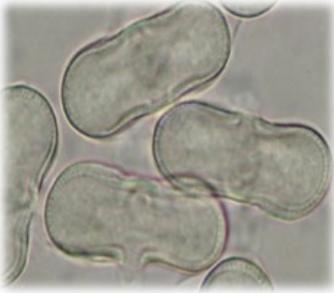
Campione COU(20-24) – Coriandolo (*Coriandrum sativum* L.)



COU20



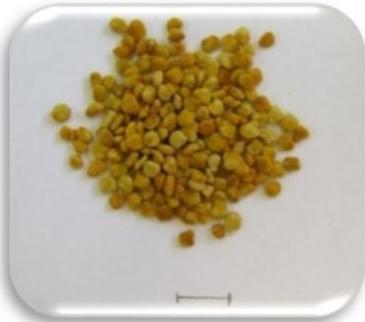
COU21



Campione HDU25 – Edera (*Hedera helix* L.)



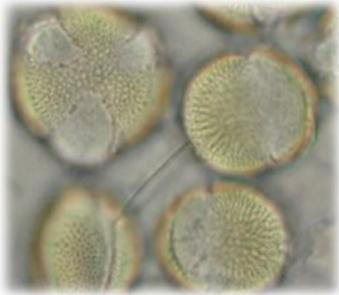
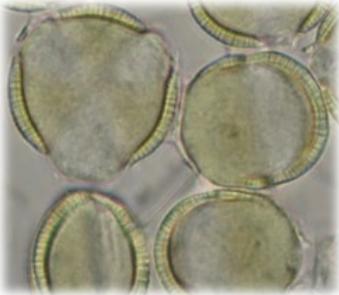
Campione CIU26 – Cisto (*Cistus incanus* L. o *C. creticus* L.)



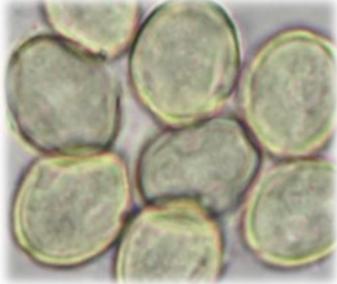
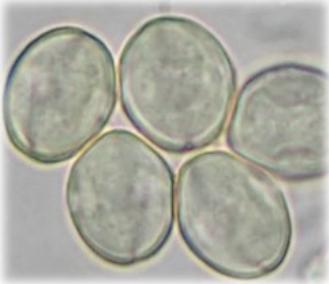
Campione CSU27 – Sanguinella (*Cornus sanguinea* L.)



Campione CBU28 - Cruciferae tipo Brassica



Campione CAU29 – Castagno (*Castanea sativa* Miller)



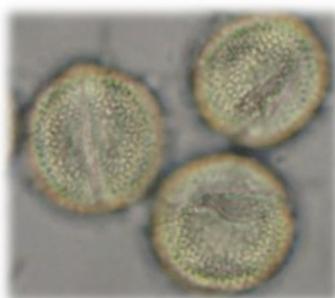
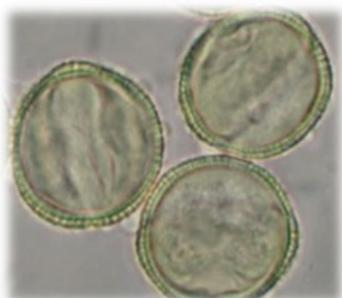
Campione LAU30 - Labiatae Forma L



Campione MAU31– Magnolia (*Magnolia*)



Campione FRU32 – Orniello (*Fraxinus ornus* L.)



### **9.4.2 *Materiali e metodi***

Sui campioni di pollini è stato determinato il contenuto fenolico totale (TPC), l'attività antiossidante utilizzando diversi test (ABTS, DPPH e ORAC) e il colore (CIELab), l'umidità, il contenuto proteico e la granulometria.

#### 9.4.2.1 *Analisi pollinica*

L'analisi pollinica dei campioni di pollini è stata effettuata seguendo il metodo interno utilizzato dal Centro Agrochimico Regionale dell'ASSAM. In una falcon contenente 2 g di campione, è stata aggiunta acqua fino a raggiungere un volume di circa 15 ml e la sospensione ottenuta è stata agitata vigorosamente con il vortex e lasciata idratare per 30 minuti o più, ove necessario, agitando con vortex di tanto in tanto. Quando tutte le pallottole di polline erano completamente idratate, è stata aggiunta acqua fino a un volume di 45 ml e si è continuato ad agitare. Sono state prelevate e posizionate, sul vetrino portaoggetti, tre piccole gocce dalla sospensione omogenea. Una volta asciugato il campione su piastra riscaldante, prima di ricoprirlo con il vetrino coprioggetti, sono state addizionate alcune gocce di gelatina glicerinata. Il vetrino è stato infine analizzato al microscopio. I risultati sono stati espressi come percentuale di tipo pollinico dominante.

Per quanto riguarda l'identificazione botanica dei campioni in alcuni casi non è stato possibile indentificare la singola specie botanica, ma è stata determinata solo la famiglia (vedi per esempio la Magnolia), in quanto la similitudine tra i tipi pollinici delle diverse specie appartenenti alla stessa famiglia, non rende possibile, attraverso la sola osservazione del polline, risalire alla specie di appartenenza senza indicazioni dettagliate da parte degli apicoltori. In altri casi, invece il livello di similitudine tra specie obbliga a raggruppare tra di loro i pollini per "tipi pollinici", cioè raggruppamenti in base alla similitudine

del polline, che non corrisponde necessariamente alla divisione sistematica usata dai botanici. In questi casi si deve aggiungere al nome scientifico una nota che indichi che il termine è usato con un significato più ampio di quello con cui viene normalmente impiegato. A tale scopo possono essere utilizzate le seguenti terminologie:

- gruppo (gr.): quando si fa riferimento ad una specie precisa (es. *Trifolium repens* gr.) e si è certi dell'appartenenza del polline ignoto allo stesso genere botanico o ad un genere affine;
- forma (f.): quando ci si riferisce a un genere botanico (es. *Eucalyptus* f., o forma "M" per le Labiatae) e si è certi dell'appartenenza alla stessa famiglia botanica;
- tipo (t.): quando il polline sconosciuto rileva una somiglianza con un altro polline noto, ma non si è in grado di affermare che appartenga alla stessa famiglia botanica (ci si può riferire a un genere o a una famiglia, es. Moraceae t.) (Persano Oddo L., et al., 1989).

#### 9.4.2.2 Umidità

La misura dell'umidità dei campioni di pollini è stata effettuata seguendo il metodo interno utilizzato dal Centro Agrochimico Regionale dell'ASSAM. Sono stati macinati 2 o 2.5 g di campione di polline in un mortaio in modo da ottenere una polvere omogenea che è stata stesa in uno strato sottile e omogeneo. Il campione è stato inserito nella termobilancia ed è stato riscaldato progressivamente fino a

raggiungere in 3 minuti la temperatura di 90°C che è stata mantenuta per 40 minuti. La termobilancia ha calcolato automaticamente la perdita di peso. I risultati sono stati espressi come percentuale.

#### 9.4.2.3 *Contenuto proteico*

La determinazione del contenuto proteico di alcuni campioni di polline (uno per ogni specie botanica caratteristica) è stata effettuata seguendo il metodo Kjeldahl interno utilizzato dal Centro Agrochimico Regionale dell'ASSAM. A 0.7 g di polline, sono stati aggiunti 0.1 g di ossido rameico (catalizzatore) e 20 ml di acido solforico al 96%. Il campione è stato quindi ossidato a 350°C su digestore DK20 Velp scientifica il tempo utile a completare l'ossidazione (fino ad ottenere una soluzione limpida). Una volta raffreddato, è stata aggiunta acqua distillata fino a raggiungere un volume di 100 ml.

La soluzione è stata quindi alcalinizzata con NaOH al 30%, e distillata in corrente di vapore, utilizzando un Distillatore UDK 126D Velp scientifica, fino al completo passaggio dell'ammoniaca (azoto ammoniacale) che viene raccolta in una soluzione di acido solforico 0.1 N in presenza di indicatore misto (rosso metile e verde bromocresolo). L'eccesso di acido solforico (non reagito) viene retro-titolato con NaOH 0.1 N.

#### 9.4.2.4 *Granulometria*

La granulometria dei pollini è stata misurata utilizzando 5 setacci con fori delle seguenti dimensioni: 2800  $\mu\text{m}$ , 2400  $\mu\text{m}$ , 2000  $\mu\text{m}$ , 1690  $\mu\text{m}$ , 1400  $\mu\text{m}$  e 1000  $\mu\text{m}$ .

L'analisi granulometrica per setacciatura fa uso di appositi setacci disposti in serie, ognuno dei quali trattiene la frazione di solido i cui granuli hanno dimensioni maggiori dei fori del setaccio. Dopo avere impilato i setacci, un campione pesato di solido viene adagiato sul piatto superiore, che è rappresentato dal setaccio a maglia più larga. I piatti inferiori sono costituiti da setacci a maglia via via più fine, e il piatto alla base della colonna è costituito da un fondino in cui vengono raccolti tutti i granuli con diametro minore del setaccio più in basso. La colonna di setacci viene appoggiata su uno scuotitore meccanico che scuote la colonna per 2 minuti; si procede quindi alla pesatura delle frazioni di solido trattenute in ciascun piatto (o setaccio). Il peso di ciascuna frazione solida viene quindi rapportato al peso del solido totale, per ottenere la percentuale (in massa) di solido trattenuto in ciascun piatto.

#### 9.4.2.5 *Analisi del colore (CIE $L^*a^*b$ )*

Il colore dei campioni di pollini uniflorali disidratati sia interi che macinati è stato misurato utilizzando il colorimetro Chroma Meters CR-400 Konica Minolta. I risultati sono stati espressi dalle coordinate CIE  $L^*a^*b$  di tre letture indipendenti di ciascun campione ( $n = 3$ ).

#### 9.4.2.6 *Preparazione estratti di polline*

Gli estratti di pollini sono stati ottenuti aggiungendo a 0.5 g di polline macinati con mortaio e pestello, 5 ml di etanolo al 70% v/v in acqua e lasciando macerare per 5 minuti nell'agitatore rotante in movimento continuo. Dopo aver centrifugato le sospensioni per 10 minuti a 8000 giri, sono stati prelevati 4.5 ml di surnatante (volume prima estrazione) e trasferiti in una falcon vuota. Per eseguire la seconda estrazione sono stati aggiunti altri 5 ml di etanolo al 70% al residuo del campione centrifugato lasciando macerare per lo stesso tempo (5 minuti) e alle stesse condizioni. Dopo una seconda centrifugazione (10 minuti a 8000 giri) sono stati prelevati 5 ml di surnatante che sono stati addizionati al primo estratto. La soluzione è stata porzionata e riposta in congelatore alla temperatura di -18°C fino al momento dell'analisi. Di ogni campione di polline sono stati preparati almeno tre estratti (n = 3).

#### 9.4.2.7 *Contenuto Totale in Polifenoli (TPC)*

Il contenuto fenolico totale nei campioni di pollini è stato determinato utilizzando il reagente Folin-Ciocalteu (Singleton V. L. et al., 1999) il cui principio è descritto nel paragrafo 5.2.3.

Per l'analisi, 50 µl di estratto di polline diluito al 7.5% v/v (in acqua) o di una soluzione opportunamente diluita (0 – 0.64 mM in acqua) di Acido Gallico 60 mM in etanolo (utilizzato come standard) sono stati posti in ciascun pozzetto di una piastra trasparente a 96 pozzetti e ad

essi sono stati quindi addizionati 150  $\mu\text{l}$  di una soluzione del reagente Folin-Ciocalteu diluita 10 volte. La piastra è stata agitata per 10 secondi ed è stata lasciata riposare per 10 minuti al buio. Sono stati quindi aggiunti in ciascun pozzetto 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10% e la piastra dopo essere stata agitata è stata lasciata per 120 min a temperatura ambiente al buio. Trascorso tale tempo è stata letta l'assorbanza a 760 nm contro l'acqua come bianco. I risultati sono stati espressi in millimoli di Acido Gallico Equivalenti per g di polline secco (mmol GAE/g) utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuto dalla curva di calibrazione dell'acido gallico (0-107  $\mu\text{M}$ ). I risultati rappresentano la media aritmetica di almeno tre esperimenti indipendenti ognuno dei quali eseguito in duplice per ogni estrazione di ciascun campione ( $n = 9$ ).

#### 9.4.2.8 *Attività antiossidante (AA)*

##### **Saggio ABTS**

L'attività antiossidante dei diversi campioni di polline è stata determinata utilizzando il test ABTS (Re R. et al., 1999), basato sulla capacità degli antiossidanti di decolorare una soluzione del radicale catione ABTS (per approfondimenti vedere paragrafo 5.2.1). Circa 12 - 16 ore prima dell'analisi è stato preparato il radicale catione colorato ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) come descritto nel paragrafo 8.2.2.2 – saggio ABTS; questo è stato quindi diluito circa 50 volte subito prima dell'analisi.

Per il saggio, in ciascun pozzetto di una piastra trasparente a 96 pozzetti sono stati introdotti 30  $\mu\text{l}$  di estratto di polline diluito al 2.5% v/v in acqua o di una soluzione di Trolox 1.8 mM (in etanolo) opportunamente diluita (0 – 0.30 mM in acqua) come standard, o di acqua come controllo; a questi sono stati quindi aggiunti 270  $\mu\text{l}$  di soluzione di ABTS<sup>•+</sup> diluita. La piastra è stata agitata per 10 secondi e lasciata per 120 min al buio a temperatura ambiente, prima di leggere l'assorbanza della soluzione a 734 nm contro l'acqua come bianco. L'attività antiossidante è stata determinata come percentuale di inibizione (paragrafo 5.2.1).

I risultati, espressi come millimoli di Trolox Equivalenti per g di polline secco (mmol TXE/g) utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuta dalla curva di calibrazione del Trolox (0-30 mM), rappresentano la media aritmetica di almeno tre esperimenti indipendenti ciascuno eseguito in duplice per ogni estrazione di ciascun campione (n = 9).

### **Test DPPH**

L'attività antiossidante dei campioni di polline è stata valutata utilizzando anche il test DPPH (Prior R. L. et al., 2005).

Per il saggio, 100  $\mu\text{l}$  di estratto di polline diluito al 2.5% v/v (in acqua), o di una soluzione etanolica di Trolox 0.45 mM, opportunamente diluita (0 – 0.15 mM in acqua) utilizzata come standard o di acqua come controllo, sono stati miscelati con 200  $\mu\text{l}$  di una soluzione etanolica di

DPPH 0.2 mM preparata di fresco, in una piastra trasparente a 96 pozzetti. Dopo 15 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente, l'assorbanza della soluzione è stata letta a 517 nm contro l'acqua come bianco. L'attività antiossidante è stata determinata come percentuale di inibizione (paragrafo 8.2.2.2 – saggio DPPH) e i risultati, espressi come millimoli di Trolox Equivalenti per grammo di polline secco (mmol TXE/g) utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuto dalla curva di calibrazione del Trolox (0-50  $\mu$ M), rappresentano la media aritmetica di almeno tre esperimenti indipendenti ciascuno dei quali è stato eseguito in duplice per ogni estrazione di ciascun campione ( $n = 9$ ).

### **Saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

Il saggio ORAC si basa sulla procedura messa a punto da Ou B. et al., 2001. Per il saggio tutte le soluzioni sono state preparate in tampone fosfato 75 mM a pH 7.4. L'analisi è stata effettuata utilizzando una piastra nera a 96 pozzetti, dove sono stati introdotti 25  $\mu$ l di estratto di polline diluito allo 0.20% v/v in tampone, o di una soluzione di Trolox 0.45 mM in etanolo opportunamente diluita (4.5 – 95.0  $\mu$ M) in tampone (come standard), o di tampone (come controllo); a questi sono stati addizionati 150  $\mu$ l di una soluzione di fluoresceina 4  $\mu$ M diluita 1:500 in tampone preparata immediatamente prima dell'uso. La piastra è stata agitata per 10 secondi ed è stata incubata a 37°C per 30 minuti al buio, dopo di che, per innescare la reazione di perossidazione, in ogni

pozzetto sono stati introdotti 75  $\mu$ l di una soluzione di AAPH 25 mM (in tampone) preparata di fresco. Immediatamente dopo l'aggiunta dell'iniziatore la piastra è stata velocemente agitata ed è stato monitorato il decadimento della fluorescenza ogni 2 min per 180 minuti a 37°C, utilizzando una eccitazione a 485 nm (banda 20 nm) e una emissione a 528 nm (banda 20 nm), mantenendo il gain fisso pari a 100. I risultati sono stati determinati calcolando l'area sotto la curva:

$$\text{Net AUC} = \text{AUC}_c - \text{AUC}_b$$

Dove:

$\text{AUC}_c$  = area sotto la curva registrata per il campione

$\text{AUC}_b$  = area sotto la curva registrata per il controllo.

I risultati sono stati espressi in millimoli di Trolox Equivalenti per grammo di polline secco (mmol TXE/g) utilizzando il coefficiente angolare della retta di regressione lineare ottenuto dalla curva di calibrazione del Trolox (0- 10  $\mu$ M). I risultati rappresentano la media aritmetica di almeno tre esperimenti indipendenti ognuno dei quali eseguito in duplice per ogni estrazione di ciascun campione (n = 9).

#### 9.4.2.9 *Analisi dei dati*

Sono stati effettuati controlli appropriati in tutti gli esperimenti descritti. Per scartare i dati anomali, è stata effettuata una analisi esplorativa preliminare utilizzando i box plot, sulla base delle mediane e dei quartili (Pellerano R. G. et al., 2012). I risultati del test TPC,

ABTS, DPPH e ORAC sono stati espressi come valori medi di almeno tre esperimenti indipendenti ognuno dei quali eseguito in duplice per ogni estrazione di ciascun campione ( $n = 9$ ) ed è stata indicata la deviazione standard. Le differenze statistiche sono state ottenute mediante l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di confronto multiplo Tukey utilizzando un livello di confidenza del 95% ( $p \leq 0.05$ ). La normalità dei dati è stata verificata con la procedura di Jarque-Bera. I risultati sono stati anche trattati con analisi chemiometriche multivariate quali la Cluster analisi (CA) e l'analisi delle componenti principali (PCA). Prima dell'analisi chemiometrica, i dati sono stati normalizzati. Tutte le elaborazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft SARL).

### ***9.4.3 Risultati***

I risultati ottenuti dall'analisi pollinica dei campioni selezionati ed analizzati riportanti l'identificazione del tipo pollinico dominante e/o il genere e la famiglia botanica e la sua percentuale, sono riportati in Tabella 8 insieme al colore percepito, al contenuto proteico e all'umidità.

Dalla Tabella 8 si evince che 24 dei campioni risultano essere composti da un'unica specie floreale in percentuale superiore al 90% sul totale delle presenti; la specie botanica prevalente è presente invece in una percentuale compresa tra il 70% e l'89% in 5 campioni e solo in 3 campioni la specie floreale predominante è compresa tra il 55% e 69%.

Codice	Famiglia	Tipo pollinico dominante	% tipo pollinico dominante	Nome	Altri tipi pollinici presenti quantità > 10%	Colore	Contenuto proteico (%)	Umidità %
HEU01	Asteraceae	<i>Helianthus</i>	45	-	-	ARANCIONE	-	4.4
		Compositae Forma T <i>Cichorium</i>	55					
HEU02	Asteraceae	<i>Helianthus f.</i>	77	Girasole ( <i>Helianthus annuus L.</i> )*	Compositae Forma T (gruppo del tarassaco e della cicoria) 23%	ARANCIONE VIVO	16.66	4.1
HSU03	Fabaceae	<i>Hedysarum coronarium L.</i>	100	Sulla	-	ROSSO BICOLORE	35.87	4.8
HSU04	Fabaceae	<i>Hedysarum coronarium L.</i>	100	Sulla	-	ROSSO SULLA	34.95	3.4
TRU05	Fabaceae	<i>Trifolium pratense gr.</i>	100	Trifoglio alessandrino ( <i>Trifolium alexandrinum L.</i> )*	-	MARRONE	-	4.2
TRU06	Fabaceae	<i>Trifolium pratense gr.</i>	59	Trifoglio alessandrino ( <i>Trifolium alexandrinum L.</i> )*	<i>Trifolium repens L.</i> (17%)	ROSSO MATTONE	-	5.9
TRU07	Fabaceae	<i>Trifolium pratense gr.</i>	90	Trifoglio alessandrino ( <i>Trifolium alexandrinum L.</i> )*	<i>Trifolium repens L.</i> (10%)	OCRA-MARRONE SCURO	26.99	6.9
TRU08	Fabaceae	<i>Trifolium pratense gr.</i>	97	Trifoglio	-	MARRONE SCURO	-	3.2
TRU09	Fabaceae	<i>Trifolium pratense gr.</i>	98	Trifoglio alessandrino ( <i>Trifolium alexandrinum L.</i> )*	-	OCRA	-	6.4
TRU10	Fabaceae	<i>Trifolium pratense gr.</i>	98	Trifoglio alessandrino ( <i>Trifolium alexandrinum L.</i> )*	-	MARRONE CHIARO	-	4.8
TRU11	Fabaceae	<i>Trifolium pratense gr.</i>	81	Trifoglio alessandrino ( <i>Trifolium alexandrinum L.</i> )*	<i>Trifolium repens L.</i> (17%)	OCRA-MARRONE CHIARO	-	6.1
GLU12	Fabaceae A.	<i>Gleditsia</i>	100	Spino di giuda ( <i>Gleditsia triacanthos L.</i> )*	-	GIALLO CUORE GRANDE	26.37	8.6
PAU13	Papaveraceae	<i>Papaver</i>	100	Papavero ( <i>Papaver rhoea L.</i> )*	-	VERDE GRANDE	-	7.1
PAU14	Papaveraceae	<i>Papaver</i>	100	Papavero ( <i>Papaver rhoea L.</i> )*	-	VERDE MARRONE	27.07	8.6
PRU15	Rosaceae	<i>Prunus f.</i>	100	-	-	VERDE OLIVA	28.95	7.2
PRU16	Rosaceae	<i>Prunus f.</i>	80	-	<i>Salix</i> (18%)	VERDE BEIGE	-	6.4
RUU17	Rosaceae	<i>Rubus f.</i>	100	Rovo ( <i>Rubus ulmifolius Schott</i> )*	-	VERDE CHIARO	26.91	7.1
RUU18	Rosaceae	<i>Rubus f.</i>	100	Rovo ( <i>Rubus ulmifolius Schott</i> )*	-	VERDE BICOLORE	-	7.1
CRU19	Rosaceae	<i>Crataegus</i>	70	Biancospino comune ( <i>Crataegus monogyna Jacq.</i> )*	<i>Salix</i> (18%), <i>Quercus robur gr.</i> (10%)	GIALLO PALLIDO	28.70	7.5
COU20	Umbelliferae	Umbelliferae Forma A	100	Coriandolo ( <i>Coriandrum sativum L.</i> )*	-	ROSA SBIADITO	-	6
COU21	Umbelliferae	Umbelliferae Forma A	100	Coriandolo ( <i>Coriandrum sativum L.</i> )*	-	ROSA CHIARO RUVIDO	-	7.4
COU22	Umbelliferae	Umbelliferae Forma A	100	Coriandolo ( <i>Coriandrum sativum L.</i> )*	-	ROSA SCURO	-	4.1
COU23	Umbelliferae	Umbelliferae Forma A	100	Coriandolo ( <i>Coriandrum sativum L.</i> )*	-	ROSA VIVACE	22.54	5.1
COU24	Umbelliferae	Umbelliferae Forma A	100	Coriandolo ( <i>Coriandrum sativum L.</i> )*	-	ROSA OPACO	-	4.6
HDU25	Araliaceae	<i>Hedera</i>	100	Edera ( <i>Hedera helix L.</i> )*	-	GIALLO OCRA	28.21	5.9
CIU26	Cistaceae	<i>Cistus incanus/creticus</i>	86	Cisto	<i>Castanea</i> (10%)	ARANCIONE	19.40	7.7
CSU27	Cornaceae	<i>Cornus sanguinea L.</i>	100	Sanguinella	-	OCRA GRANDE	18.15	6.3
CBU28	Cruciferae	Cruciferae tipo Brassica	100	-	-	GIALLO	24.84	6.2
CAU29	Fagaceae	<i>Castanea</i>	100	Castagno ( <i>Castanea sativa Miller</i> )*	-	GIALLO	25.89	6.9
LAU30	Lamiaceae	<i>Labiatae Forma L.</i>	100	-	-	BEIGE CHIARO	26.12	6.6
MAU31	Magnoliaceae	<i>Magnolia</i>	69	Magnolia	<i>Plantago</i> (12%)	BIANCO	24.06	8.4
FRU32	Oleaceae	<i>Fraxinus ornus L.</i>	90	Orniello	<i>Quercus robur gr.</i> (10%)	GIALLO	23.14	8.7

\* identificazione della specie botanica avvenuta grazie alle conoscenze della flora del territorio, mappe culturali, indagini di campo e dichiarazioni del produttore

Tabella 8: Analisi pollinica, identificazione pollinica della specie e/o del genere e della famiglia botanica, percentuale del tipo pollinico dominante e di quelli secondari, colore percepito, contenuto proteico e umidità dei campioni di polline uniflorale selezionati e analizzati.

Dalla Figura 52 si può osservare inoltre che i campioni di polline possiedono un buon contenuto proteico che varia notevolmente secondo la specie botanica (dal 16.7% nel campione di Girasole al 35.9% in quello di Sulla). Confrontando i risultati con quelli presenti in letteratura possiamo osservare che i pollini di Trifoglio (TRU07), Papavero (PAU14), Rovo (RUU17) e Cisto (CIU26) da noi analizzati hanno un contenuto proteico (rispettivamente del 27.0%, 27.0%, 26.9% e 19.4%) paragonabile al valore medio (rispettivamente 24.1%, 24.5%, 25.5% e 17.1%) di diversi pollini greci studiati (Liolios V. et al., 2016).

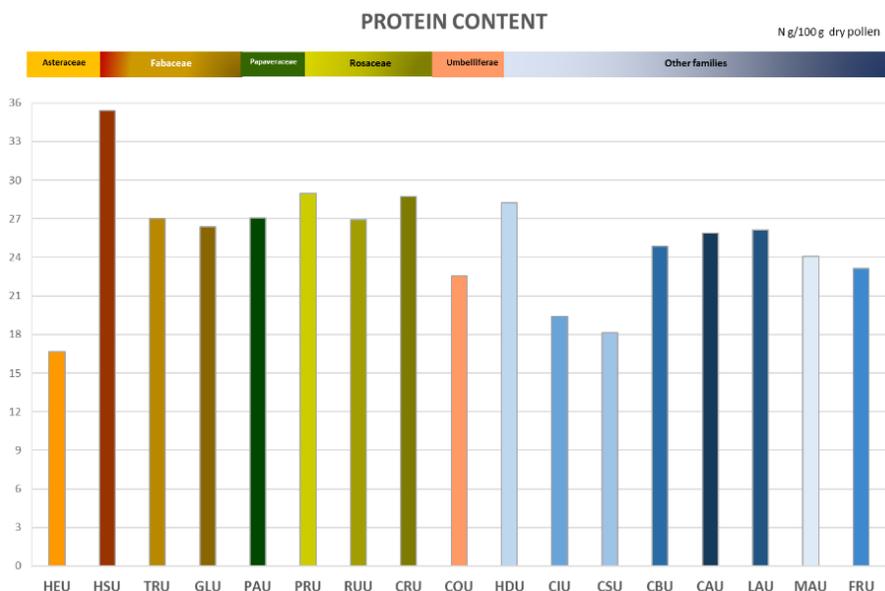


Figura 52: Contenuto proteico dei campioni di pollini delle diverse specie/pollini uniflorali divisi per colore.

Nella Tabella 9 troviamo l'annata di produzione, la provenienza geografica e la granulometria dei diversi pollini.

Come si può osservare da tale tabella il campione di Spino di Giuda (GLU12) si differenzia da tutti gli altri per la grandezza delle pallottole in quanto il 45% di esse ha un diametro  $> 2800 \mu\text{m}$  e il 49% compreso tra  $2400$  e  $2800 \mu\text{m}$  (evidenziato in tabella in rosa). I campioni di polline leggermente più piccoli del precedente sono la Sanguinella (CSU27), il Cisto (CIU26), il campione di Labiateae (LAU30) e il *Prunus* f. (PRU15) che hanno rispettivamente l'89%, il 72%, il 67% e il 63% delle pallottole avente un diametro maggiore di  $2400 \mu\text{m}$  e una non trascurabile percentuale di pallottole con diametro maggiore di  $2800 \mu\text{m}$  (evidenziate in verde). A seguire troviamo i campioni di Papavero (PAU13-14), Rovo (RUU17-18), Biancospino (CRU19), Coriandolo (COU20-24), Edera (HDU25), Crucifere tipo Brassica (CBU28), Castagno (CAU29) e Orniello (FRU32) con la maggior parte delle pallottole con diametro tra  $2000 \mu\text{m}$  e  $2800 \mu\text{m}$  (in arancione). Si osserva invece una maggior frequenza di pallottole con un diametro tra  $1690 \mu\text{m}$  e  $2400 \mu\text{m}$  (in azzurro) nei campioni di Girasole (HEU), Trifoglio (TRU05-11 con TRU10 che presenta anche una certa percentuale di pallottole più grandi), *Prunus* f. (PRU16) e Magnolia (MAU31), mentre i pollini più piccoli sono quelli di Sulla (HSU) aventi un diametro compreso prevalentemente tra  $1400 \mu\text{m}$  e  $2000 \mu\text{m}$  (in giallo).

Codice	Anno produz.	Provenienza	Granulometria (%)						
			> 2800 µm	2800-2400 µm	2400-2000 µm	2000-1690 µm	1690-1400 µm	1400-1000 µm	< 1000 µm
HEU01	2014	Fratterosa	1%	10%	49%	30%	9%	1%	0%
HEU02	2014	Fratterosa	1%	10%	58%	23%	8%	1%	0%
HSU03	2014	Fratterosa	0%	1%	23%	37%	36%	2%	0%
HSU04	2014	Arcevia	0%	0%	12%	32%	50%	5%	0%
TRU05	2014	Fratterosa	0%	4%	44%	32%	19%	0%	0%
TRU06	2014	Fratterosa	1%	6%	40%	37%	17%	1%	0%
TRU07	2014	Fratterosa	0%	0%	33%	46%	20%	0%	0%
TRU08	2014	Farneto di Montelabate	0%	1%	54%	34%	11%	0%	0%
TRU09	2014	Fratterosa	1%	6%	61%	29%	4%	0%	0%
TRU10	2014	Fratterosa	0%	17%	57%	21%	5%	0%	0%
TRU11	2014	Fratterosa	0%	2%	48%	35%	15%	0%	0%
GLU12	2014	Fratterosa	45%	49%	6%	0%	0%	0%	0%
PAU13	2014	Fratterosa	0%	64%	25%	7%	4%	0%	0%
PAU14	2014	Fratterosa	0%	29%	56%	8%	7%	0%	0%
PRU15	2015	Ascoli	13%	50%	32%	3%	1%	0%	0%
PRU16	2014	Urbisaglia	0%	5%	41%	39%	14%	0%	0%
RUU17	2014	Fratterosa	0%	27%	50%	13%	8%	0%	0%
RUU18	2014	Fratterosa	2%	16%	63%	16%	3%	0%	0%
CRU19	2014	Mergo	2%	32%	54%	9%	1%	1%	1%
COU20	2014	Fratterosa	0%	24%	55%	16%	4%	0%	0%
COU21	2014	Fratterosa	10%	35%	41%	10%	2%	1%	0%
COU22	2014	Fratterosa	1%	26%	63%	9%	1%	0%	0%
COU23	2014	Fratterosa	0%	24%	66%	6%	3%	0%	0%
COU24	2014	Fratterosa	1%	23%	68%	6%	1%	0%	0%
HDU25	2014	Fossombrone	3%	22%	58%	14%	3%	0%	1%
CIU26	2015	Ascoli Piceno	24%	48%	26%	1%	0%	0%	0%
CSU27	2014	Fratterosa	23%	66%	10%	0%	0%	0%	0%
CBU28	2014	Fratterosa	2%	30%	61%	6%	1%	0%	0%
CAU29	2015	Ascoli Piceno	2%	20%	66%	11%	1%	0%	0%
LAU30	2014	Polverigi	14%	53%	30%	2%	0%	0%	0%
MAU31	2014	Fratterosa	0%	0%	41%	31%	23%	5%	0%
FRU32	2015	Isola del Piano	2%	15%	68%	12%	2%	1%	1%

Tabella 9: Anno e luogo di produzione e granulometria dei campioni di polline uniflorale selezionati e analizzati.

I risultati dell'analisi del colore della superficie delle pallottole intere dei campioni di polline misurato con il colorimetro Minolta, espresso in coordinate CIELab, sono riportati nella Tabella 10.

<b>CODICE POLLINE</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
HEU01	55.64	21.64	65.37
HEU02	56.82	22.33	69.42
HSU03	51.33	12.72	27.01
HSU04	49.04	16.82	26.87
TRU05	33.18	7.03	24.33
TRU06	35.70	10.26	26.10
TRU07	38.00	8.85	31.28
TRU08	30.83	7.08	21.84
TRU09	49.84	7.35	35.21
TRU10	35.26	5.08	22.67
TRU11	43.34	6.91	29.90
GLU12	63.85	5.48	38.97
PAU13	28.63	-1.91	18.91
PAU14	29.83	1.99	18.19
PRU15	53.33	3.42	23.70
PRU16	57.34	2.97	29.98
RUU17	55.95	3.72	18.62
RUU18	50.08	3.87	14.61
CRU19	66.31	3.77	40.84
COU20	52.91	13.63	19.34
COU21	57.90	11.68	17.36
COU22	46.94	13.99	12.09

COU23	50.06	16.93	15.66
COU24	51.40	15.09	12.01
HDU25	67.59	7.90	47.79
CIU26	56.45	12.26	48.45
CSU27	56.04	7.02	35.99
CBU28	60.37	5.78	46.86
CAU29	63.76	5.68	50.28
LAU30	63.47	5.00	29.41
MAU31	67.49	6.50	33.89
FRU32	63.68	6.40	50.11

Tabella 10: Valori medi delle coordinate CIELab misurate con colorimetro, ottenuti da tre letture dello stesso campione.

Le coordinate del colore misurate attraverso il colorimetro sono state rappresentate in due grafici tridimensionale (Figura 53 e Figura 54) in modo da avere una visione riassuntiva che possa mettere meglio in evidenza le differenze tra i campioni. Possiamo osservare infatti che i campioni colorati in blu (HEU01-02) sono posizionati nel lato opposto rispetto a quelli rossi chiaro (PAU13-14).

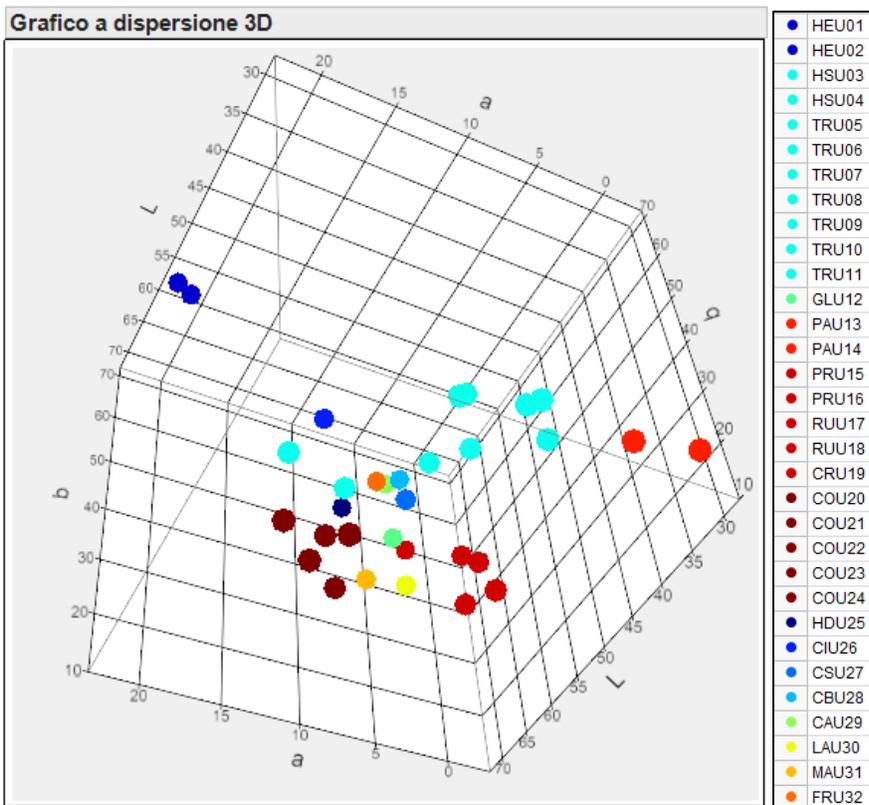


Figura 53: Rappresentazione tridimensionale delle coordinate CIELab.

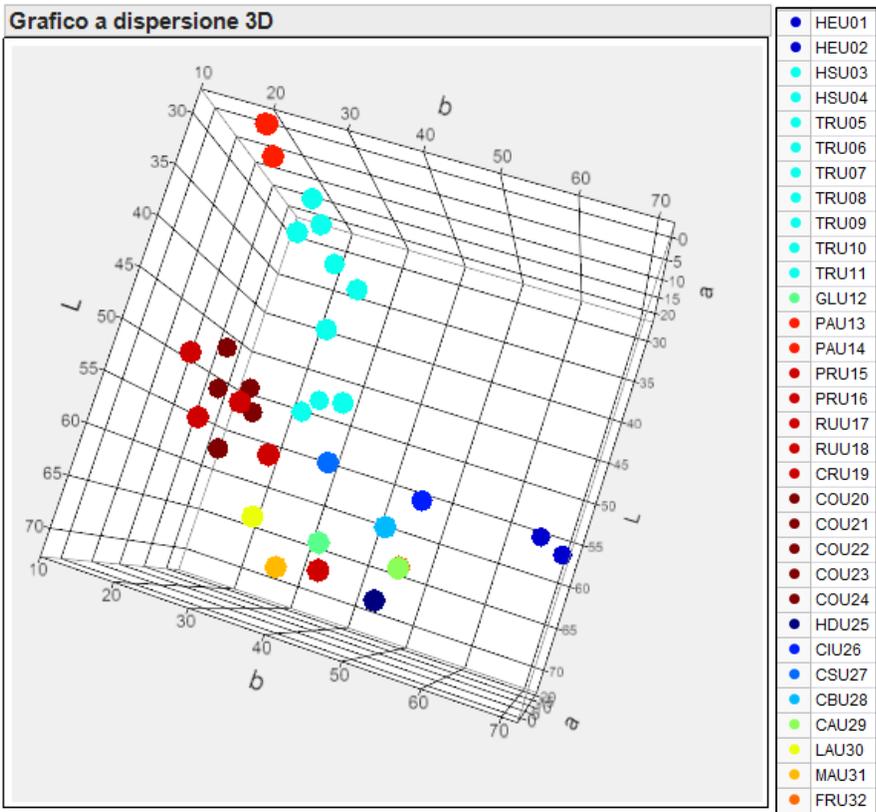


Figura 54:Rappresentazione tridimensionale delle coordinate CIELab.

In Tabella 11 sono invece riportati i risultati ottenuti nell'analisi dell'attività antiossidante dei diversi campione di polline misurata con i diversi test (Fenoli Totali, ABTS, DPPH, ORAC).

CODICE POLLINE	FOLIN			ABTS			DPPH			ORAC		
	mmol GAE/g secco			mmol TXE/g secco			mmol TXE/g secco			mmol TXE/g secco		
HEU01	0.041	±	0.003	0.098	±	0.013	0.014	±	0.003	0.343	±	0.051
HEU02	0.042	±	0.004	0.108	±	0.008	0.016	±	0.003	0.354	±	0.067
HSU03	0.030	±	0.009	0.047	±	0.014	0.022	±	0.007	0.234	±	0.076
HSU04	0.031	±	0.004	0.056	±	0.008	0.021	±	0.007	0.209	±	0.062
TRU05	0.060	±	0.011	0.069	±	0.015	0.058	±	0.009	0.202	±	0.092
TRU06	0.060	±	0.007	0.072	±	0.008	0.052	±	0.010	0.219	±	0.045
TRU07	0.055	±	0.007	0.076	±	0.015	0.058	±	0.011	0.238	±	0.070
TRU08	0.053	±	0.008	0.079	±	0.015	0.052	±	0.008	0.213	±	0.094
TRU09	0.062	±	0.012	0.082	±	0.014	0.055	±	0.011	0.205	±	0.064
TRU10	0.055	±	0.009	0.083	±	0.014	0.067	±	0.011	0.214	±	0.057
TRU11	0.061	±	0.013	0.084	±	0.013	0.066	±	0.012	0.247	±	0.081
GLU12	0.073	±	0.013	0.166	±	0.015	0.053	±	0.008	0.504	±	0.118
PAU13	0.090	±	0.012	0.166	±	0.014	0.061	±	0.010	0.588	±	0.142
PAU14	0.092	±	0.019	0.177	±	0.018	0.058	±	0.005	0.546	±	0.148
PRU15	0.082	±	0.009	0.168	±	0.015	0.024	±	0.006	0.731	±	0.111
PRU16	0.085	±	0.005	0.170	±	0.012	0.032	±	0.004	0.633	±	0.081
RUU17	0.087	±	0.013	0.175	±	0.014	0.038	±	0.009	0.769	±	0.158
RUU18	0.090	±	0.008	0.175	±	0.014	0.037	±	0.008	0.808	±	0.072
CRU19	0.103	±	0.003	0.197	±	0.008	0.019	±	0.002	0.921	±	0.050
COU20	0.110	±	0.019	0.119	±	0.017	0.047	±	0.009	0.558	±	0.111
COU21	0.112	±	0.011	0.119	±	0.008	0.043	±	0.011	0.573	±	0.140
COU22	0.095	±	0.011	0.124	±	0.015	0.041	±	0.012	0.505	±	0.137
COU23	0.104	±	0.010	0.130	±	0.015	0.041	±	0.012	0.526	±	0.110

<b>COU24</b>	0.116	±	0.008	0.134	±	0.014	0.055	±	0.012	0.618	±	0.090
<b>HDU25</b>	0.059	±	0.002	0.071	±	0.006	0.028	±	0.003	0.233	±	0.030
<b>CIU26</b>	0.062	±	0.008	0.095	±	0.015	0.055	±	0.005	0.291	±	0.057
<b>CSU27</b>	0.055	±	0.008	0.084	±	0.009	0.036	±	0.006	0.252	±	0.062
<b>CBU28</b>	0.079	±	0.009	0.143	±	0.013	0.112	±	0.009	0.334	±	0.086
<b>CAU29</b>	0.126	±	0.011	0.219	±	0.015	0.132	±	0.008	0.605	±	0.085
<b>LAU30</b>	0.158	±	0.005	0.218	±	0.006	0.134	±	0.005	0.824	±	0.084
<b>MAU31</b>	0.024	±	0.004	0.050	±	0.006	0.012	±	0.006	0.122	±	0.036
<b>FRU32</b>	0.090	±	0.005	0.128	±	0.009	0.053	±	0.003	0.445	±	0.035

Tabella 11: Contenuto totale fenolico (FOLIN), attività antiossidante saggiata mediante diversi test (ABTS, DPPH, ORAC) dei diversi campione di polline ( $p < 0.05$ ).

Nella Figura 55 sono inoltre riportati i risultati ottenuti nel test ABTS che è quello che meglio ha evidenziato le differenze tra i pollini di diversa origine pollinica.

Considerando i campioni di polline che vanno da 01 a 24 che comprendono i tipi pollinici di cui abbiamo ottenuto più di un campione dello stesso genere o famiglia possiamo evidenziare che i pollini di Sulla (HSU - *Hedysarum coronarium*) e quelli del genere del Trifoglio (TRU - *Trifolium pratense* gr. e *alexandrinum*) appartenenti alla famiglia delle Fabaceae mostrano i valori significativamente più bassi in termini di attività antiossidante.

Valori intermedi e significativamente diversi dai precedenti, si osservano invece per tutti i campioni di Umbelliferae identificati come di Coriandolo (COU - *Coriandrum sativum*) in base alle dichiarazioni del produttore, e per i due campioni con una prevalenza di polline di Girasole (HE - *Helianthus annuus*).

I campioni di Spino di Giuda (GLU - *Gleditsia triacanthos*), di Papavero (PAU - *Papaver rhoeas*), del genere *Prunus* f. (PRU), quelli della famiglia delle Rosaceae, nella fattispecie Rovo (RUU - *Rubus ulmifolius*) e Biancospino comune (CRU - *Crataegus monogyna*), mostrano invece i valori significativamente più elevati.

Per quanto riguarda invece i pollini uniflorali di cui abbiamo un solo campione per famiglia riportati sulla destra del grafico e colorati con varie tonalità di azzurro, l'attività antiossidante segue il seguente ordine:

Magnolia (MAU) < Edera (HEU)  $\approx$  Sanguinella (CSU)  $\approx$  *Cistus incanus/creticus* (CIU) < Orniello (FRU) < Cruciferae tipo Brassica (CBU) < Labiatae forma L (LAU)  $\approx$  Castagno (CAU) con differenze significative tra le varie specie.

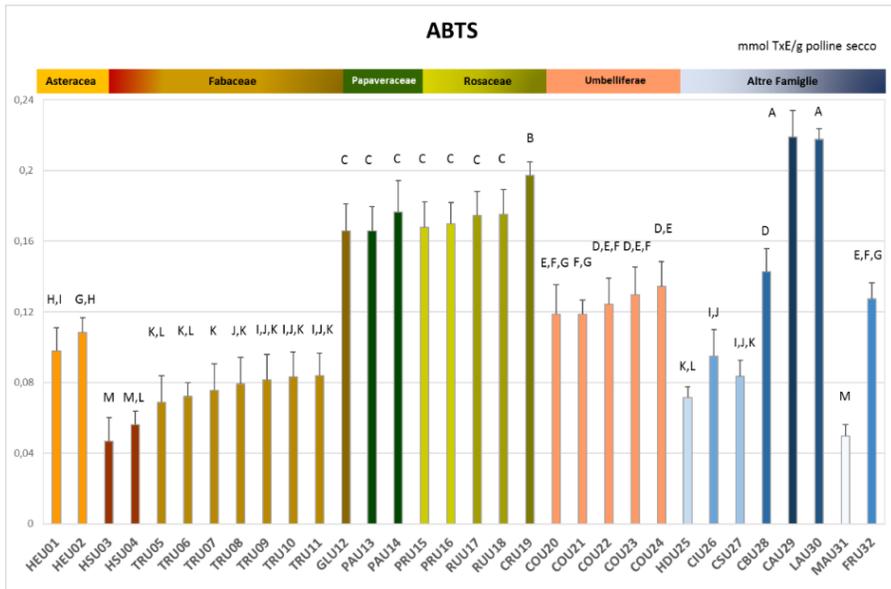


Figura 55: Attività antiossidante, testata mediante ABTS (mmol TxE/g di polline secco) di pollini uniflorali ( $p < 0.05$ ).

Un andamento pressoché simile ( $r = 0.8083$ ,  $p < 0.0001$ ) è stato ottenuto mediante saggio TPC (Figura 56), che dà però risultati più bassi per i campioni di Girasole, di Papavero, di Spino di Giuda, della famiglia delle Rosaceae e delle Cruciferae tipo Brassica. Sono confermate come significative le differenze tra gruppi di pollini di specie botaniche diverse (Girasole, Sulla, Trifoglio, Papavero, Biancospino comune e la maggior parte delle Umbelliferae) come per il test precedente.

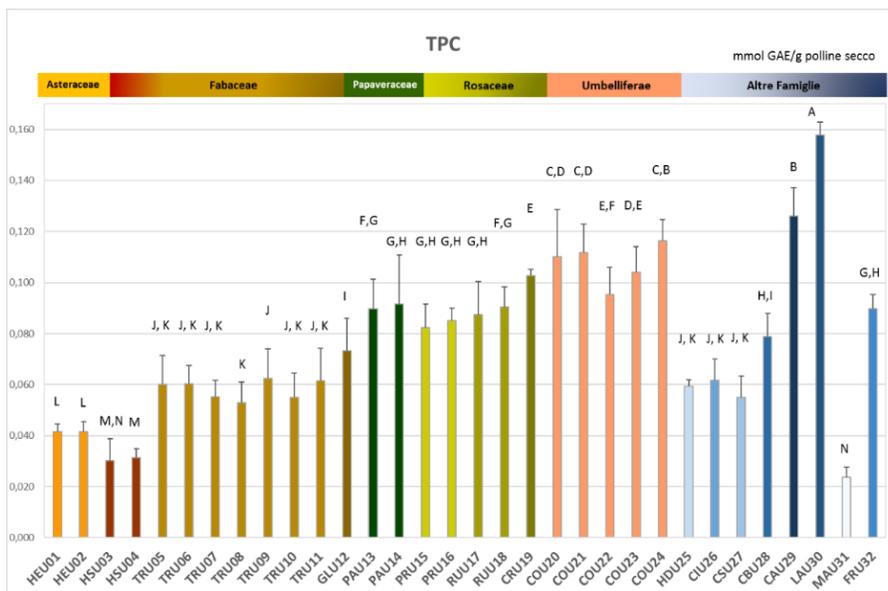


Figura 56: Contenuto in polifenoli totale, testato mediante TPC (mmol GAE/g di polline secco) di pollini uniflorali ( $p < 0.05$ ).

Anche i risultati del test ORAC (Figura 57) mostrano un andamento analogo al test ABTS ( $r = 0.9035$ ,  $p < 0.0001$ ). L'unica differenza si nota nei campioni della famiglia delle Rosacee i quali danno, in questo test, una risposta elevata ed equiparabile al campione di Labiateae che in tutti i test mostra avere la maggior attività antiossidante. Questo ci fa supporre che questi campioni contengano dei composti con attività antiossidante che per la loro struttura reagiscono diversamente con i perossiradicali che sono i radicali verso i quali reagiscono gli antiossidanti in questo test.

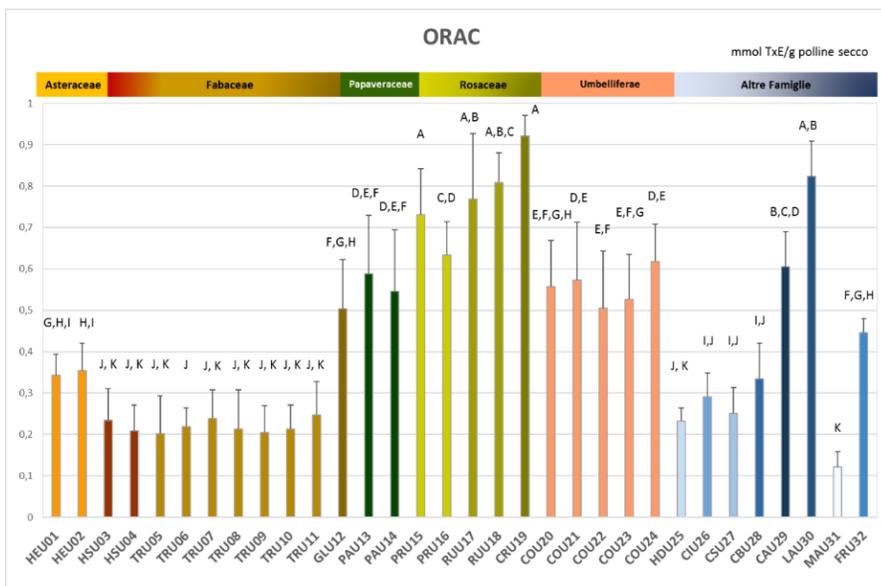


Figura 57: Attività antiossidante, testata mediante ORAC (mmol TXE/g di polline secco) e significatività di pollini uniflorali ( $p < 0.05$ ).

Per quanto riguarda il saggio DPPH (Figura 58) si osserva che alcuni campioni, nella fattispecie i Girasoli e quelli della famiglia delle Rosaceae, reagiscono diversamente dando risultati più bassi rispetto al test ABTS, mentre altri come i Trifogli mostrano valori più alti; questo ci fa supporre che questi campioni contengano dei composti con attività antiossidante che per la loro struttura reagiscono diversamente con il radicale all'azoto, DPPH. Nonostante ciò anche se tale test mostra una correlazione inferiore rispetto agli altri saggi, essa risulta essere significativa ( $r = 0.4347$ ;  $p = 0.0129$ ). Per di più in questo test si evidenziano comunque delle differenze significative tra gruppi di campioni appartenenti a famiglie o generi distinti.

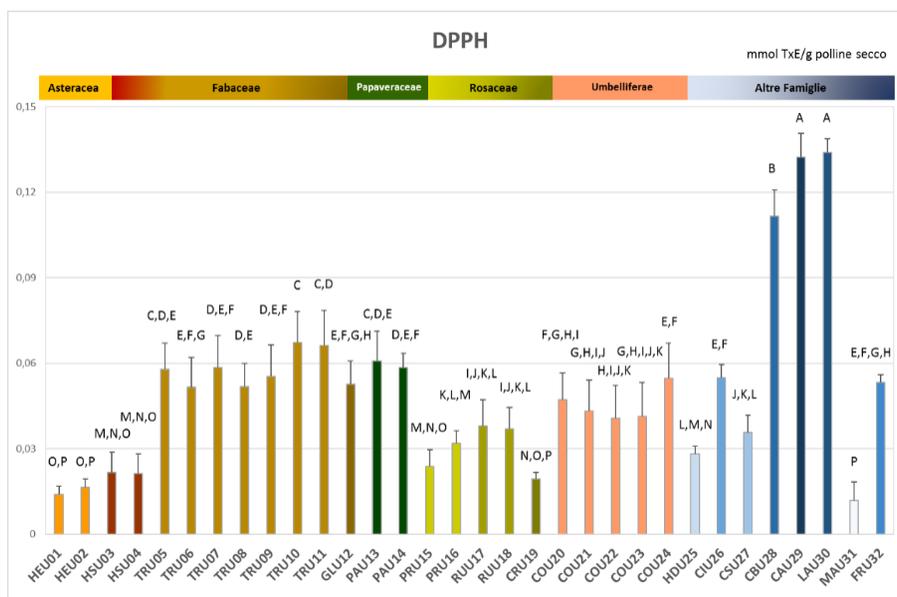


Figura 58: Attività antiossidante, testata mediante DPPH (mmol TXE/g di polline secco) di pollini uniflorali ( $p < 0.05$ ).

I risultati ottenuti indicano che probabilmente il tipo di sostanze fitochimiche contenute nei diversi pollini dipendono dall'origine floreale e ne influenzano l'attività antiossidante che viene diversamente misurata dai diversi test.

#### 9.4.4 Analisi multivariata

Per ottenere quindi un quadro più semplificato del rapporto tra tutti i parametri misurati per i pollini di diversa provenienza pollinica, i risultati ottenuti sono stati elaborati mediante analisi multivariata.

#### 9.4.4.1 *Cluster Analisi*

Una prima analisi è stata effettuata cercando di raggruppare i dati con una Cluster analisi gerarchica agglomerativa impiegando come criterio il metodo del centroide e utilizzando la misura della distanza Euclidea nello spazio del cluster. Il metodo del centroide prevede la misura della distanza dei baricentri di ciascun cluster.

Tale analisi è stata eseguita per verificare se la struttura dei dati fosse in grado di identificare i diversi gruppi di polline in base al genere, alla specie e/o alla famiglia botanica. Per l'analisi è stato utilizzato l'intero insieme di dati che incorpora i 32 campioni di pollini e come variabili, quelle relative all'attività antiossidante (TCP, ABTS, ORAC e DPPH) e quelle legate al colore (L, a, b CIELab).

Il risultato ottenuto dalla Cluster analisi, rappresentato come dendrogramma (Figura 59), mostra la presenza di sedici gruppi di polline. I pollini aventi più di un campione della stessa specie come il Girasole (HEU), la Sulla (HSU), il Trifoglio (TRU), il Coriandolo (COU) e il Papavero (PAU) sono tutti raggruppati ognuno nel proprio gruppo secondo la specie, mentre il Rovo (RUU) e il *Prunus* (PRU), appartenenti alla stessa famiglia (Rosaceae) formano due gruppi vicini che sono raggruppati nello stesso cluster. Il campione di polline di Spino di Giuda (GLU) anche se appartenente alla famiglia delle Fabaceae non viene classificato insieme agli altri campioni della stessa famiglia (Trifoglio e Sulla).

Tale risultato, che poteva essere prevedibile dall'analisi dei vari test di misura dell'attività antiossidante, potrebbe essere dovuto al fatto che nonostante appartengano alla stessa famiglia lo Spino di Giuda è una specie arborea al contrario del Trifoglio e della Sulla che sono specie erbacee.

Altri pollini di cui abbiamo un solo campione per specie, genere o famiglia quali la Magnolia (MAU), la Sanguinella (CSU), l'Edera (HDU), il Cisto (CIU), l'Orniello (FRU), la Cruciferae tipo Brassica (CBU), il Castagno (CAU) e la Labiateae (LAU) rimangono separati fra loro.

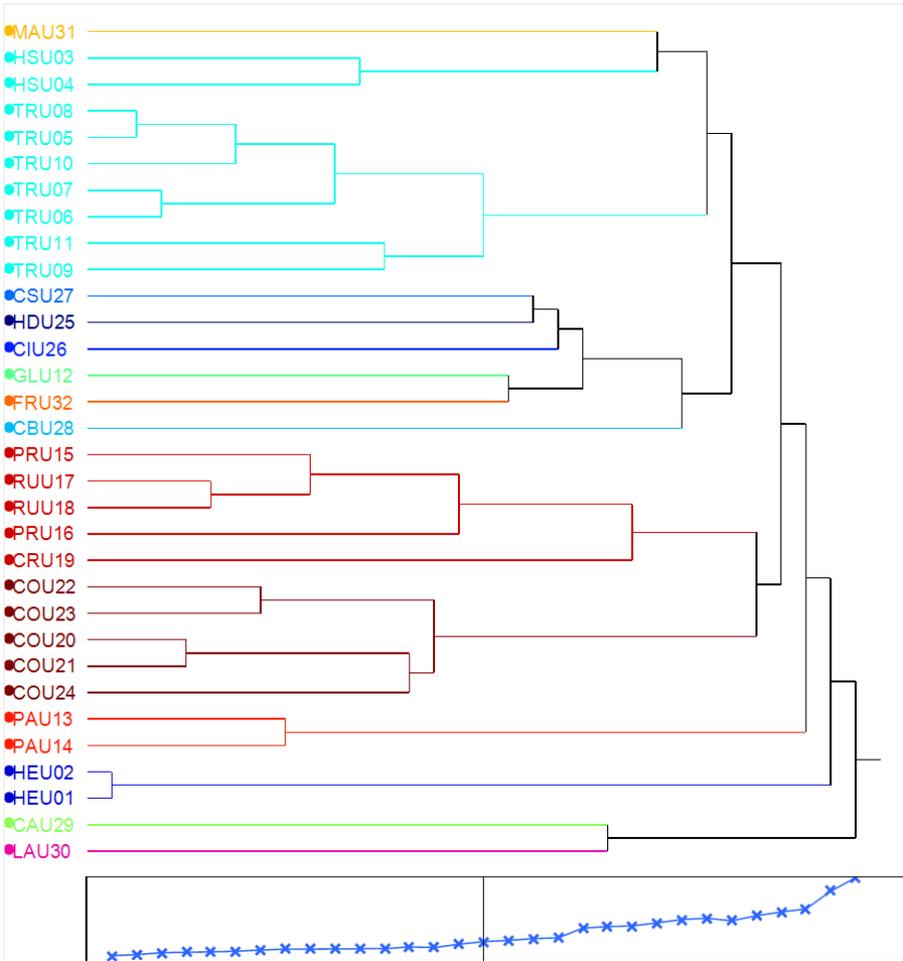


Figura 59: Dendrogramma ottenuto dalla Cluster analisi effettuata utilizzando l'algoritmo del centroide (distanza Euclidea), sull'intero insieme di dati comprendente 32 campioni di polline e 7 variabili (TPC, ABTS, ORAC, DPPH, CIE L, a, b). I campioni sono colorati per famiglia.

### **9.4.5 Conclusione**

Questo studio ha permesso la caratterizzazione di diversi pollini uniflorali che sono stati descritti in termini di attività antiossidante, di colore e di granulometria delle pallottole e di contenuto proteico.

I risultati ottenuti indicano che l'attività antiossidante è chiaramente influenzata dall'origine floreale del polline e che quindi probabilmente questa influenza il tipo e la quantità di sostanze fitochimiche in essi contenute. La possibilità di raggruppare per specie o famiglia tutti i campioni di pollini in cluster separati indica che le proprietà antiossidanti e il colore del polline contengono informazioni utili per la classificazione dei campioni. Dall'analisi dei risultati ottenuti dalla misura dell'attività antiossidante, mediante saggio ABTS, possiamo osservare che i campioni di polline uniflorale mostrano un contenuto in millimoli di Trolox Equivalenti circa 30 volte superiore (da 46.7 a 219.0 mmol TXE/kg polline) rispetto a quelli misurati per i mieli uniflorali (paragrafo 8.2.5.1) (1.24 – 7.46 mmol TXE/kg miele). Il confronto tra i risultati ottenuti per queste due diverse matrici è reso possibile dal fatto di aver utilizzato gli stessi metodi di analisi.

Questo mostra come il polline possieda un notevole contenuto in antiossidanti che possono contribuire all'apporto di tali sostanze con l'alimentazione, nonostante sia da tenere presente che la quantità giornaliera di polline che solitamente viene assunto è abbastanza piccola e che non è stata ancora dimostrata con chiarezza la sua biodisponibilità.

## **9.5 STUDIO DELLA VARIABILITÀ STAGIONALE DELLA COMPOSIZIONE BOTANICA E DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI POLLINI MULTIFLORALI PROVENIENTI DA DIVERSE ZONE GEOGRAFICHE DELLE MARCHE (ITALIA)**

La conoscenza della composizione e della biodiversità delle fonti polliniche all'interno di un'area geografica è molto importante nel settore dell'apicoltura in quanto la quantità e la qualità nutrizionale del polline influenza lo sviluppo della covata e quindi la sopravvivenza della colonia, essendo il polline la principale fonte proteica di questi insetti (Dimou M. et al., 2014). La carenza di polline può avere, infatti, effetti significativi sulla forza e resistenza della colonia e sulla produzione di miele (Dimou M. et al., 2014). Lo studio della composizione botanica del polline può essere inoltre importante per caratterizzare la flora tipica di una determinata zona geografica (Dimou M. et al., 2014).

A questo scopo, uno studio effettuato da Dimou M. et al., 2014 ha dimostrato la possibilità di classificare dal punto di vista geografico pollini provenienti dalla Grecia settentrionale, centrale e meridionale utilizzando i risultati dell'analisi pollinica di tali campioni, incrementando così le conoscenze sulla flora della Grecia attraverso l'osservazione delle famiglie botaniche maggiormente presenti.

Anche Morais M. et al., 2011 hanno studiato la relazione tra l'origine geografica e l'attività antiossidante di campioni di polline eteroflora, provenienti da diversi Parchi Naturali del Portogallo (Morais M. et al., 2011) e dai risultati sono emerse differenze significative tra la maggior parte dei campioni prelevati nei diversi parchi, in termini di quantità di polifenoli totali e di attività antiossidante: questi risultati hanno portato gli autori ad affermare che queste differenze sono attribuibili all'origine geografica.

In un altro studio (Gasparotto J. A. S. et al., 2015) è stata valutata la composizione chimica (umidità, proteine, lipidi, zuccheri, vitamine antiossidanti, ecc.) di diversi pollini (uniflorali ed eteroflora) provenienti da tre stati del sud del Brasile con lo scopo di trovare una correlazione con l'origine botanica. Dai risultati delle analisi multivariate si è osservato che i composti determinati con tali analisi non sono sufficienti a caratterizzare i campioni di polline selezionati secondo la zona di produzione, ma sono tuttavia indicativi di qualità e tipicità.

L'interesse nei confronti della caratterizzazione dei pollini d'ape è sorto anche in altri paesi come la Spagna e il Portogallo. Infatti, in un lavoro di ricerca (Nogueira C. et al., 2012) sono state studiate le caratteristiche chimico fisiche (umidità, pH, proteine, carboidrati, ecc.) e microbiologiche di pollini commerciali (con percentuale di un tipo pollinico dominante > 45%) provenienti da diverse zone della Spagna e del Portogallo.

Spinti da un particolare interesse da parte dell'ASSAM nei confronti di questo progetto, abbiamo quindi deciso di portare avanti uno studio su pollini d'ape multiflorali raccolti in diverse zone geografiche delle Marche (Italia) con lo scopo di valutare le variazioni nel tempo della composizione botanica, delle proprietà antiossidanti e del contenuto proteico.

### ***9.5.1 Campioni***

A tale scopo sono stati analizzati 24 campioni di pollini d'ape multiflorale (Figura 60) provenienti da 3 apiari collocati in diverse province delle Marche (Isola del Piano (PU), Loc. Cavaceppo (AP) e Matelica (MC)) raccolti nel 2015 con cadenza programmata. I pollini sono stati identificati con una sigla che indica la provincia di provenienza (PU, AP, MC), una lettera che indica che il polline è multiflorale (M) e con un numero progressivo che indica l'avanzamento della stagione di raccolta.

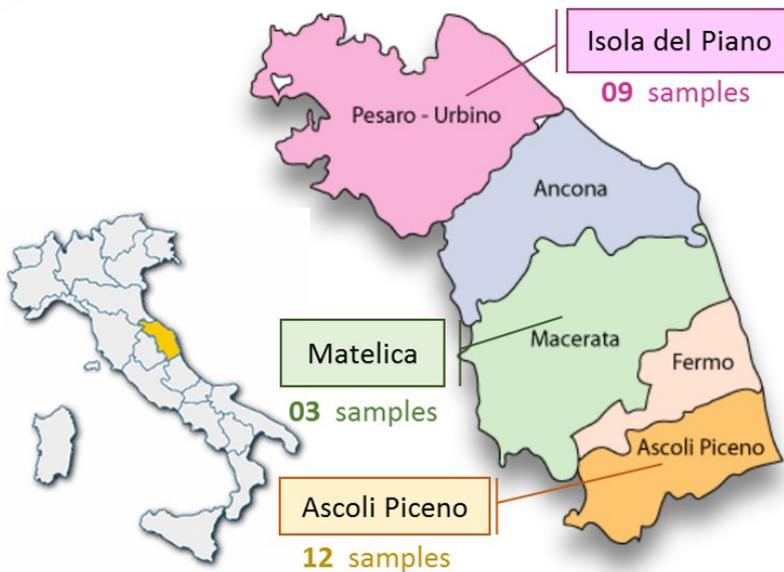


Figura 60: Identificazione geografica dei 24 campioni di pollini multiflorali analizzati.

I campioni di polline congelati appena raccolti, sono stati essiccati presso il nostro laboratorio in stufa a 35°C per 24 ore al fine di ridurre l'umidità. Sui campioni è stata effettuata l'analisi pollinica come descritto nel paragrafo 9.4.2.1.

Di seguito sono riportate le foto dei 24 campioni di polline suddivise per apiario di raccolta (AP: Ascoli Piceno; PU: Pesaro Urbino; MC: Macerata):



APM01



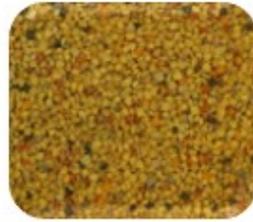
APM02



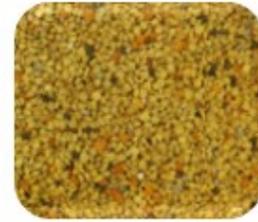
APM03



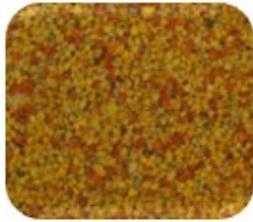
APM04



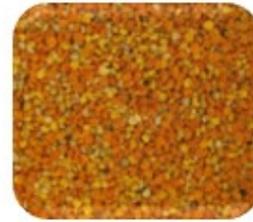
APM05



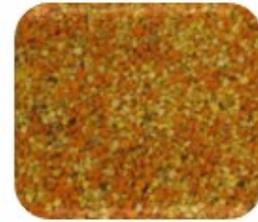
APM06



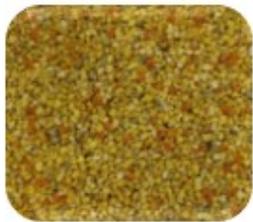
APM07



APM08



APM09



APM10



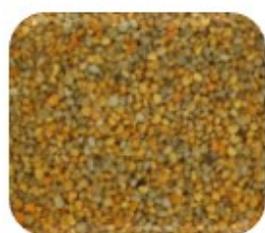
APM11



APM12



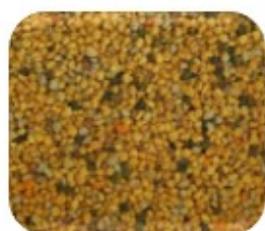
PUM01



PUM02



PUM03



PUM04



PUM05



PUM06



PUM07



PUM08



PUM09



MCM01



MCM02



MCM03

## 9.5.2 *Materiali e metodi*

I campioni di polline multiflorali sono stati analizzati con gli stessi metodi utilizzati per i campioni di polline uniflorale (paragrafo 9.4.2). Il Centro Agrochimico Regionale dell'ASSAM si è occupato di valutare il contenuto di umidità e proteico e la composizione botanica attraverso l'analisi palinologica. I campioni sono stati analizzati tal quali senza suddividere le pallottole in funzione del colore come descritto per il lavoro sui pollini uniflorali.

## 9.5.3 *Risultati*

### 9.5.3.1 *Analisi pollinica*

I risultati dell'analisi pollinica sono riportati nella Tabella 12, tuttavia le specie principalmente presenti in ognuno dei campioni di polline (fino al 5%) sono state riassunte per chiarezza nello schema sottostante:

- APM01, 40% *Salix*, 23% *Prunus* f., 13% *Fraxinus ornus*, 08% *Erica*;
- APM02, 68% *Fraxinus ornus*, 10% *Pyrus/Malus* f., 5% *Acer*;
- APM03, 44% *Fraxinus ornus*, 31% *Prunus* f., 14% *Pyrus/Malus* f.;
- APM04, 66% *Quercus ilex* gr., 6% *Papaver*, 5% *Cistus salvifolius*;
- APM05, 50% *Vitis*, 36% *Quercus ilex* gr., 5% *Genista* f.;
- APM06, 76% *Quercus ilex* gr., 11% *Vitis*;
- APM07, 41% *Olea* f., 41% *Quercus ilex* gr., 8% *Castanea*;

- APM08, 36% *Castanea*, 35% *Olea* f., 10% *Cistus incanus*, 7% *Clematis*;
- APM09, 76 % *Castanea*, 7% *Cistus incanus*, 6% *Clematis*;
- APM10, 84% *Castanea*;
- APM11, 100% *Castanea*;
- APM12, 100% *Castanea*;
  
- PUM01, 57% *Fraxinus ornus*; 10% *Cercis*, 9% *Prunus* f.;
- PUM02, 51% *Fraxinus ornus*, 21% *Quercus robur* gr., 5% *Pyrus/Malus* f., 5% *Cercis*;
- PUM03, 64% *Fraxinus ornus*, 18% *Quercus robur* gr., 8% *Papaver*;
- PUM04, 73% *Fraxinus ornus*, 8% *Papaver*;
- PUM05, 63% *Fraxinus ornus*, 12% *Robinia*, 10% *Vitis*;
- PUM06, 63% Umbelliferae forma A, 23% *Trifolium alexandrinum*, 10% *Rubus* f.;
- PUM07, 73% Umbelliferae forma A, 11% *Trifolium alexandrinum*;
- PUM08, 76% Umbelliferae forma A, 10% *Rubus* f., 7% *Trifolium alexandrinum*;
- PUM09, 80% Umbelliferae forma A, 6% *Cruciferae*, 5% *Rubus* f.;
  
- MCM01, 46% *Trifolium a.*, 23% *Rubus* f., 11% *Onobrychis*, 10% *Trifolium r.* gr.;
- MCM02, 55% *Trifolium a.*, 16% *Rubus* f., 16% *Onobrychis*, 6% *Trifolium r.* gr.;
- MCM03, 50% *Trifolium a.*, 21% *Rubus* f., 13% *Onobrychis*, 5% Umbelliferae Forma A.



Dai dati ottenuti dall'analisi palinologica e da studi floristici e fitogeografici si può osservare che le specie maggiormente presenti sono: l'Orniello (*Fraxinus ornus* L.), le Umbelliferae di forma A (presumibilmente coriandolo e/o carota), il Castagno (*Castanea*), le Querce (*Quercus ilex* gr.), il Trifoglio alessandrino (*Trifolium alexandrinum*) e le piante appartenenti al genere *Olea*, *Vitis* e *Salix*.

### 9.5.3.2 *Contenuto proteico*

Nella Tabella 13 sono riportati i risultati ottenuti dalla misura del contenuto proteico (espresso in % di azoto proteico/polline secco) che nei campioni varia dal 16.0% al 24.5%. I valori ottenuti sono in accordo con quelli presenti in letteratura relativi a pollini brasiliani di diversa origine geografica il cui contenuto varia dal 12% al 27% (Gasparotto J. A. S. et al., 2015) e a pollini commerciali spagnoli e portoghesi il cui contenuto varia da 12.5% al 25.2% (Nogueira C. et al., 2012). Inoltre da altri studi sembrerebbe che il contenuto proteico può variare addirittura dal 12 al 61% in funzione dell'origine botanica (Gasparotto J. A. S. et al., 2015). Recentemente è stato condotto uno studio da Liolios V. et al. (2016) su pollini raccolti nel Nord della Grecia da marzo a novembre i quali hanno dato un contenuto proteico che varia da 12.80 a 30.11% in base alla specie botanica.

Codice	Periodo raccolta	Contenuto proteico %	umidità %	Granulometria (%)						
				> 2800 $\mu\text{m}$	2800-2400 $\mu\text{m}$	2400-2000 $\mu\text{m}$	2000-1690 $\mu\text{m}$	1690-1400 $\mu\text{m}$	1400-1000 $\mu\text{m}$	< 1000 $\mu\text{m}$
APM01	21-apr	21,09	15,8	6%	28%	43%	13%	8%	2%	0%
APM02	30-apr	21,42	13,9	2%	18%	56%	19%	4%	0%	0%
APM03	08-mag	24,52	11,9	5%	36%	48%	8%	2%	0%	0%
APM04	15-mag	19,88	13,8	2%	24%	58%	11%	3%	1%	1%
APM05	22-mag	20,84	13,1	3%	25%	61%	11%	1%	0%	0%
APM06	29-mag	18,04	14,9	9%	37%	45%	7%	2%	0%	0%
APM07	05-giu	17,78	11,3	4%	32%	49%	10%	3%	1%	0%
APM08	12-giu	16,02	16,9	4%	33%	42%	15%	4%	1%	1%
APM09	19-giu	18,81	12,9	10%	20%	32%	26%	9%	2%	2%
APM10	26-giu	20,75	10,5	2%	16%	50%	24%	7%	1%	1%
APM11	03-lug	22,10	10,8	10%	29%	40%	18%	3%	0%	0%
APM12	04-lug	21,97	13,2	3%	16%	41%	32%	5%	1%	1%
PUM01	24-apr	22,49	16	2%	14%	46%	28%	7%	1%	2%
PUM02	26-apr	20,64	21,7	1%	16%	40%	29%	10%	2%	2%
PUM03	29-apr	18,66	22,2	0%	6%	43%	30%	14%	3%	4%
PUM04	03-mag	19,97	14,8	2%	17%	59%	16%	5%	1%	1%
PUM05	06-mag	20,58	17,8	2%	15%	49%	22%	9%	1%	1%
PUM06	28-giu	20,80	14	0%	7%	55%	27%	8%	1%	2%
PUM07	01-lug	20,52	13,5	1%	8%	55%	22%	11%	1%	1%
PUM08	03-lug	20,10	12,8	0%	8%	54%	27%	7%	1%	2%
PUM09	07-lug	19,88	15	2%	14%	59%	18%	6%	1%	1%
MCM01	07-lug	21,93	14,9	1%	7%	39%	31%	21%	1%	0%
MCM02	09-lug	21,54	16,5	1%	8%	38%	34%	16%	1%	1%
MCM03	12-lug	22,24	14,7	1%	7%	39%	31%	19%	1%	1%

Tabella 13: Periodo e il luogo (AP: Ascoli Piceno; PU: Isola del Piano; MC: Matelica) di produzione, il contenuto proteico, l'umidità e la granulometria dei campioni di polline multiflora analizzati.

### 9.5.3.3 Granulometria

Nella Tabella 13 è riportata inoltre anche la granulometria delle pallottole dei campioni di polline multiflorale. Tutti i campioni sono costituiti prevalentemente da pallottole che hanno una grandezza compresa tra 2400 e 2000  $\mu\text{m}$  (verde); possiamo però anche osservare che i campioni provenienti dall'apiario di Isola del Piano (PU), sono mediamente un po' più piccoli di quelli provenienti da Ascoli Piceno

nei quali troviamo anche una buona quantità di pallottole con una grandezza compresa tra 2800 e 2400  $\mu\text{m}$  (arancione). I campioni di Matelica (MC) sono infine mediamente i più piccoli in quanto in essi è presente anche una buona percentuale di pallottole comprese tra 1690  $\mu\text{m}$  e 1400  $\mu\text{m}$  (azzurro).

#### 9.5.3.4 *Umidità*

L'umidità dei campioni, determinata sui pollini, dopo aver subito il trattamento termico di disidratazione, mediante la termobilancia, è riportata in Tabella 13 e varia tra i diversi pollini dal 10.5% e al 22.2%. Il trattamento termico è stato eseguito a basse temperature, come descritto da altri ricercatori con lo scopo di evitare una perdita di nutrienti e di alterare l'alimento.

#### 9.5.3.5 *Colore*

In Tabella 14 sono riportate le coordinate CIELab ottenute dall'analisi delle pallottole di pollini multiflora interi (I) e macinati (M) per mezzo del colorimetro Minolta.

<b>CODICE</b>	<b>L (I)</b>	<b>a (I)</b>	<b>b (I)</b>	<b>L (M)</b>	<b>a (M)</b>	<b>b (M)</b>
APM01	57.44	6.89	37.65	62.53	7.51	51.84
APM02	61.53	5.81	43.31	64.28	7.18	48.18
APM03	57.70	4.79	34.96	62.31	5.11	41.56

APM04	59.57	6.04	40.15	64.81	7.02	52.46
APM05	60.45	5.95	47.35	62.70	7.45	53.91
APM06	62.01	6.42	49.60	61.61	7.76	52.54
APM07	60.36	8.19	51.90	60.97	10.98	61.92
APM08	57.29	9.30	43.66	60.48	14.78	68.13
APM09	60.83	6.91	41.77	64.04	10.20	61.03
APM10	61.82	6.44	43.46	66.64	6.92	53.26
APM11	65.13	5.96	52.58	68.28	7.11	58.83
APM12	66.78	4.95	52.08	69.18	6.90	58.36
PUM01	60.37	4.40	40.49	65.56	6.82	50.09
PUM02	58.18	7.60	41.26	63.42	8.41	48.07
PUM03	58.10	8.46	46.19	64.37	8.99	53.14
PUM04	60.71	6.19	46.86	64.31	9.22	53.61
PUM05	61.26	7.69	46.72	64.19	8.21	54.34
PUM06	50.49	7.96	32.96	57.71	11.20	44.80
PUM07	50.76	9.30	32.54	56.92	12.27	48.00
PUM08	51.82	9.17	35.07	57.77	11.29	47.83
PUM09	50.63	11.10	33.09	55.54	11.48	46.51
MCM01	47.36	8.38	31.03	53.16	11.06	47.65
MCM02	46.74	9.87	34.38	52.39	11.08	50.58
MCM03	49.73	8.30	31.44	53.70	12.49	51.35

Tabella 14: Coordinate CIELab delle pallottole dei 24 campioni di pollini multiflorali interi (I) e macinati (M) analizzati e suddivisi in funzione della provincia di origine (AP: Ascoli Piceno; PU: Pesaro Urbino; MC: Macerata).

Dall'analisi della Tabella 14 si può osservare che tutti i campioni di polline macinati (M) mostrano valori leggermente più elevati per le coordinate “a” e “b” rispetto ai corrispondenti interi (I). Questo sta ad indicare che la macinazione comporta una leggera variazione della tonalità infatti, durante la misura, abbiamo notato ad occhio nudo, che la colorazione dei pollini una volta macinati risultava essere più chiara e abbiamo attribuito questa variazione alla parte centrale del polline che infatti da quanto affermato dagli esperti pallinologi risulta essere più chiara di quella esterna che ha una colorazione più satura/intensa. La differenza di colorazione tra il polline intero e il macinato potrebbe essere anche dovuta al fatto che i pollini sono multiflorali quindi non sono omogenei pertanto nel momento in cui vengono schiacciati il colore tende a uniformarsi. Dai dati riportati in Tabella 14 si può anche osservare che i campioni di pollini provenienti dall'apiario situato a Matelica (MCM01-03) hanno i valori corrispondenti alla coordinata “L”, che rappresenta la luminosità, più bassi rispetto agli altri sia nelle pallottole macinate che in quelle intere.

#### 9.5.3.6 *Attività Antiossidante*

In Tabella 15 sono riportati i risultati relativi al contenuto totale in polifenoli determinato mediante il test FOLIN (TPC) e all'attività antiossidante testata mediante i saggi ABTS, DPPH e ORAC dei campioni di polline analizzati.

CODICE	FOLIN		ABTS		DPPH		ORAC	
	mmol GAE/g p. secco		mmol TxE/g p. secco		mmol TxE/g p. secco		mmol TxE/g p. secco	
APM01	0.110	± 0.009	0.195	± 0.020	0.054	± 0.009	0.760	± 0.086
APM02	0.090	± 0.008	0.177	± 0.017	0.039	± 0.008	0.618	± 0.062
APM03	0.090	± 0.008	0.188	± 0.017	0.030	± 0.007	0.702	± 0.062
APM04	0.093	± 0.009	0.183	± 0.020	0.047	± 0.007	0.560	± 0.059
APM05	0.092	± 0.006	0.181	± 0.018	0.061	± 0.006	0.704	± 0.078
APM06	0.113	± 0.010	0.193	± 0.019	0.056	± 0.010	0.784	± 0.047
APM07	0.107	± 0.014	0.189	± 0.017	0.079	± 0.010	0.653	± 0.085
APM08	0.091	± 0.007	0.152	± 0.014	0.072	± 0.012	0.476	± 0.057
APM09	0.127	± 0.009	0.193	± 0.016	0.102	± 0.009	0.608	± 0.055
APM10	0.130	± 0.009	0.205	± 0.014	0.110	± 0.007	0.717	± 0.062
APM11	0.151	± 0.010	0.234	± 0.016	0.143	± 0.008	0.773	± 0.094
APM12	0.165	± 0.011	0.258	± 0.016	0.147	± 0.010	0.802	± 0.117
PUM01	0.097	± 0.009	0.181	± 0.015	0.051	± 0.010	0.553	± 0.080
PUM02	0.122	± 0.012	0.212	± 0.021	0.070	± 0.008	0.670	± 0.079
PUM03	0.102	± 0.006	0.161	± 0.018	0.052	± 0.011	0.491	± 0.069
PUM04	0.086	± 0.009	0.152	± 0.013	0.049	± 0.008	0.464	± 0.066
PUM05	0.081	± 0.007	0.148	± 0.017	0.053	± 0.008	0.452	± 0.041
PUM06	0.074	± 0.006	0.124	± 0.010	0.044	± 0.005	0.360	± 0.042
PUM07	0.088	± 0.005	0.140	± 0.015	0.041	± 0.008	0.443	± 0.060
PUM08	0.086	± 0.008	0.146	± 0.018	0.041	± 0.006	0.453	± 0.040
PUM09	0.090	± 0.011	0.143	± 0.011	0.044	± 0.009	0.405	± 0.035
MCM01	0.068	± 0.005	0.119	± 0.018	0.049	± 0.009	0.328	± 0.035
MCM02	0.068	± 0.006	0.112	± 0.020	0.046	± 0.010	0.300	± 0.044
MCM03	0.075	± 0.007	0.128	± 0.018	0.054	± 0.009	0.339	± 0.063

Tabella 15: Contenuto totale in polifenoli (FOLIN) e attività antiossidante determinata mediante diversi test (ABTS, DPPH, ORAC) dei 24 campioni di pollini multiflorali analizzati e suddivisi in funzione della provincia di origine (AP: Ascoli Piceno; PU: Pesaro Urbino; MC: Macerata).

I risultati ottenuti nei test relativi all'attività antiossidante mostrano tutti delle correlazioni abbastanza elevate (Tabella 16) tranne che tra il test ORAC e DPPH dove la correlazione risulta non molto elevata ( $r = 0.5588$ ;  $p < 0.0045$ ) ma comunque significativa.

VARIABILE	VARIABILE	CORRELAZIONE	PROB. SIGNIF.
ABTS	FOLIN	0.9288	<.0001*
DPPH	FOLIN	0.8722	<.0001*
DPPH	ABTS	0.7261	<.0001*
ORAC	FOLIN	0.8039	<.0001*
ORAC	ABTS	0.9316	<.0001*
ORAC	DPPH	0.5588	0.0045*

Tabella 16: Matrice di correlazione e significatività dei risultati dei test per l'analisi dell'attività antiossidante (Folin, ABTS, DPPH, ORAC) dei campioni di pollini multiflorali.

Al fine di avere una visione semplificata dei dati ottenuti da tutte le analisi, i risultati sono stati analizzati suddividendoli per apiario di raccolta; per quanto riguarda la variazione della composizione pollinica dei campioni di polline nel tempo sono stati elaborati degli istogrammi in pila, per ogni apiario di raccolta, riportando solo le specie presenti con una percentuale  $\geq$  al 10 %.

### 9.5.3.7 Apiario Ascoli Piceno (AP)

I campioni di polline dell’apiario di Ascoli Piceno sono stati raccolti dal 21 aprile al 9 luglio 2015 (Figura 61) e possono essere raggruppati in tre periodi distinti: il primo che va da metà aprile ai primi di maggio vede protagonista il polline di Orniello (*Fraxinus ornus* – rosso), e a seguire quelli di Salice (verde), *Prunus* f. (blu scuro) e *Pyrus/Malus* f. (giallo); nel secondo (in maggio – giugno) i pollini più raccolti sono invece quelli del gruppo *Quercus ilex* gr. (azzurro), di *Vitis* (bordeaux), e di *Olea* (marrone); nell’ultimo infine, che inizia a metà giugno e termina i primi di luglio, è evidente una prevalenza dei pollini di Castagno (celeste chiaro) che aumentano col progredire della stagione.

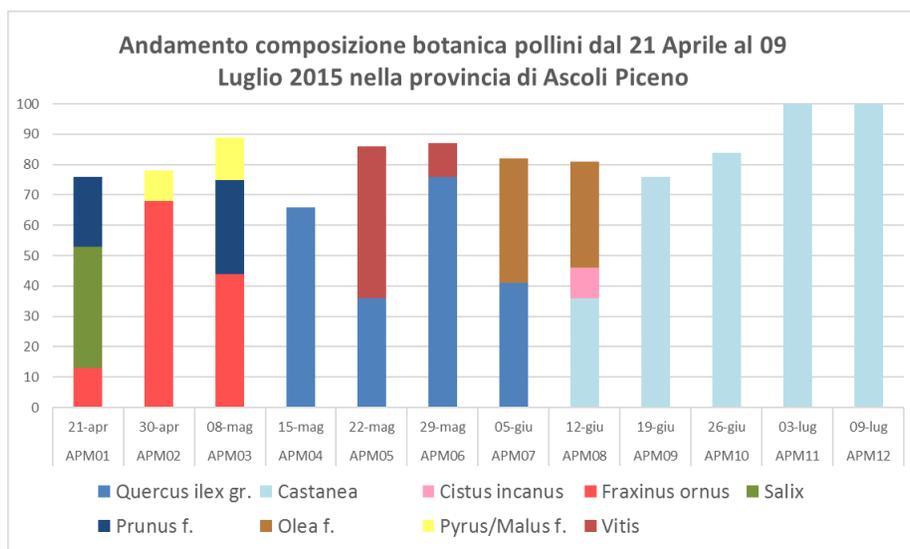


Figura 61: Andamento nel tempo della composizione di tipi pollinici raccolti da un apiario ad Ascoli Piceno (inclusi solo i tipi pollinici con presenza  $\geq 10\%$ ).

Per quanto riguarda l'analisi dell'attività antiossidante di questi campioni si riportano in sequenza gli istogrammi contenenti i risultati ottenuti nei test Folin, ABTS, DPPH e ORAC.

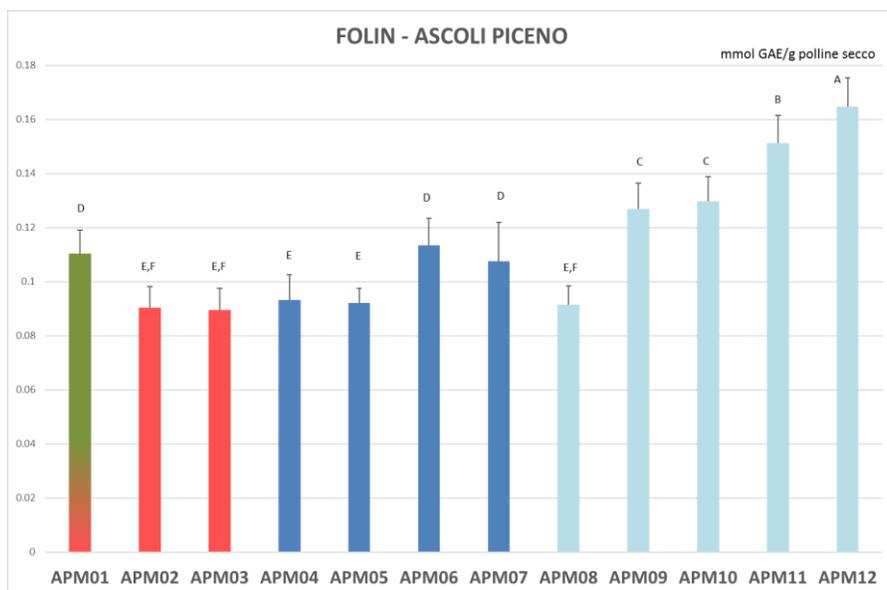


Figura 62: Contenuto in polifenoli totali (TPC) determinato mediante test FOLIN di campioni multiflorali provenienti dalla provincia di Ascoli Piceno (AP).

Nel grafico che descrive i dati ottenuti dalla determinazione del TPC (Figura 62), si evidenziano delle differenze significative tra i campioni raccolti dal 30 aprile al 22 maggio (APM02-05) e quelli raccolti prima e dopo questo periodo (APM01; APM06-07). Il contenuto totale in polifenoli dei pollini è medio alto per i campioni APM01-07 in quanto risultano abbastanza vicini al campione di Castagno più basso (APM08). I campioni di Castagno (APM08-12) mostrano un

incremento del contenuto totale fenolico di pari passo con la stagionalità, raggiungendo quindi i valori più elevati nei campioni raccolti nei primi giorni di luglio (APM11-12); il contenuto fenolico totale dei pollini di Castagno APM08-12 (da 0.091 a 0.165 mmol GAE/g) è paragonabile a quello ottenuto nel polline uniflorale (0.126 mmol GAE/g) CAU29. In maniera analoga, il contenuto fenolico totale dei campioni APM02-03 a prevalenza di Orniello è confrontabile con quello ottenuto nel campione di polline uniflorale di Orniello FRU32.

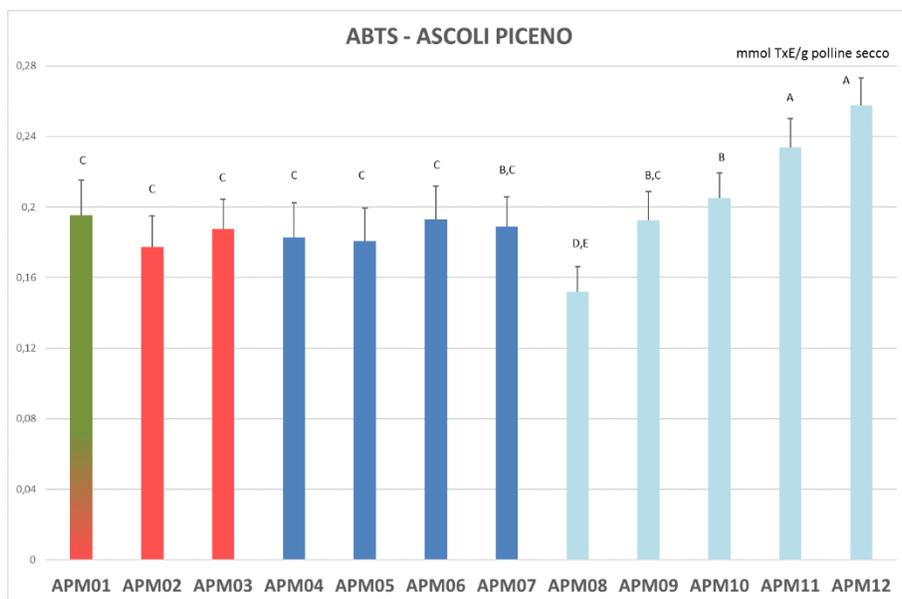


Figura 63: Contenuto in antiossidanti determinato mediante test ABTS di campioni multiflorali provenienti dalla provincia di Ascoli Piceno (AP).

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con il test ABTS (Figura 63) non si evidenziano delle differenze significative tra i campioni raccolti dalla

fine di aprile ai primi di luglio (APM01-07), che mostrano tutti valori molto elevati essendo molto simili alla maggior parte dei campioni di Castagno.

I campioni di Castagno (APM08-12) mostrano un incremento dell'attività antiossidante di pari passo con la stagionalità, raggiungendo i valori più elevati nei campioni raccolti nei primi giorni di luglio (APM11-12).

Anche in questo saggio l'attività antiossidante dei pollini di Castagno APM08-12 (0.152 e 0.258 mmol TxE/g) è paragonabile a quella ottenuta nel polline uniflorale (0.219 mmol TxE/g) CAU29.

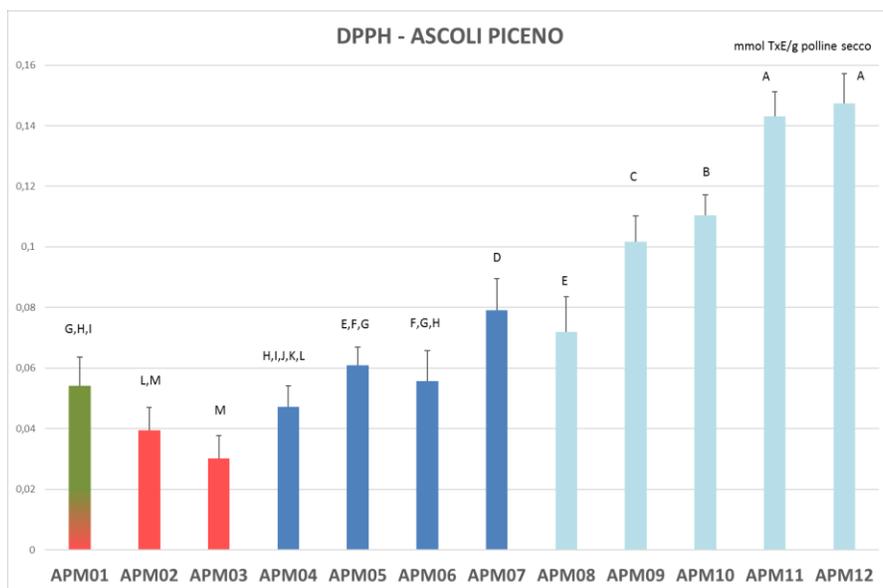


Figura 64: Contenuto in antiossidanti determinato mediante test DPPH di campioni multiflorali provenienti dalla provincia di Ascoli Piceno (AP).

Nel grafico in Figura 64 che riporta i risultati ottenuti dall'analisi dell'attività antiossidante mediante il test DPPH si evidenziano delle differenze significative, in termini di attività antiossidante (da 0.030 a 0.147 mmol TxE/g) tra i vari campioni di polline.

Per quanto riguarda, i campioni raccolti da fine aprile ai primi di maggio (APM01-03), l'attività antiossidante diminuisce all'avanzare della stagione; per questi tre campioni, considerando la loro composizione botanica, si può attribuire tale attività per lo più alla presenza di *Fraxinus ornus* e di *Salix*, mentre il contributo del *Prunus* f. può essere considerato molto minore per il fatto che il campione APM03 che contiene una discreta quantità di *Prunus* f. presenta una bassa attività. Inoltre confrontando anche i risultati ottenuti nei pollini uniflorali (Tabella 11) si vede come il polline di Orniello e ancor più i pollini di *Prunus* diano risultati minori in questo test rispetto ai precedenti e all'ORAC (Tabella 15). I campioni raccolti da metà maggio ai primi di giugno (APM04-07) vedono invece un incremento dell'attività antiossidante con la stagione; considerando la loro composizione botanica tale attività può essere per lo più attribuita alla presenza di *Olea* e *Vitis* e meno alla presenza di *Quercus ilex* gr.

Da metà giugno in poi, è interessante osservare infine come nei campioni (APM 08-12), l'attività antiossidante (0.072 – 0.147 mmol TxE/g) aumenti notevolmente con l'avanzare della stagione, di pari passo con l'incremento della percentuale di polline di Castagno e ciò fa supporre che tale specie botanica possa influenzare in modo importante

questa proprietà. Questo risultato è anche confermato da quello ottenuto nell'analisi dei pollini uniflorali che mostra che il polline uniflorale CAU29 di Castagno possiede una elevata attività antiossidante (0.132 mmol TxE/g).

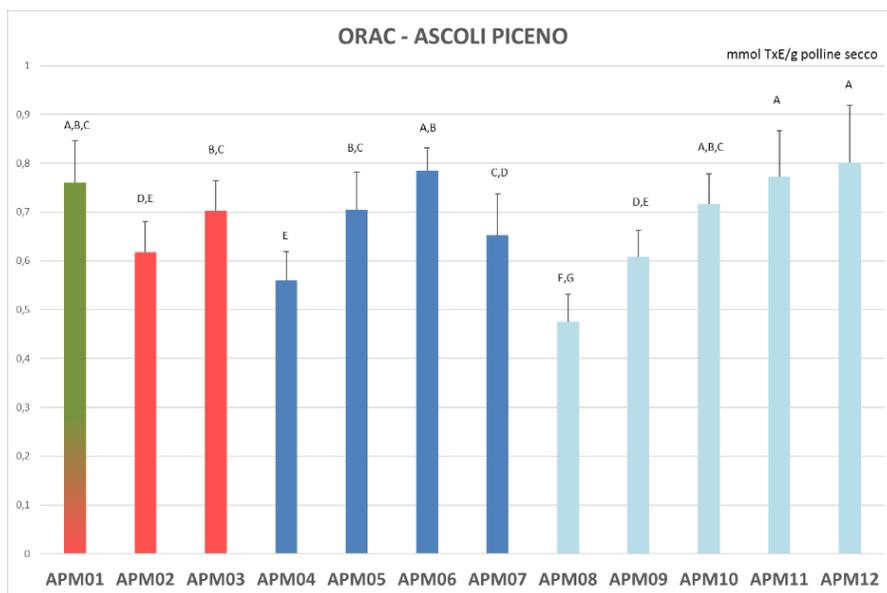


Figura 65: Contenuto in antiossidanti determinato mediante test ORAC di campioni multiflorali provenienti dalla provincia di Ascoli Piceno (AP).

Nella Figura 65 infine, relativa ai risultati ottenuti con il test ORAC possiamo osservare delle differenze nell'andamento dell'attività antiossidante rispetto a quanto osservato nel test DPPH. È evidente che i campioni raccolti dalle fine di aprile alla metà di giugno (APM01-07) danno delle risposte superiori, in questo test, in quanto simili a quelle

dei campioni di Castagno (APM08-12) che nel test precedente DPPH risultavano tra le più elevate.

Questi risultati sono confermati anche dalle analisi sui pollini del progetto uniflorale in quanto i campioni del progetto multiflorale APM02 e APM03 aventi un'alta percentuale di *Fraxinus ornus* (rispettivamente 68% e 44%) hanno dato in questo test valori superiori (rispettivamente 0.618 e 0.702 mmol TxE/g) rispetto al campione uniflorale FRU32 (0.445 mmol TxE/g) avente una percentuale di tale specie pollinica del 90%.

Questa diversità potrebbe essere attribuita alla presenza dei pollini di *Pyrus/Malus* f. e di *Prunus* f. (i pollini uniflorali di questo tipo PRU15-16 danno effettivamente una risposta molto elevata al test ORAC) che probabilmente contengono dei composti antiossidanti che reagiscono diversamente in questo test.

Per quanto riguarda il contenuto proteico (Figura 66; Tabella 13) questo risulta abbastanza variabile con la stagione (da 16.02% a 24.52%) e questo può essere correlato con la presenza nel polline in momenti diversi, di varie specie botaniche. Dal grafico si può inoltre notare come il contenuto proteico dei pollini APM08-12 aumenti in modo direttamente proporzionale alla quantità di polline di *Castanea* (castagno) in essi presente. Da questa osservazione possiamo dedurre che l'elevato contenuto proteico di questi pollini sia attribuibile a tale specie botanica.

Per quanto riguarda il polline di *Quercus ilex* non possiamo fare delle considerazioni in quanto non abbiamo questo tipo di polline tra i campioni del progetto uniflorale.

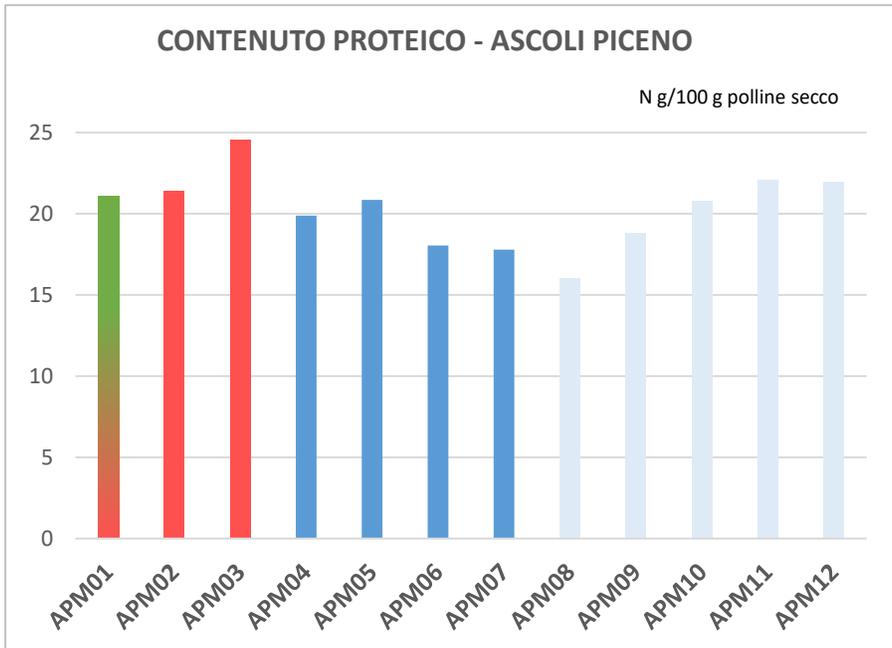


Figura 66: Contenuto proteico dei campioni di pollini della provincia di Ascoli Piceno.

### 9.5.3.8 Apiario Isola del Piano (PU)

I campioni di polline multiflora provenienti dall’apiario sito a Isola del Piano in provincia di Pesaro-Urbino sono stati raccolti dal 24 aprile al 07 luglio con una interruzione dal 06 maggio al 28 giugno 2015.

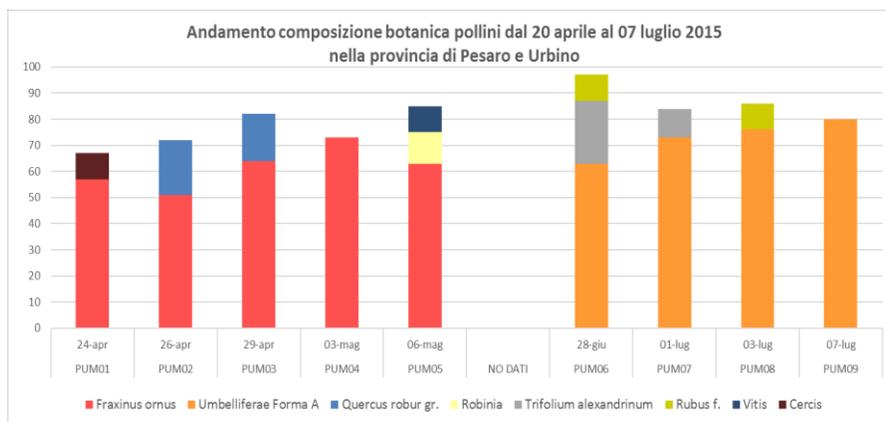


Figura 67: Variabilità stagionale della composizione dei pollini reperiti nella provincia di Pesaro e Urbino (inclusi solo i tipi pollinici con presenza  $\geq 10\%$ ).

I campioni, come si può osservare dal grafico in Figura 67, mostrano una maggior prevalenza di Orniello (*Fraxinus ornus* - rosso) nel mese di aprile e maggio. Altre specie abbastanza presenti in questo periodo sono inoltre quelle appartenenti ai gruppi pollinici del *Quercus robur* gr. (azzurro), di *Vitis* (blu), di *Cercis* (bordeaux) e di Robinia (giallo). Nel periodo che va dai primi giorni di maggio alla fine di giugno non sono stati raccolti campioni e quindi non è stato possibile monitorare la variazione in composizione pollinica.

Per quanto riguarda il periodo che va da fine giugno alla prima settimana di luglio, esso è caratterizzato principalmente dalla presenza di polline di Umbelliferae forma A (arancio - presumibilmente coriandolo e/o carota). In questa epoca sono stati raccolti anche pollini di Trifoglio alessandrino (grigio) e *Rubus* f. (verde acido - probabilmente rovo comune). Da notare nella Tabella 12 la presenza di altri innumerevoli tipi di pollini raccolti dalle api, anche se in misura più marginale.

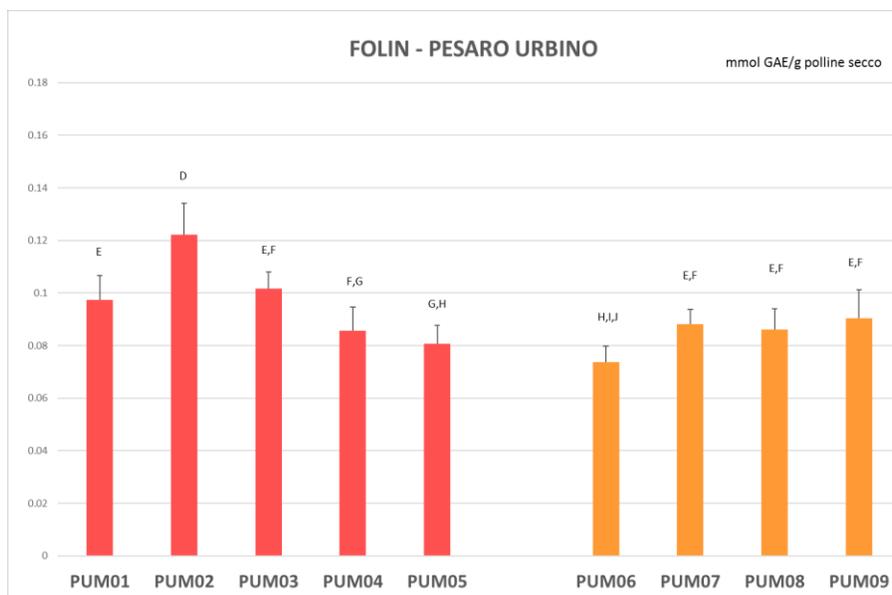


Figura 68: Contenuto in polifenoli totali testato mediante test FOLIN e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Pesaro e Urbino (PU).

Per quanto riguarda il contenuto fenolico totale (Figura 68) i campioni raccolti dal 24 aprile al 6 maggio, che contengono una prevalenza di Orniello, mostrano un contenuto fenolico leggermente maggiore di quelli raccolti dal 28 giugno al 7 luglio a prevalenza di Coriandolo nonostante le differenze non siano significative. Da evidenziare il contenuto fenolico significativamente maggiore rispetto a tutti gli altri per il campione PUM02 nonostante il suo contenuto di polline di Orniello non sia il maggiore. Questo campione contiene però anche una notevole quantità di polline di *Quercus robur* gr. che probabilmente contribuisce in modo importante al contenuto fenolico.

Il contenuto fenolico totale dei campioni di Orniello (PUM01-05) e di Coriandolo (PUM06-09) è confrontabile con quello ottenuto nei rispettivi campioni di polline uniflorale (FRU32 e COU20-24). Nel dettaglio, per il contenuto in polifenoli totali dei campioni di Orniello multiflorali abbiamo valori compresi tra 0.081 e 0.122 mmol GAE/g mentre nel campione uniflorale è pari a 0.090 mmol GAE/g; i campioni di Coriandolo, invece, danno valori per i multiflorali (PUM06-09) da 0.074 a 0.090 mmol GAE/g leggermente inferiori rispetto agli uniflorali COU20-24 (da 0.095 a 0.116 mmol GAE/g). I risultati probabilmente risentono della diversa percentuale pollinica di polline di Umbelliferae che nei multiflorali varia dal 63% al 80% mentre nell'uniflorale è in tutti i campioni pari al 100%.

Dal confronto dei campioni di questo apiario con quelli dell'apiario di Ascoli Piceno, possiamo osservare inoltre che il contenuto in polifenoli

totali dei pollini, avente una percentuale pressoché analoga di *Fraxinus ornus*, raccolti nei due diversi apiari (PUM03-04: 0.081 – 0.102 mmol GAE/g; APM02: 0.090 mmol GAE/g) non mostra differenze significative. Quindi per quanto riguarda il contenuto in polifenoli, esso sembra non essere influenzato dalla zona geografica di raccolta dei campioni di polline.

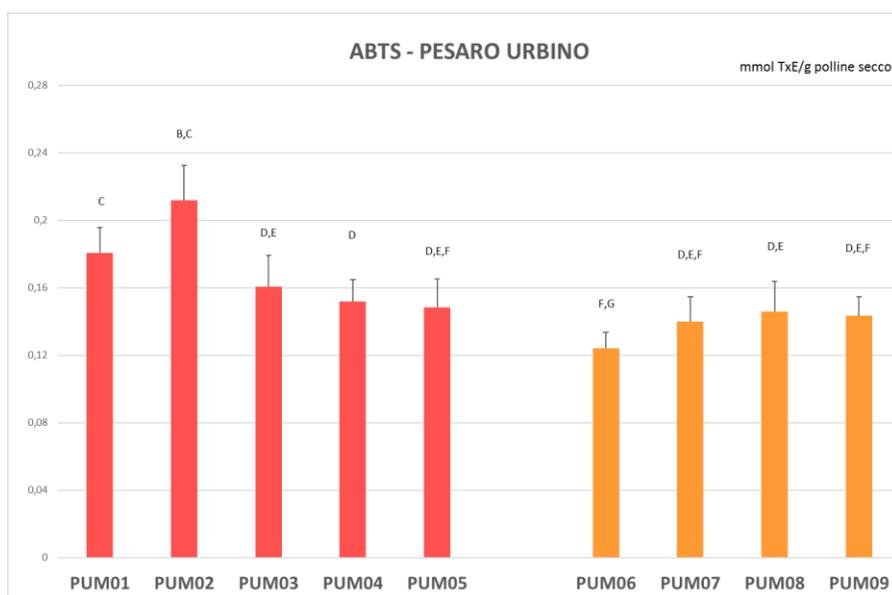


Figura 69: Attività antiossidante testata mediante test ABTS e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Pesaro e Urbino (PU).

Per quanto riguarda l'andamento dell'attività antiossidante saggiata mediante test ABTS (Figura 69) è analogo a quello ottenuto nel test Folin con il campione PUM02 che mostra i valori più elevati.

Anche in questo test, l'attività antiossidante dei campioni di polline di Orniello e di Coriandolo è confrontabile a quella ottenuta nei campioni di polline uniflorale. Nel dettaglio, per i campioni di Orniello multiflorali i valori sono compresi tra 0.148 e 0.212 mmol TxE/g mentre nel campione uniflorale l'attività antiossidante è pari a 0.128 mmol TxE/g; anche i campioni di Coriandolo danno valori per i multiflorali (PUM06-09) da 0.124 a 0.146 mmol TxE/g, simili a quelli degli uniflorali COU20-24 (0.119 a 0.134 mmol TxE/g). In questo test sembra che i risultati non risentano della diversa percentuale pollinica della stessa specie.

Dal confronto dei campioni dei due apiari, possiamo osservare che in generale i pollini dell'apiario di Isola del Piano hanno un'attività antiossidante tendenzialmente più bassa rispetto a quelli raccolti nella provincia di Ascoli Piceno. In particolare l'attività antiossidante dei pollini, a prevalenza di *Fraxinus ornus*, provenienti dall'apiario di Isola del Piano (PUM03-05) è significativamente inferiore (0.148 – 0.161 mmol TxE/g) a quella misurata per il polline (APM02) proveniente dall'apiario di Ascoli Piceno (0.177 mmol TxE/g), nonostante la prevalenza pollinica sia simile. Questi risultati lasciano pensare che l'origine geografica oltre che la vegetazione possa influenzare l'attività antiossidante dei pollini d'ape monitorata attraverso il test ABTS.

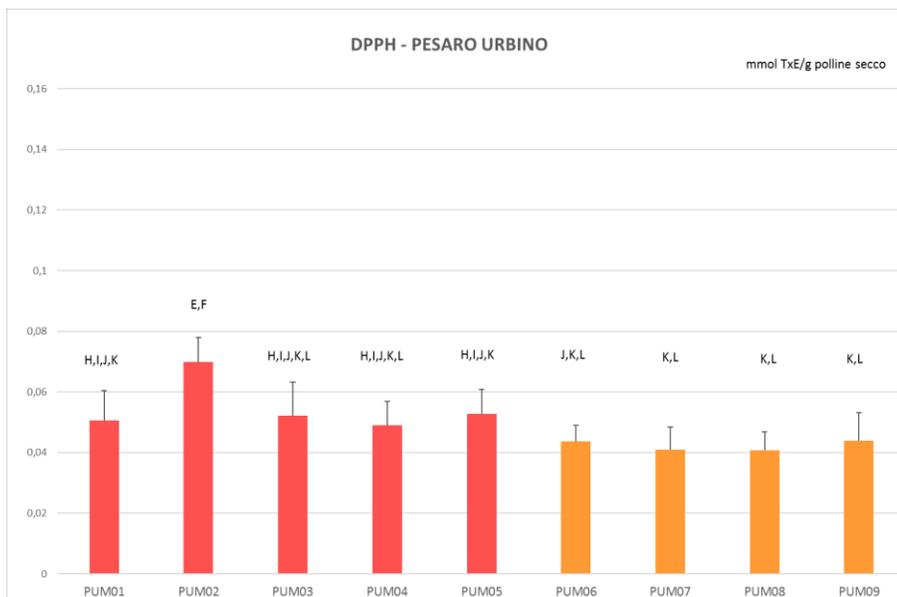


Figura 70: Attività antiossidante testata mediante test DPPH e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Pesaro e Urbino (PU).

Per quanto riguarda il test DPPH, tra i campioni (PUM01-09) non si evidenziano (Figura 70) differenze significative (ad eccezione del campione PUM02 che mostra valori superiori agli altri) in termini di attività antiossidante (0.041-0.070 mmol TxE/g).

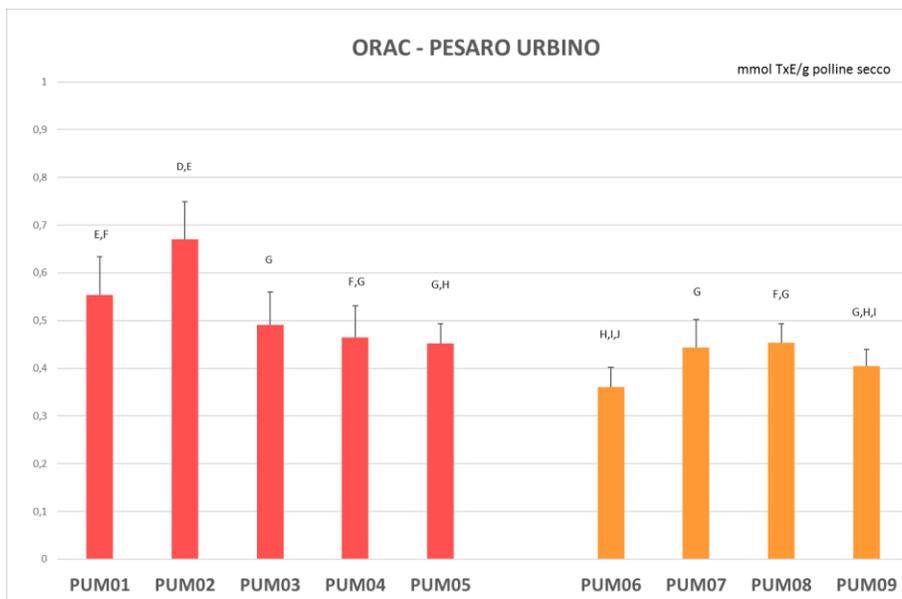


Figura 71: Attività antiossidante testata mediante test ORAC e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Pesaro e Urbino (PU).

Per quanto riguarda il test ORAC (Figura 71) l'andamento è pressoché analogo a quello ottenuto negli altri test, con valori di attività antiossidante compresi tra 0.360 e 0.670 mmol TxE/g e differenze significative per i campioni PUM01 e PUM02.

Osservando inoltre i risultati di alcuni campioni, possiamo notare anche in questo caso, dei valori abbastanza paragonabili a quelli ottenuti dai pollini della stessa specie del progetto uniflorale. In particolare il polline di Orniello PUM04 con una percentuale pollinica del 73% ha un'attività antiossidante (0.464 mmol TxE/g) analoga al campione di polline uniflorale FRU32 (0.445 mmol TxE/g) avente una percentuale pollinica del 90%; i pollini multiflorali (PUM06-PUM09) con una

prevalenza pollinica di Umbellifere che va dal 63% al 80% hanno un'attività antiossidante paragonabile, anche se leggermente inferiore (da 0.360 e 0.453 mmol TxE/g), a quella ottenuta dai pollini uniflorali al 100% di Coriandolo (da 0.505 a 0.618 mmol TxE/g).

In questo test si può inoltre notare una differenza in attività antiossidante dei campioni con un'elevata percentuale pollinica di *Fraxinus ornus*, raccolti nell'apiario (PUM01-05) di Isola del Piano (PU) e in quello di Ascoli Piceno (APM02-03) che potrebbero essere attribuite all'origine geografica. In particolare confrontando i campioni dei due apiari aventi pressoché la stessa percentuale pollinica di *Fraxinus ornus* e quindi il campione APM02 (68%) con i campioni PUM03 (64%), PUM04 (73%) e PUM05 (63%) si può osservare che questi ultimi mostrano un'attività antiossidante significativamente inferiore (0.452 – 0.491 mmol TxE/g) a quello di Ascoli Piceno (0.618 mmol TxE/g). Purtroppo il limitato numero di campioni della stessa origine botanica provenienti dalle due provincie non ci permette di fare considerazioni più dettagliate.

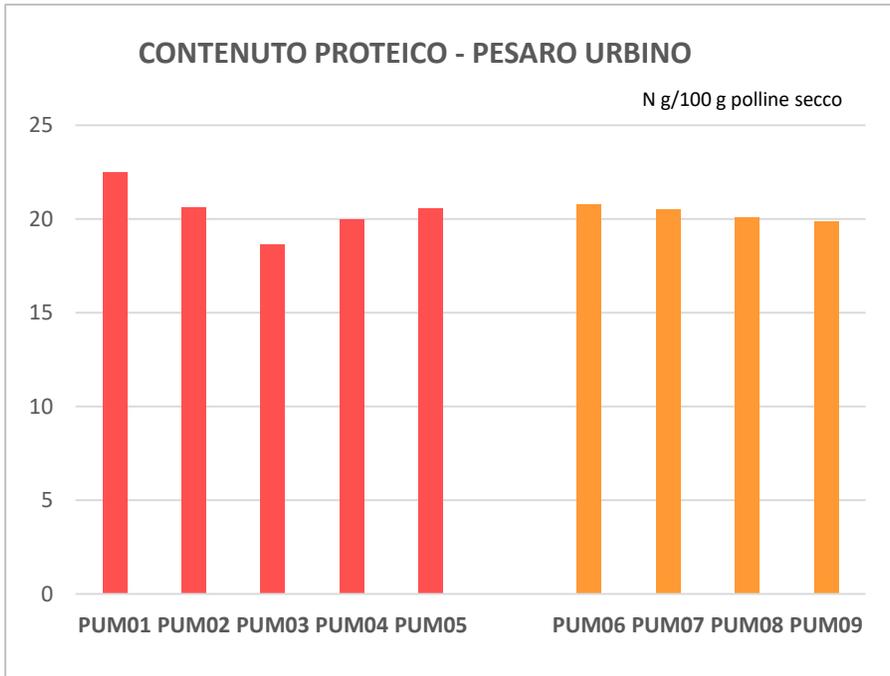


Figura 72: Contenuto proteico dei campioni di polline multiflora della provincia di Pesaro e Urbino.

Il contenuto proteico (Figura 72) dei campioni raccolti a Isola del Piano dalla fine di aprile ai primi di maggio (PUM01-05) e composti prevalentemente da polline di *Fraxinus ornus* è abbastanza variabile (dal 18.7% al 22.5%) mentre quelli raccolti dalla fine di giugno ai primi di luglio a prevalenza di Umbellifere (PUM06-PUM09) sono molto simili con un contenuto proteico compreso tra il 19.9% e il 20.8%.

Il contenuto proteico dei pollini sia di *Fraxinus ornus* (PUM01-05) con una prevalenza pollinica che varia dal 51% al 73%, sia dei campioni multiflorali di Umbellifere (probabilmente coriandolo e/o carota) nei quali la prevalenza del tipo pollinico principale varia dal 63% al 80%,

risulta invece leggermente inferiore ai rispettivi campioni uniflorali FRU32 (23.1%) e COU20 (22.5%).

#### 9.5.3.9 *Apiario Matelica (MC)*

Per quanto riguarda l'apiario di Matelica in provincia di Macerata (Figura 73), non possiamo descrivere un vero e proprio andamento della composizione pollinica in quanto i tre campioni pervenuti riguardano un periodo di soli cinque giorni. Tuttavia possiamo affermare che nei primi giorni di luglio del 2015, nella zona di interesse, le specie prevalenti sono state il Trifoglio alessandrino (grigio), il *Rubus* f. (giallo-verde) e l'*Onobrychis* (fuxia) (Figura 73).

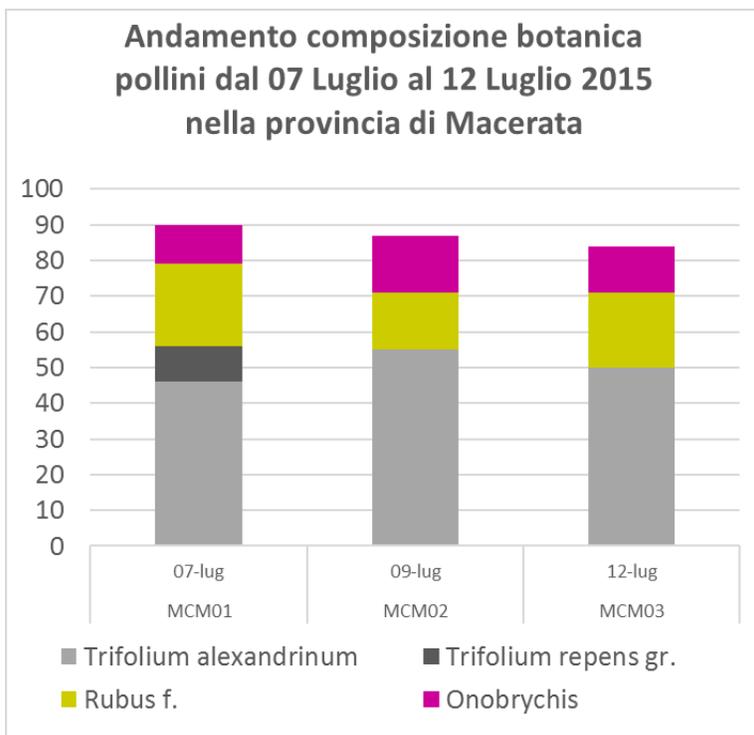


Figura 73: Andamento della composizione dei pollini reperiti a Matelica nella prima metà di luglio (inclusi solo i tipi pollinici con presenza  $\geq 10\%$ ).

Anche se questi ultimi campioni non ci hanno permesso di estrapolare molte informazioni per quanto riguarda l'andamento della raccolta, i dati sono stati comunque utili come confronto con i pollini uniflorali essendo tutti a forte prevalenza di una specie botanica, il trifoglio alessandrino.

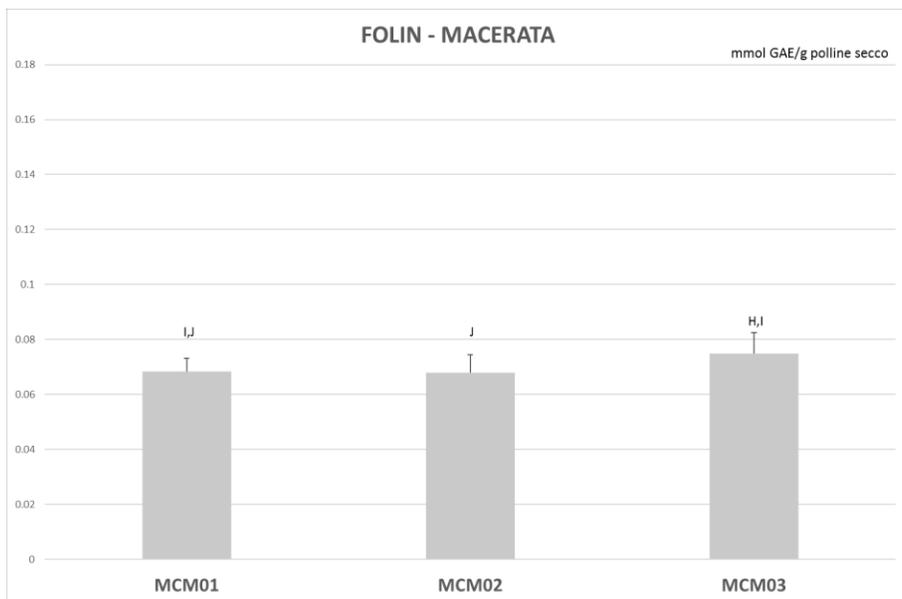


Figura 74: Contenuto in polifenoli totali testato mediante test FOLIN e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Macerata (MC).

L'analisi con il test Folin (Figura 74) dei tre campioni provenienti dall'apiario di Matelica (MC) caratterizzati da una percentuale di Trifoglio alessandrino rispettivamente del 46%, 55% e 50%, mostra che tra di loro non ci sono delle differenze significative in termini di contenuto fenolico totale. Dal grafico è inoltre possibile osservare che tali campioni hanno un contenuto in polifenoli totali significativamente più basso (0.068 a 0.075 mmol GAE/g) rispetto a quasi tutti i campioni raccolti negli altri due apiari in accordo con il fatto che i pollini sono composti per la maggior parte da polline di Trifoglio che anche nei

campioni uniflorali (TRU05-TRU11) mostra valori comparabili e abbastanza modesti (0.053 a 0.062 mmol GAE/g).

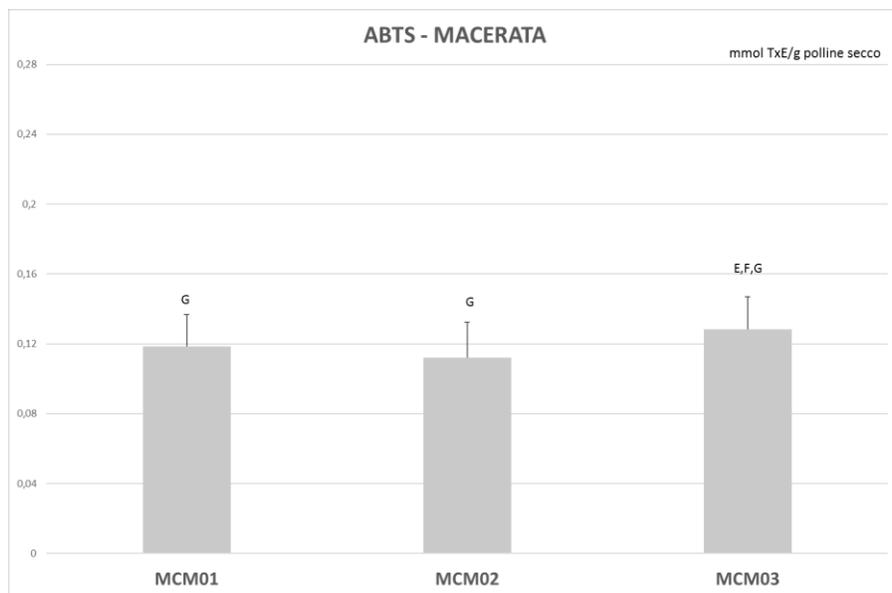


Figura 75: Attività antiossidante testata mediante test ABTS e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Macerata (MC).

Prendendo in considerazione i risultati ottenuti con il test ABTS (Figura 75) anche questi non mostrano delle differenze significative in termini di attività antiossidante.

Anche in questo caso i valori ottenuti sono significativamente minori (da 0.112 a 0.128 mmol TxE/g) di quelli ottenuti dai campioni degli altri apiari a causa principalmente alla diversa composizione botanica dei campioni.

A differenza del test Folin, nell'ABTS i risultati di questi campioni (% pollinica di trifoglio dal 46% al 55%) non sono però molto confrontabili con quelli ottenuti dai pollini uniflorali analoghi (TRU05-TRU11) che mostrano valori più bassi (da 0.069 a 0.084 mmol TxE/g) nonostante mostrino una prevalenza di polline di Trifoglio maggiore (dal 59% al 100%). Queste piccole differenze potrebbero essere attribuite alla presenza nei campioni eteroflora di tipi pollinici secondari (*Rubus* f. e *Onobrychis*).

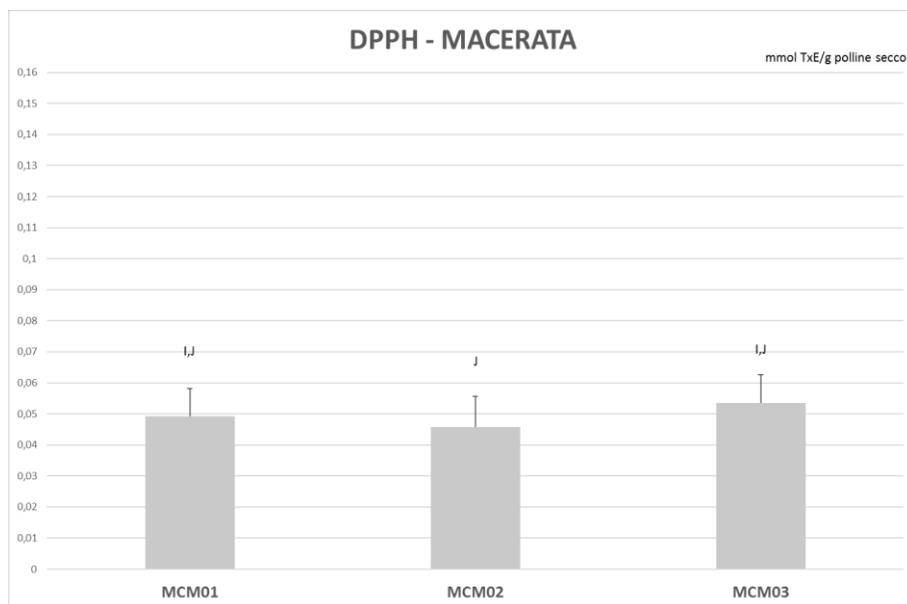


Figura 76: Attività antiossidante testata mediante test DPPH e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Macerata (MC).

Per quanto riguarda il test DPPH (Figura 76), i tre campioni mostrano un'attività antiossidante (da 0.046 a 0.054 mmol TxE/g) simile a quella misurata per il campione di polline uniflorale TRU06 (0.052 mmol TxE/g) contenente una percentuale analoga di polline di Trifoglio (59%).

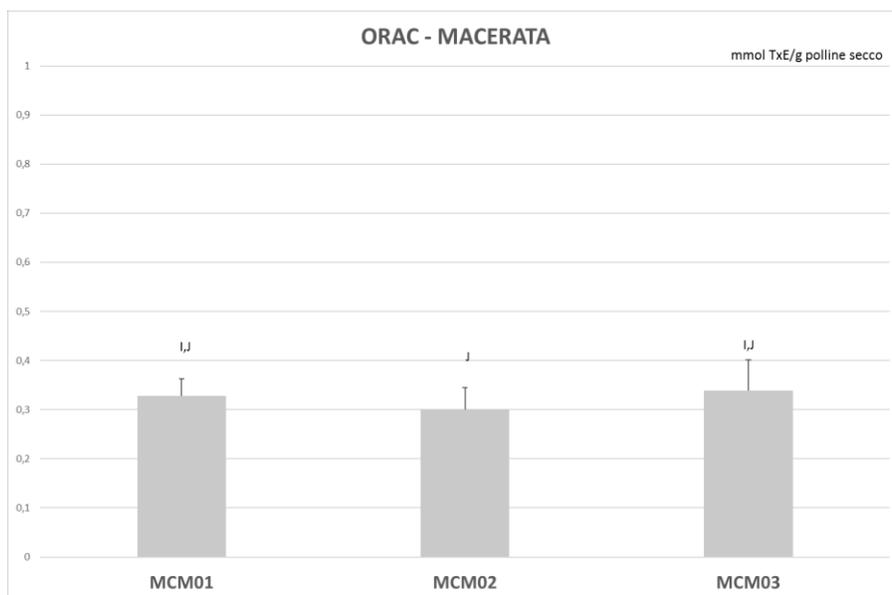


Figura 77: Attività antiossidante testata mediante test ORAC e significatività di campioni di polline multiflora provenienti dalla provincia di Macerata (MC).

Come nel test DPPH, i campioni non mostrano delle differenze significative in termini di attività antiossidante saggiata mediante test ORAC (Figura 77). Anche in questo caso, come nel test ABTS, questi campioni multiflorali caratterizzati da una % pollinica di Trifoglio

variabile dal 46% al 55% hanno dato dei risultati leggermente maggiori (0.300 a 0.339 mmol TxE/g) rispetto ai pollini uniflorali (0.202 a 0.247 mmol TxE/g) caratterizzati da una percentuale pollinica di Trifoglio dal 59% al 100%.

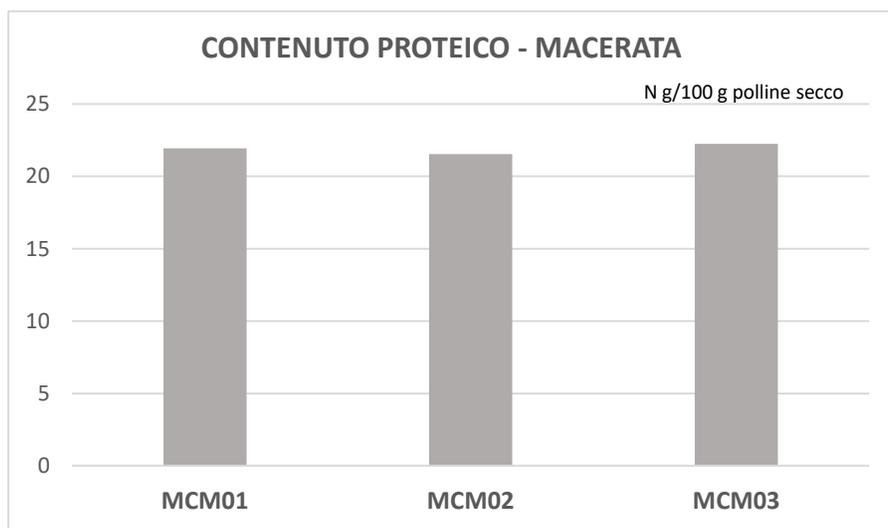


Figura 78: Contenuto proteico dei campioni di pollini della provincia di Macerata.

Questi pollini, costituiti principalmente dal polline di *Trifolium alexandrinum*, mostrano un contenuto proteico (Figura 78 e Tabella 13) simile (dal 21.54% al 22.24%) ma inferiore a quello ottenuto dall'analisi del campione uniflorale TRU07 pari al 26.99%. Questa differenza potrebbe essere attribuita alla minore percentuale pollinica di Trifoglio in questi campioni (da 46% al 50% contro il 90%).

I risultati ottenuti dall'analisi dei pollini provenienti dagli apiari situati nelle diverse provincie delle Marche ci hanno permesso di incrementare le conoscenze sulla flora locale e di verificare il periodo fioritura delle diverse specie botaniche in tali zone. I risultati ottenuti possono costituire un valido aiuto per gli apicoltori per incrementare le conoscenze sulla biodiversità vegetale locale ed utilizzare tali informazioni per la programmazione dell'istallazione delle trappole per la raccolta delle pallottole di polline.

## **9.6 ANALISI MULTIVARIATA DI POLLINI UNIFLORALI E MULTIFLORALI PER MEZZO DELL'ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI (PCA).**

I risultati delle analisi (TPC, ABTS, DPPH, ORAC e dati L, a, b relativi al colore dei pollini interi) effettuate sui 32 campioni di polline uniflorali e su 14 di quelli multiflora scelti in base alla maggior percentuale di tipo pollinico dominate ( $> 63\%$ ) sono stati elaborati mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA) per cercare di semplificare la struttura dei dati in modo da classificare i pollini in base alla loro origine floreale. Tale analisi ha portato all'ottenimento di un sistema semplificato descritto da due componenti principali significative, che mostrano un autovalore  $> 1$  e che spiegano il 72.72% della variabilità totale del sistema. La Tabella 17 mostra la varianza spiegata e gli autovalori per queste due componenti principali. La prima componente principale PC1 (50.43%) contiene tutte le informazioni descritte dall'analisi dell'attività antiossidante misurata con i diversi test. Per quanto riguarda la seconda componente PC2 (22.30%) essa contiene invece le informazioni relative al colore misurato con le coordinate CIELab.

	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>
Autovalore	3.530	1.561
Variabilità (%)	50.426	22.297
% cumulata	50.426	72.722
<hr/>		
Folin	0.492	-0.097
ABTS	0.512	-0.017
DPPH	0.357	-0.110
ORAC	0.464	-0.087
L	0.273	0.580
a	-0.254	0.403
b	0.117	0.687

Tabella 17: Autovalori, autovettori, varianza spiegata e cumulata delle prime due componenti principali.

L'analisi dei diagrammi dei pesi fattoriali (in alto) e di dispersione (in basso) delle prime due componenti, mostrati in Figura 79, mostra che i pollini di differente origine botanica, vengono ben differenziati nello spazio prodotto dalle due coordinate trovate mediante tale analisi.

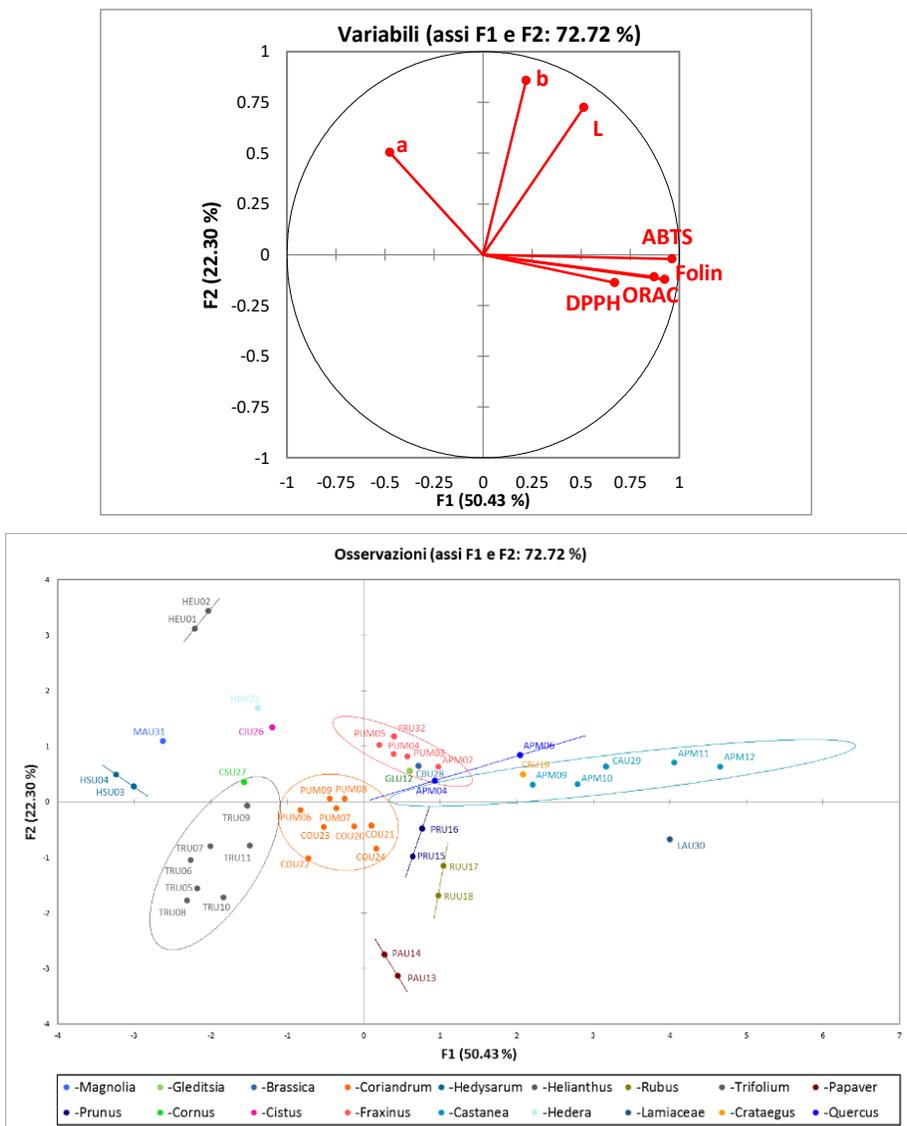


Figura 79: Analisi delle componenti principali di 32 pollini uniflorali e 14 multiflorali (percentuale del tipo pollinico dominate > 63%). Diagramma dei pesi fattoriali (in alto) e di dispersione (in basso) delle prime due componenti ottenute dall'elaborazioni delle variabili: FOLIN, ABTS, DPPH, ORAC, colore CIELab (a, b, L).

I campioni più numerosi formano, infatti, quattro gruppi abbastanza distinti che contengono i pollini di Castagno (azzurro-verde: CAU29 e APM09-12; a dx al centro), di Orniello (rosso: FRU32, PUM03-05 e APM02; al centro in alto), di Coriandolo (arancio: COU20-24 e PUM06-08; al centro) e di Trifoglio (grigio: TRU05-11; a sx in basso). Sono inoltre ben separati dagli altri e vicini tra di loro anche i pollini a prevalenza di Girasole (grigio scuro: HEU01-02; a sx in alto), di Sulla (azzurro: HSU03-04; a sx al centro), di Papavero (bordeaux: PAU13-14; al centro in basso), di *Prunus* f. (blu: PRU15-16; al centro), di Rovo (verde-bruno: RUU17-18; al centro) e di *Quercus ilex* gr. (azzurro scuro: APM04 e 06; a destra al centro) di cui abbiamo solo due campioni per tipo.

Mettendo in relazione le coordinate del grafico (Figura 79) con le proprietà antiossidanti possiamo vedere che i pollini uniflorali di Castagno (CAU), Labiatae forma L (LAU), Biancospino comune (CRU) e quelli multiflorali a prevalenza di *Quercus ilex* gr. (APM04 e 06) sono caratterizzati da un elevato contenuto di antiossidanti e si trovano nella parte a destra del grafico (Figura 79), mentre i pollini di Magnolia (MAU) e di Sulla (HSU) sono quelli con contenuto più basso di antiossidanti e sono localizzati nella parte estrema di sinistra. Sull'ordinata, che riporta i valori della seconda coordinata principale, è invece possibile differenziare i campioni che mostrano una colorazione diversa dal beige/giallo, tipica della maggior parte delle pallottole di polline: questo in quanto tale componente spiega le variabili associate

alle coordinate CIELab. Molto isolati dagli altri troviamo infatti i campioni che hanno una colorazione particolare: nella parte superiore del grafico, quelli a prevalenza di Girasole (HEU) con colorazione delle pallottole di polline arancio vivo e nella zona estrema in basso quelli di polline di Papavero (PAU13-14), le cui pallottole hanno una colorazione verde scura e/o verde marrone. Anche i pollini di Trifoglio (TRU) e di Rovo (RUU), rispettivamente con una colorazione ocracarrone e verdastra inoltre si dispongono nella parte medio inferiore del grafico.

### ***9.6.1 Conclusioni***

In questo studio sui pollini d'ape sono stati analizzati 32 campioni di polline uniflorale e 24 multiflora, prodotti nella regione Marche, studiandone alcune proprietà chimico-fisiche, le proprietà antiossidanti e caratterizzandoli dal punto di vista del colore e della granulometria. Lo studio ha portato alla catalogazione di 18 diversi tipi di polline contenenti una elevata percentuale di tipo pollinico dominante, e alla loro differenziazione attraverso l'analisi multivariata delle proprietà studiate.

L'analisi multivariata delle variabili che descrivono l'attività antiossidante, il contenuto fenolico e il colore, effettuata con il metodo delle componenti principali, ha infatti permesso la differenziazione dell'origine botanica dei campioni di polline, con un raggruppamento

evidente dei tipi di polline costituiti da un maggior numero di campioni, vale a dire Castagno, Orniello, Coriandolo e Trifoglio.

La possibilità di raggruppare molti dei campioni di pollini a prevalenza floreale in cluster separati dimostra che le proprietà antiossidanti e il colore contengono le informazioni utili per la classificazione dei campioni.

Tutto ciò è una evidenza che l'origine floreale del polline ne determina le proprietà antiossidanti attraverso la migrazione dal fiore alla matrice alimentare di diverse componenti fitochimiche che quindi ne caratterizzano le proprietà.

Il metodo utilizzato e i risultati ottenuti confermano inoltre la validità dell'analisi dell'attività antiossidante e del colore come strumento per la caratterizzazione e la classificazione di polline con tecniche strumentali facili ed a basso costo, che richiedono tempi brevi e possono essere utilizzati in analisi di routine.

L'analisi della variazione nel tempo delle proprietà dei pollini, provenienti da varie aree geografiche delle Marche, ha permesso infine di effettuare uno screening della composizione floreale di pollini provenienti da diversi apiari e raccolti in periodi differenti; tale caratterizzazione unita a quella dei pollini uniflorali marchigiani, risulta utile per promuovere la produzione e il consumo di questo prodotto apicolo.

Per caratterizzare ulteriormente i pollini in base alla specie botanica ed eventualmente trovare dei marker tipici di ognuna di tali specie, è stato programmato da tempo di determinare il profilo fenolico degli estratti etanolici dei nostri campioni di polline uniflorale mediante HPLC-MS, ma non è stato ancora possibile effettuare tali analisi.

Lo studio potrebbe inoltre continuare ulteriormente ed ampliarsi con la caratterizzazione di pollini di altre specie botaniche e l'analisi di altri parametri per la descrizione di tale matrice alimentare.

I risultati di questo progetto in conclusione, potrebbero risultare estremamente utili per la promozione della produzione di polline d'ape da parte degli apicoltori, per la diffusione di questo alimento a tutt'oggi quasi sconosciuto tra i consumatori, e per l'approfondimento delle conoscenze sulla biodiversità vegetale e sulle caratteristiche che differenziano i pollini uniflorali, ponendo l'accento anche sui valori nutrizionali in termini di attività antiossidante di tale alimento.

# 10 IL TÈ

## 10.1 INTRODUZIONE

Il tè è una delle bevande più consumate al mondo, seconda solo all'acqua (da Silveira T. F. F. et al., 2014); è diffusa per l'aroma, il gusto e per i suoi effetti benefici. Questa bevanda viene preparata macerando le foglie della *Camellia sinensis* L. (famiglia Theaceae) che è un arbusto perenne e sempreverde che cresce nelle regioni tropicali e sub-tropicali, che hanno un clima caldo e umido e con abbondanti piogge. Le caratteristiche e la qualità delle foglie di tè e di conseguenza dei suoi estratti dipendono da molti fattori quali le condizioni ambientali (umidità, esposizione, altitudine e composizione del terreno), il tipo di foglie e/o di germogli raccolti (età, numero, raccolta meccanica o manuale), le tecniche di lavorazione (il grado di fermentazione, che porta all'ottenimento del tè bianco, verde o nero; il grado del tè, che nella cultura cinese e giapponese è un indice di qualità), e infine i metodi di infusione (Alipoor B. et al., 2012; Jayaganesh S. et al., 2010; Jayasekera S. et al., 2014; Lee J. et al., 2009). Tutti questi fattori influenzano anche gli effetti benefici che ha il tè sulla salute che sono strettamente correlati al suo contenuto in fitochimici, come ad esempio flavonoidi (flavan-3-oli, flavonoli e proantocianidine), polifenoli (teaflavine e tearubigine), acidi fenolici (acido gallico), aminoacidi non proteici (acido gamma-aminobutirrico, L-teanina), alcaloidi (metilxantine) e poliammine (spermidina e spermina) (Da Silva Pinto

M., 2013). Molti studi correlano la presenza di questi composti alle proprietà benefiche sulla salute di questa bevanda, come gli effetti cardioprotettivi, anti-infiammatori, antidiabetici e anti-obesità, e le attività antitumorali, antimutageniche, antiosteoporosi, antimicrobiche e neuroprotettive (Chacko S. et al., 2010; Sharangi A. B., 2009).

## **10.2 INFLUENZA DELLE CONDIZIONI DI INFUSIONE (TEMPO, TEMPERATURA E DIMENSIONE) SULLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI E LE CARATTERISTICHE SENSORIALI DI ALCUNI TÈ BIANCHI E VERDI**

(Castiglioni S. et al., 2015)

Gli studi sugli effetti benefici del tè hanno spinto diversi autori a studiare come i metodi di infusione influenzano la migrazione delle sostanze fitochimiche nella bevanda (Komes D. et al., 2010; Ramalho S. A. et al., 2013; Sari F. et al., 2011; Yang D. J. et al., 2007) e la sua attività antiossidante (Damiani E. et al., 2014.; Lin S. D. et al., 2008; Venditti E. et al., 2010) arrivando a diverse conclusioni, anche se in letteratura non sono presenti studi che prendono in esame le tecniche comunemente utilizzate dalle persone per preparare il tè. In genere tali tecniche prevedono che il tè bianco sia tenuto in infusione per pochi minuti a 70°C mentre per il tè verde è consigliata una temperatura di 90°C; inoltre un metodo molto popolare, soprattutto durante l'estate, in Estremo Oriente, in particolare a Taiwan (Yang D. J. et al., 2007) prevede la macerazione delle foglie di tè in acqua a temperatura ambiente e per più tempo ed ora tale metodo sta diventando popolare anche negli Stati Uniti (McGee H., 2011).

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che la temperatura elevata può causare una perdita di composti bioattivi quali le catechine (Cheong W. J. et al., 2005). In uno studio precedente, abbiamo osservato che l'estrazione a freddo (25°C per 120 minuti), rispetto alla tradizionale macerazione in acqua calda, non diminuisce l'AA degli infusi di tè ma al contrario, in alcuni casi, la incrementa. L'estrazione di diversi tè commerciali eseguita a caldo (90°C per 7 minuti) o a freddo (temperatura ambiente per 120 minuti), ha portato infatti all'ottenimento di infusi con un contenuto in polifenoli totali superiore in quelli preparati a temperatura ambiente, nel caso di tè bianco Bai Mu Dan (Venditti E. et al., 2010).

Questo risultato ci ha spinto a indagare se questa caratteristica potrebbe essere comune a tutti i tè bianchi; dal confronto di diversi infusi di tè bianco estratti a 70°C per 7 minuti (la temperatura comune utilizzata per la macerazione del tè bianco) o a temperatura ambiente per 120 minuti, abbiamo ottenuto risultati paragonabili (Damiani E. et al., 2014).

Poiché tutti i risultati di questi precedenti lavori dipendevano in modo importante dalle diverse temperature e tempi di estrazione del tè, dai vari tipi di tè (tè bianco, tè verde) e dal fatto che le foglie venissero estratte intere o macinate, è stato messo a punto un progetto che studiasse il variare di tali parametri in modo sistematico. Pertanto, abbiamo condotto questo studio per comprendere meglio come il tempo e la temperatura influenzino le proprietà benefiche (in termini di attività

antiossidante, contenuto in polifenoli e flavonoidi) e la gradevolezza di diversi tè bianchi e verdi, a foglia intera e macinati.

### ***10.2.1 Campioni e infusione***

Per questo progetto sono stati analizzati cinque campioni di tè (Figura 80) bianchi e verdi, provenienti dalla Cina e dal Malawi (Africa). I tè cinesi sono stati scelti in quanto sono i più popolari, soprattutto per quanto riguarda il tè bianco e verde. Al contrario il continente africano è rinomato per la produzione di tè neri che vengono di solito utilizzati per la miscelazione, ma recentemente in Africa si stanno sperimentando nuove piantagioni di tè per la produzione di tè bianchi e verdi, da cultivar in genere utilizzate per la produzione di tè neri: di conseguenza, è stato interessante includere questi nuovi tè in questo studio per confrontarli con i tè cinesi più popolari.

Dei cinque campioni di tè analizzati, tre provenivano dalla Cina e sono stati acquistati in un negozio specializzato nella vendita di tè (Jesi – Cose di tè) e due sono stati prodotti in Africa e ci sono stati forniti dall'azienda "Satemwa Tea Estates" di Thyolo (Malawi). I campioni di tè cinesi sono:

- Bai Mu Dan (B), un tè nobile della provincia di Fujian, avente delle grandi foglie multicolori coperte da una lanuggine bianca;
- Lung Ching bianco (LW - Lung Ching White) con piccole foglie lanuginose (Damiani E. et al., 2014);

- Lung Ching verde (LG - Lung Ching Green) avente piccole foglie con una superficie liscia;

questi ultimi due tè provengono dalla stessa azienda (Zhejiang Qiandao Yuye Co. Ltd, Hangzhou, Cina) che si trova nella provincia di Zhejiang. I tè africani sono stati prodotti a partire da foglie di tè raccolte a mano della cultivar PC108, selezionata nel Malawi dalla Fondazione Tea Research (Mulanje, Malawi) per la produzione tè nero con la tecnica CTC (Crushing Tearing Curling – Triturare Strappare Arrotolare). Tale cultivar contenente circa il 50-60% della varietà *sinensis* e il 40-50% della varietà *assamica* ha un alto contenuto di catechine e teanina (Carloni P. et al., 2013). Le foglie fresche sono state trattate in modi diversi per ottenere il Salima Peony bianco (SW) e verde (SG) entrambi caratterizzati da grandi foglie.



Figura 80: Campioni di tè: Bai Mu Dan (B), Lung Ching bianco (LW), Lung Ching verde (LG), Salima Peony bianco (SW), Salima Peony verde (SG). La grandezza delle foglie dei diversi campioni di tè sono proporzionali alla dimensione reale.

## ***10.2.2 Materiali e metodi***

### ***10.2.2.1 Preparazione degli estratti***

I tè sono stati utilizzati in foglia intera o macinati grossolanamente con un macinino per ottenere particelle aventi per il 90% una grandezza compresa tra 200 e 1200  $\mu\text{m}$ ; questi ultimi campioni sono stati identificati con una “M” apposta al termine del codice identificativo. Le infusioni dei campioni di tè sia in foglie intere che macinati sono state ottenute come segue:

- Gli infusi di tè freddo sono stati preparati aggiungendo 20 ml di acqua a temperatura ambiente (20-25°C) a 0.5 g di tè e lasciando riposare l'infusione a temperatura ambiente per 15, 30, 60 o 120 minuti, agitando manualmente ogni 10 min.
- Gli infusi di tè caldo sono stati preparati mettendo 0.5 g di tè in 20 ml di acqua minerale mantenuta a 70°C o 90°C per 7 minuti in bagno termostato.

La quantità di tè utilizzata per l'infusione (0.5 g di tè in 20 ml acqua) è approssimativamente uguale a quella raccomandata per la preparazione di tè da degustazione che è di 2 g in 100 ml di acqua (ISO 1980). Gli infusi preparati sia a caldo che a freddo sono stati filtrati con carta da filtro Whatman (43-38  $\mu\text{m}$ ) e diluiti con acqua ultrapura alla concentrazione più appropriata in base al test utilizzato per l'analisi. Di seguito, i termini “tè caldo” e “tè freddo” saranno usati per identificare i due tipi di infusi mentre i termini “tè freddo max” e “tè caldo max”

saranno utilizzati per identificare gli infusi effettuati rispettivamente con acqua a temperatura ambiente per 120 minuti e con acqua a 90°C per 7 min.

#### 10.2.2.2 *Contenuto in Polifenoli Totale (TPC)*

Il TPC negli infusi di tè è stato determinato utilizzando il saggio Folin-Ciocalteu (Singleton V. L. et al., 1999). A 1.000 ml di acqua ultrapura, sono stati aggiunti e miscelati 75 µl di reagente di Folin-Ciocalteu e a seguire 50 µl di infuso di tè precedentemente diluito 15 volte oppure, come standard, una soluzione di acido gallico 60 mM in etanolo opportunamente diluita (0-2.0 mM in acqua) o acqua come bianco. Dopo 10 minuti, sono stati aggiunti e mescolati 375 µl di una soluzione acquosa di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. I campioni sono stati lasciati riposare al buio per 120 minuti a temperatura ambiente e poi è stata letta l'assorbanza a 760 nm, contro il bianco, utilizzando lo spettrofotometro UV-Vis Varian Cary 50. I risultati sono stati espressi come concentrazione mM di Acido Gallico Equivalenti (GAE) utilizzando una retta di regressione lineare ottenuta dalla curva di taratura di soluzioni diluite di acido gallico (0-70 µM).

### 10.2.2.3 *Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC)*

Il contenuto totale di flavonoidi (TFC) negli infusi di tè è stato misurato utilizzando un saggio colorimetrico secondo il metodo di Gursoy N. et al. (2009) con alcune modifiche. In breve, sono stati aggiunti e miscelati a 1.350 ml di acqua distillata, 50  $\mu$ l di infuso di tè oppure, come standard, una soluzione di (+)-catechina 60 mM in etanolo, opportunamente diluita (0-6.5 mM in acqua) o acqua, come bianco. Successivamente, sono stati aggiunti e miscelati 50  $\mu$ l di soluzione acquosa di NaNO<sub>2</sub> al 5% e a seguire 50  $\mu$ l di una soluzione appena preparata di AlCl<sub>3</sub> al 10% in acqua. I campioni sono stati lasciati riposare per 10 minuti al buio a temperatura ambiente e infine è stata letta l'assorbanza a 415 nm. I risultati sono stati espressi come concentrazione mM di Catechina Equivalenti (CE) usando il valore di regressione lineare ottenuto dalla curva di taratura di soluzioni diluite di catechina (0-250  $\mu$ M).

### 10.2.2.4 *Attività antiossidante (AA)*

#### **Test ABTS**

Per misurare l'AA dei tè diversi, è stato utilizzato il test ABTS, secondo il metodo di Re R. et al. (1999). Il radicale catione (ABTS<sup>•+</sup>) è stato preparato come descritto nel paragrafo 8.2.2.2 – saggio ABTS. Prima dell'uso la soluzione stock di ABTS<sup>•+</sup> è stata diluita 80 volte con acqua per ottenere una assorbanza a 734 nm che varia tra 0.7 e 0.8 UA. A

1.450 ml di questa soluzione diluita di ABTS<sup>•+</sup>, sono stati aggiunti e miscelati 50 µl di infuso di tè precedentemente diluito 50 volte oppure, come standard, una soluzione etanolica di Trolox 36 mM opportunamente diluita (0-0.5 mM in acqua), o di acqua come controllo. I campioni sono stati lasciati riposare al buio per 120 minuti a temperatura ambiente, e poi è stata letta l'assorbanza a 734 nm contro l'acqua come bianco e i risultati sono stati calcolati come percentuale di inibizione (paragrafo 5.2.1). L'attività antiossidante è stata espressa in concentrazione mM di Trolox equivalenti (TE) utilizzando il valore di regressione lineare ottenuto dalla curva di calibrazione di soluzioni diluite di Trolox (0-18 µM).

#### 10.2.2.5 *Analisi sensoriale*

Per stabilire l'effetto delle condizioni di infusione (macinazione delle foglie e tempo/temperatura di infusione) sull'aroma, il gusto e in generale sulla gradevolezza dei diversi infusi di tè questi sono stati valutati dal punto di vista sensoriale da alcuni volontari. Tale valutazione è stata effettuata esclusivamente sugli infusi di Salima Peony bianco e verde sia in foglie intere che macinate. Gli infusi di tè sono stati preparati come descritto precedentemente con le condizioni "tè freddo max" (temperatura ambiente, 120 min) e "tè caldo max" (90°C, 7 min) ed entrambi sono stati serviti a temperatura ambiente. Per la valutazione organolettica dei campioni di tè è stato reclutato un

gruppo di 20 volontari sani (nella fascia di età 23-50 anni), interessati alla valutazione sensoriale e aventi familiarità con il tè. Ad essi non è stato permesso di mangiare o bere nulla tranne acqua, né di lavarsi i denti, da 1 ora prima della seduta, ed è stato inoltre vietato di utilizzare profumi e di fumare. Prima della valutazione, è stato condotto un training di 15 minuti per permettere ai giudici di familiarizzare con le definizioni degli attributi da associare ai campioni di tè nella scheda di descrizione. In seguito, a ciascun membro è stato offerto un campione alla volta, in ordine casuale. Tra una valutazione e un'altra i giudici potevano eliminare dalla cavità orale i sentori legati al campione, con acqua tiepida e/o una mela (Adnan M. et al., 2013). Inoltre ai giudici è stato fornito un questionario per segnalare le loro osservazioni sensoriali. Il questionario (Figura 81 e Figura 82) era composto da cinque parti:

- Informazioni sui volontari come il sesso, la fascia di età, le condizioni fisiologiche che potevano influenzare il test (fumatore, stress, raffreddore, ecc.);
- La preferenza generale dei volontari per i diversi tè (tipo tè preferito, frequenza di consumo, ecc.);
- Valutazione del colore.
- Valutazione attributi sensoriali dell'odore (ortonasale), del gusto (amaro, astringente, dolce e persistente) e dell'aroma (retronasale: fiori, erba medica, agrumi, noci, resina, muschio bianco e castagne) le cui intensità sono state espresse su una

scala da 0 a 5 corrispondente alla percezione "assente" per il valore di 0, "appena percepibile" per 1, "percepibile" per 2, "media" per 3, "evidente" per 4 ed "estrema" per 5. I descrittori sensoriali sono stati scelti sulla base di studi precedenti relativi alle principali caratteristiche organolettiche del tè (Lee J. et al., 2009);

- La valutazione personale del gradimento generale doveva essere espressa con una scala verbale ed una ad emoticon come ottimo, buono, sufficiente e sgradevole.

I dati raccolti sono stati elaborati statisticamente al fine di ottenere i risultati globali per ogni descrittore. Le variabili relative ai dati dei volontari, alla preferenza e al colore dei tè non sono state prese in considerazione perché non influenzavano il risultato del test.

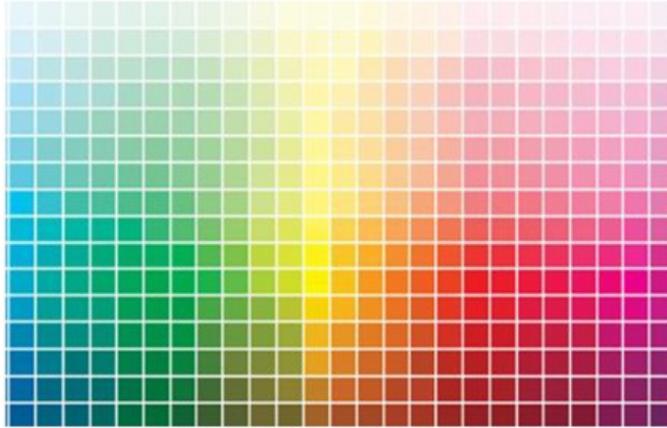
#### 10.2.2.6 *Analisi dei dati*

I dati riportati rappresentano i valori medi di almeno tre esperimenti indipendenti ciascuno dei quali eseguito in duplice ( $n = 3$ ). I dati sono stati elaborati dal punto di vista statistico con il Software Stat Toolbox disponibile in rete all'indirizzo <http://department.obg.cuhk.edu.hk/researchsupport/statmenu.asp> utilizzando l'ANOVA a una via e il test non parametrico di Siegel-Tukey per il confronto della significatività della differenza fra le medie ( $p < 0.05$ ).

CODICE CAMPIONE (sigla di 2 lettere sul bicchierino):..... DATA: .....

**NOTE VISIVE: COLORE**

TONALITÀ e INTENSITÀ: Osserva il tuo campione di tè e trova nella seguente scala il colore che più si avvicina, indicandolo con una X.



PATINA: s'intendono le macchie opalescenti o biancastre presenti talvolta sulla superficie dell'acqua. Indica con una X il grado di intensità della patina basandosi sulle indicazioni della legenda.

INTENSITÀ (vedere legenda)

	0	1	2	3	4	5
Patina:	<input type="checkbox"/>					

Legenda intensità:  
0 = assente  
1 = appena percepibile  
2 = percepibile  
3 = media  
4 = grande  
5 = estrema

Ora indica la presenza di residui sul fondo del bicchiere....

INTENSITÀ (vedere legenda)

	0	1	2	3	4	5
Presenza residui sul fondo	<input type="checkbox"/>					

Figura 81: Scheda per la valutazione sensoriale.

**NOTE OLFATTIVE E GUSTATIVE**

(per ogni voce barra **SEMPRE** la casella con una X, anche quando l'intensità è pari a zero)

DESCRITTORI E ATTRIBUTI	INTENSITÀ (VEDERE LEGENDA)					
	0	1	2	3	4	5
Profumo (OLFATTO)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Amaro (GUSTO)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Astringenza = "allappa" (GUSTO)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dolce (GUSTO)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Persistenza in bocca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Altri descrittori o attributi positivi (OLFATTO E "GUSTO"):</b>						
Fiori	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Erba medica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Castagna bollita	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muschio bianco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Noce	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agrumi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Resina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Altro:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Legenda intensità:**  
 0 = assente  
 1 = appena percepibile  
 2 = percepibile  
 3 = media  
 4 = grande  
 5 = estrema

**Note e osservazioni:**

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**GIUDIZIO DI MERITO:**

ottimo 😊

buono 😄

sufficiente 😐

sgradevole ☹️

Prima di passare al campione successivo mangia un pezzetto di mela o un crackers per eliminare odori e/o sapori dalla cavità orale. Bevi quando vuoi!

Ora attendi il mio VIA!

Figura 82: Scheda per la valutazione sensoriale.

### 10.2.3 Risultati

L'insieme dei risultati ottenuti per mezzo dei tre test TPC, del TFC e dell'AA (Tabella 18) danno una misura adeguata del contenuto in composti bioattivi degli infusi, dal momento che i dati ottenuti con queste tre prove di solito correlano bene tra loro e con il contenuto in catechina (Craft B. D. et al., 2012; Gülçin İ., 2012). Il tipo e la quantità di composti bioattivi presenti nei vari tipi di tè qui analizzati sono già stati precedentemente quantificati e pubblicati (Carloni P. et al., 2013; Damiani E. et al., 2014).

	TPC (mM GAE)	TFC (mM CE)	AA (mM TE)
<b>Bai Mu Dan (B)</b>			
rt, 15'	2.27 <sup>f,D</sup> ± 0.218	0.73 <sup>e,C</sup> ± 0.056	5.24 <sup>e,D</sup> ± 1.929
rt, 30'	3.38 <sup>e,D</sup> ± 0.443	1.12 <sup>d,E</sup> ± 0.280	9.24 <sup>de,C</sup> ± 3.169
rt, 60'	6.54 <sup>c,DE</sup> ± 0.150	2.06 <sup>bc,CD</sup> ± 0.337	14.91 <sup>bc,E</sup> ± 4.043
rt, 120'	9.25 <sup>a,F</sup> ± 0.979	3.23 <sup>a,E</sup> ± 0.434	19.61 <sup>a,E</sup> ± 3.521
70°C, 7'	4.98 <sup>d,F</sup> ± 0.775	1.70 <sup>c,F</sup> ± 0.059	11.34 <sup>cd,E</sup> ± 3.004
90°C, 7'	7.63 <sup>b,F</sup> ± 0.669	2.37 <sup>b,E</sup> ± 0.109	18.83 <sup>ab,D</sup> ± 2.077
<b>White Lung Ching (LW)</b>			
rt, 15'	1.46 <sup>e,D</sup> ± 0.789	0.49 <sup>f,C</sup> ± 0.064	4.67 <sup>c,D</sup> ± 1.096
rt, 30'	3.01 <sup>d,D</sup> ± 0.717	0.89 <sup>e,E</sup> ± 0.127	6.69 <sup>c,C</sup> ± 0.791
rt, 60'	4.91 <sup>c,E</sup> ± 0.728	1.42 <sup>d,D</sup> ± 0.212	13.24 <sup>b,E</sup> ± 2.234
rt, 120'	8.05 <sup>b,F</sup> ± 0.644	2.34 <sup>b,F</sup> ± 0.219	19.38 <sup>a,E</sup> ± 2.173
70°C, 7'	8.46 <sup>b,F</sup> ± 0.630	1.90 <sup>c,F</sup> ± 0.096	19.51 <sup>a,CD</sup> ± 2.690
90°C, 7'	11.11 <sup>a,E</sup> ± 0.777	2.74 <sup>a,E</sup> ± 0.093	22.61 <sup>a,CD</sup> ± 3.991

<b>Green Lung Ching (LG)</b>						
rt, 15'	1.83 <sup>f,D</sup>	± 0.609	0.61 <sup>e,C</sup>	± 0.131	5.27 <sup>d,D</sup>	± 2.408
rt, 30'	3.54 <sup>e,D</sup>	± 0.674	1.16 <sup>d,E</sup>	± 0.252	9.53 <sup>d,C</sup>	± 2.297
rt, 60'	6.57 <sup>d,DE</sup>	± 0.761	2.01 <sup>c,CD</sup>	± 0.310	17.83 <sup>c,DE</sup>	± 2.862
rt, 120'	8.92 <sup>c,F</sup>	± 0.438	2.88 <sup>b,EF</sup>	± 0.519	22.99 <sup>b,DE</sup>	± 1.737
70°C, 7'	11.15 <sup>b,F</sup>	± 1.457	2.93 <sup>b,E</sup>	± 0.329	24.88 <sup>ab,C</sup>	± 4.047
90°C, 7'	14.01 <sup>a,D</sup>	± 1.016	3.84 <sup>a,D</sup>	± 0.226	27.99 <sup>a,C</sup>	± 4.046
<b>White Salima Peony (SW)</b>						
rt, 15'	1.57 <sup>c,D</sup>	± 0.636	0.67 <sup>c,C</sup>	± 0.215	3.72 <sup>d,D</sup>	± 2.358
rt, 30'	3.51 <sup>d,D</sup>	± 0.588	1.28 <sup>d,E</sup>	± 0.275	6.88 <sup>cd,C</sup>	± 2.799
rt, 60'	6.01 <sup>c,E</sup>	± 0.943	2.06 <sup>c,CD</sup>	± 0.417	14.84 <sup>b,E</sup>	± 2.686
rt, 120'	11.16 <sup>a,E</sup>	± 1.015	3.26 <sup>a,E</sup>	± 0.500	22.22 <sup>a,DE</sup>	± 2.590
70°C, 7'	4.43 <sup>cd,E</sup>	± 0.817	1.39 <sup>d,F</sup>	± 0.242	8.94 <sup>c,E</sup>	± 1.127
90°C, 7'	9.05 <sup>b,EF</sup>	± 1.957	2.69 <sup>b,E</sup>	± 0.078	20.56 <sup>a,D</sup>	± 2.000
<b>Green Salima Peony (SG)</b>						
rt, 15'	2.21 <sup>d,D</sup>	± 0.192	0.71 <sup>e,C</sup>	± 0.152	4.58 <sup>d,D</sup>	± 1.661
rt, 30'	4.36 <sup>c,D</sup>	± 1.042	1.41 <sup>d,E</sup>	± 0.169	9.93 <sup>c,C</sup>	± 3.433
rt, 60'	7.84 <sup>b,D</sup>	± 1.227	2.51 <sup>b,C</sup>	± 0.124	18.07 <sup>b,DE</sup>	± 2.763
rt, 120'	12.73 <sup>a,D</sup>	± 1.229	3.61 <sup>a,DE</sup>	± 0.283	26.18 <sup>a,CD</sup>	± 2.373
70°C, 7'	5.83 <sup>c,D</sup>	± 0.972	1.74 <sup>c,F</sup>	± 0.290	13.57 <sup>c,DE</sup>	± 2.808
90°C, 7'	9.43 <sup>b,EF</sup>	± 1.229	2.52 <sup>b,E</sup>	± 0.188	19.59 <sup>b,D</sup>	± 3.022
<b>Bai Mu Dan Milled (BM)</b>						
rt, 15'	6.10 <sup>e,C</sup>	± 0.788	2.68 <sup>e,B</sup>	± 0.305	17.85 <sup>b,BC</sup>	± 3.567
rt, 30'	9.40 <sup>d,C</sup>	± 1.433	3.40 <sup>d,C</sup>	± 0.198	20.20 <sup>b,B</sup>	± 3.464
rt, 60'	12.15 <sup>c,C</sup>	± 0.642	4.18 <sup>e,B</sup>	± 0.516	23.62 <sup>b,CD</sup>	± 3.565
rt, 120'	14.62 <sup>b,C</sup>	± 1.181	4.68 <sup>c,C</sup>	± 0.429	35.22 <sup>a,B</sup>	± 2.775
70°C, 7'	15.11 <sup>b,C</sup>	± 1.059	5.28 <sup>b,C</sup>	± 0.279	35.52 <sup>a,B</sup>	± 3.801

90°C, 7'	17.81 <sup>a,C</sup>	± 0.579	6.40 <sup>a,BC</sup>	± 0.318	37.82 <sup>a,B</sup>	± 4.420
<b>Green Lung Ching Milled (LGM)</b>						
rt, 15'	7.05 <sup>d,C</sup>	± 0.910	2.22 <sup>d,B</sup>	± 0.252	16.77 <sup>d,C</sup>	± 4.045
rt, 30'	9.70 <sup>c,C</sup>	± 0.948	2.75 <sup>d,D</sup>	± 0.531	22.23 <sup>cd,B</sup>	± 3.446
rt, 60'	11.58 <sup>c,C</sup>	± 1.524	3.86 <sup>c,B</sup>	± 0.210	24.56 <sup>bc,C</sup>	± 5.741
rt, 120'	14.31 <sup>b,C</sup>	± 0.353	4.26 <sup>bc,CD</sup>	± 0.256	30.02 <sup>b,C</sup>	± 2.602
70°C, 7'	15.61 <sup>b,C</sup>	± 1.790	4.53 <sup>b,D</sup>	± 0.235	37.51 <sup>a,B</sup>	± 3.908
90°C, 7'	20.38 <sup>a,B</sup>	± 1.758	6.19 <sup>a,C</sup>	± 0.580	42.18 <sup>a,B</sup>	± 3.652
<b>White Salima Peony Milled (SWM)</b>						
rt, 15'	9.58 <sup>c,B</sup>	± 0.584	3.61 <sup>c,A</sup>	± 0.646	23.25 <sup>d,A</sup>	± 2.733
rt, 30'	12.58 <sup>d,B</sup>	± 0.534	5.01 <sup>b,B</sup>	± 0.504	29.14 <sup>c,A</sup>	± 3.301
rt, 60'	14.66 <sup>c,B</sup>	± 0.912	6.51 <sup>a,A</sup>	± 0.311	32.69 <sup>bc,B</sup>	± 3.387
rt, 120'	16.63 <sup>b,B</sup>	± 0.704	6.81 <sup>a,B</sup>	± 0.382	36.01 <sup>b,B</sup>	± 1.802
70°C, 7'	18.48 <sup>a,B</sup>	± 1.170	6.81 <sup>a,B</sup>	± 0.143	36.07 <sup>b,B</sup>	± 3.336
90°C, 7'	18.94 <sup>a,BC</sup>	± 1.145	6.94 <sup>a,B</sup>	± 0.149	40.61 <sup>a,B</sup>	± 3.583
<b>Green Salima Peony Milled (SGM)</b>						
rt, 15'	10.71 <sup>d,A</sup>	± 0.468	4.04 <sup>c,A</sup>	± 0.660	20.92 <sup>c,AB</sup>	± 3.304
rt, 30'	15.26 <sup>c,A</sup>	± 1.311	5.94 <sup>b,A</sup>	± 0.427	29.78 <sup>d,A</sup>	± 5.602
rt, 60'	18.88 <sup>b,A</sup>	± 1.854	6.77 <sup>b,A</sup>	± 0.870	39.81 <sup>c,A</sup>	± 1.903
rt, 120'	20.74 <sup>b,A</sup>	± 0.881	8.44 <sup>a,A</sup>	± 0.931	43.67 <sup>bc,A</sup>	± 4.026
70°C, 7'	24.78 <sup>a,A</sup>	± 1.608	8.55 <sup>a,A</sup>	± 0.696	46.83 <sup>ab,A</sup>	± 5.178
90°C, 7'	26.06 <sup>a,A</sup>	± 1.654	9.05 <sup>a,A</sup>	± 0.787	50.36 <sup>a,A</sup>	± 4.972

Tabella 18: Contenuto fenolico totale (TPC), contenuto totale di flavonoidi (TPC) e attività antiossidante (AA) di infusi di tè nelle diverse condizioni d'infusione. Nella stessa colonna, lettere minuscole diverse per lo stesso tipo di tè e lettere maiuscole diverse per la stessa temperatura indicano differenze significative a  $p < 0.05$ .

### 10.2.3.1 *Contenuto in Polifenoli Totali (TPC)*

I livelli di polifenoli totali (TPC) negli infusi di tè sono sintetizzati nella Tabella 18 e nella Figura 83 dalle quali si può notare una forte dipendenza di tale parametro dalle condizioni di estrazione (temperatura dell'acqua e tempo d'infusione). Il TPC aumenta infatti con il protrarsi del tempo di estrazione, in tutti gli infusi di tè a freddo raggiungendo il massimo valore nell'infuso estratto per 120 min. Inoltre, nel tè infuso in acqua calda, il TPC aumenta con la temperatura dell'acqua: tutti gli infusi di tè caldi, preparati a 90°C, mostrano infatti un TPC superiore rispetto a quelli estratti a temperatura più bassa (70°C) e la differenza è significativa in tutti i casi ad eccezione del Salima Peony bianco e verde (Figura 83). Il TPC significativamente più alto a tutte le temperature e tempi di infusione (Tabella 18, lettera maiuscola) è stato misurato nel Salima Peony verde macinato (SGM). In generale, i livelli di TPC sono sempre significativamente più alti negli infusi di tè macinati rispetto a quelli di foglie intere. Inoltre, il TPC degli infusi macinati, preparati alle condizioni di estrazione caldo max (90°C) sono sempre significativamente superiori a quello del tè freddo max (Tabella 18). Per quanto riguarda i tè preparati con le foglie intere, solo il Lung Ching bianco (LW) e il Lung Ching verde (LG) hanno un TPC superiore nell'infuso a caldo piuttosto che a freddo, la cui differenza è significativa qualora vengono confrontati il tè caldo max (rispettivamente 11.11 e 14.01 mM GAE) con il freddo max (rispettivamente 8.05 e 8.92 mM GAE). Infine, per quanto riguarda il

diverso grado di fermentazione che le foglie subiscono per ottenere il tè bianco o verde, dai risultati ottenuti (Tabella 18) confrontando il tè bianco e verde dalla stessa varietà (Lung Ching bianco e verde; Salima Peony bianco e verde, macinato e intero) si osserva che il TPC del tè verde è sempre superiore a quello dei bianchi, in tutte le condizioni di estrazione. Inoltre, questa differenza è significativa quando si confrontano i tè Salima Peony macinati (Tabella 18, lettera maiuscola).

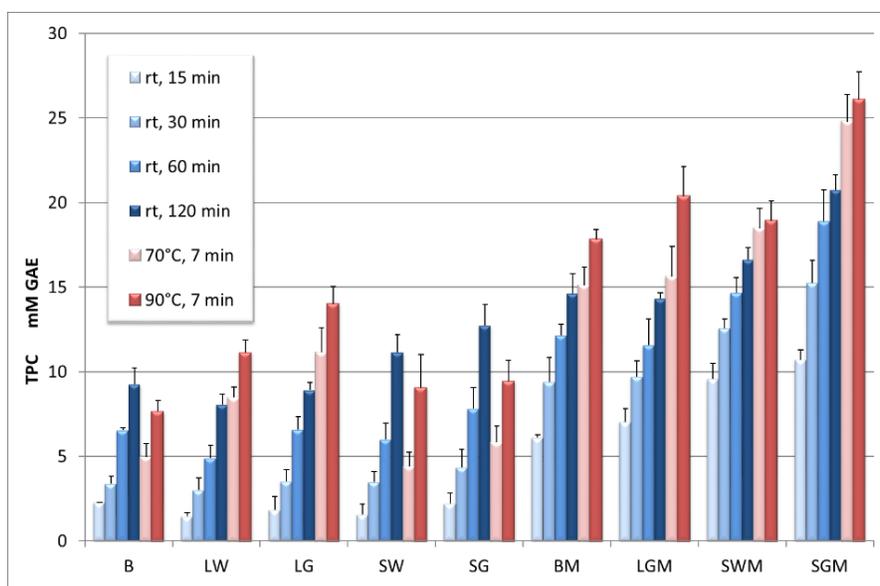


Figura 83: Contenuto totale in polifenoli (TPC) dei tè testati preparati in acqua fredda (rt: temperatura ambiente; 15, 30, 60, 120 min) o calda (70°C o 90°C per 7 min), espresso come concentrazione mM di Acido Gallico equivalenti (mM GAE). B: Bai Mu Dan; LW: Lung Ching bianco intero; LG: Lung Ching verde intero; SW: Salima Peony bianco intero; SG: Salima Peony verde intero; BM: Bai Mu Dan macinato; LGM: Lung Ching verde macinato; SWM: Salima Peony bianco macinato; SGM: Salima Peony verde macinato.

### 10.2.3.2 *Contenuto Totale di Flavonoidi (TFC)*

Il contenuto totale di flavonoidi (TFC) presente negli estratti di tè è stato misurato con il metodo del cloruro di alluminio che permette di separare il contributo di questa classe di fenoli da quello dei polifenoli totali (Barnum D. W., 1977). Il principio si basa sulla capacità del nitrito di sodio di nitrare qualsiasi anello aromatico che porti in posizione 3 o 4 un gruppo catecolo non sostituito o stericamente non ingombrato: i prodotti di questa reazione formano facilmente dei complessi con il cloruro di alluminio che possono essere rilevati a 415 nm. Il TFC dei diversi infusi è riportato in Tabella 18 e nel grafico in Figura 84. I risultati sono correlati significativamente con il TPC ( $r = 0.9719$ ,  $p = 0.0001$ ) e infatti anche il TFC mostra una dipendenza dalle condizioni di estrazione (tempo di macerazione e temperatura dell'acqua) e dalla dimensione delle foglie di tè. In tutti i campioni, il TFC aumenta con il protrarsi del tempo di estrazione, con l'aumento della temperatura, e con la macinazione delle foglie. Inoltre, tra gli infusi ottenuti dalle foglie intere, solo quelli preparati dal LW e dal LG mostrano valori di TFC significativamente più alti nel tè caldo max (rispettivamente 2.74 e 3.84 mM CE) che in quello estratto a freddo max (rispettivamente 2.34 e 2.88 mM CE).

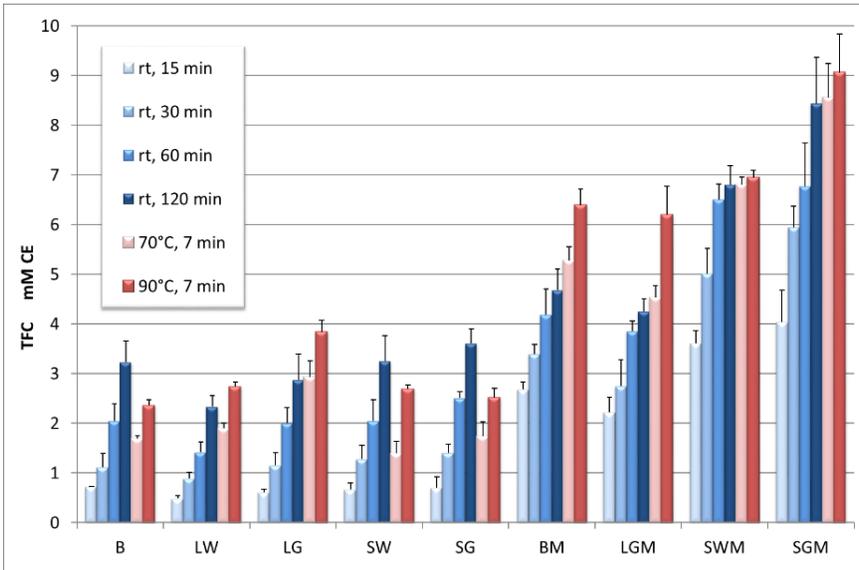


Figura 84: Contenuto totale di flavonoidi (TFC) dei tè testati preparati in acqua fredda (rt: temperatura ambiente; 15, 30, 60, 120 min) o calda (70°C o 90°C per 7 min), espresso come concentrazione mM di Catechina Equivalenti (CE). B: Bai Mu Dan; LW: Lung Ching bianco intero; LG: Lung Ching verde intero; SW: Salima Peony bianco intero; SG: Salima Peony verde intero; BM: Bai Mu Dan macinato; LGM: Lung Ching verde macinato; SWM: Salima Peony bianco macinato; SGM: Salima Peony verde macinato.

### 10.2.3.3 *Attività antiossidante (AA)*

L'attività antiossidante è stata testata mediante il saggio ABTS che è stato descritto nel paragrafo precedente (10.2.2.4). I risultati ottenuti (Tabella 18 e Figura 85) mostrano una correlazione significativa dell'attività antiossidante sia con il contenuto in polifenoli totali ( $r = 0.987$ ;  $p = 0.0001$ ) sia con quello in flavonoidi ( $r = 0.961$ ;  $p = 0.0001$ ). Anche in questo saggio l'aumento dell'AA per ogni campione va di pari

passo con l'aumento della temperatura per i tè estratti a caldo e con il tempo di macerazione per quelli estratti a freddo. Gli infusi di tè ottenuti dalle foglie macinate mostrano un'AA sempre significativamente maggiore rispetto a quelli a foglia intera (Figura 85).

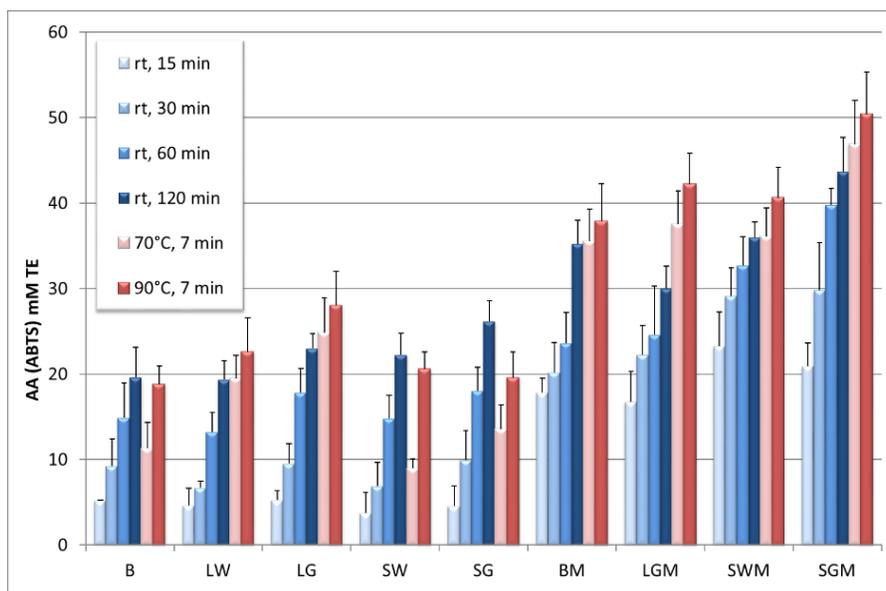


Figura 85: Attività antiossidante (AA) dei tè testati preparati in acqua fredda (rt: temperatura ambiente; 15, 30, 60, 120 min) o calda (70°C o 90°C per 7 min), espresso come concentrazione mM di Trolox Equivalenti (TE). B: Bai Mu Dan; LW: Lung Ching bianco intero; LG: Lung Ching verde intero; SW: Salima Peony bianco intero; SG: Salima Peony verde intero; BM: Bai Mu Dan macinato; LGM: Lung Ching verde macinato; SWM: Salima Peony bianco macinato; SGM: Salima Peony verde macinato.

La correlazione tra i risultati di questi tre test conferma la validità delle procedure utilizzate per le nostre analisi.

Per quanto riguarda gli infusi preparati a caldo, tutti i tè studiati mostrano un maggior contenuto di composti bioattivi e una maggiore AA negli infusi preparati alla massima temperatura ( $90^{\circ}\text{C} > 70^{\circ}\text{C}$ ) mentre per gli infusi preparati a temperatura ambiente le variabili studiate aumentano con il tempo di infusione ( $120 > 60 > 30 > 15$  min): gli infusi a freddo danno risultati confrontabili con quelli a caldo a  $90^{\circ}\text{C}$  dopo 60 minuti per i tè a foglia piccola e dopo 120 minuti per quelli a foglia larga. Questo in quanto a temperatura ambiente i composti bioattivi hanno probabilmente bisogno di più tempo per migrare dalle foglie al solvente di estrazione, l'acqua (Yang D. J. et al., 2007). Inoltre, l'efficienza di estrazione delle foglie di tè macinate è sempre maggiore rispetto a quella delle foglie intere: questo conferma di conseguenza che la dimensione delle foglie di tè influenza l'efficienza di estrazione. Analogamente, Vuong Q. V. et al. (2011) paragonando infusi di foglie di tè intere e macinate con varie granulometrie estratte con acqua alla temperatura di  $80^{\circ}\text{C}$ , hanno trovato che l'estrazione di catechine è più efficace quando la dimensione delle foglie è di 1 mm. Inoltre, Astill C. et al. (2001) hanno osservato che la velocità di estrazione di tè a foglia intera è maggiore quando le foglie sono più piccole. Nel nostro caso, la dimensione delle foglie influenza in modo diverso l'efficienza di estrazione in funzione della temperatura dell'acqua: quando i tè sono macinati l'estrazione a "caldo max" è sempre più efficiente che a

“freddo max”, come riportato anche da Lin S. D. et al. (2008). Nel caso dei tè a foglia intera invece, l'estrazione “a freddo max” è più efficiente di quella a caldo, sia a 70°C e 90°C per i tè a foglia larga (Bai Mu Dan e Salima), mentre è minore per i tè a foglia piccola (Lung Ching). Questi risultati possono essere attribuiti alla dimensione delle foglie: foglie più grandi richiedono un tempo di infusione maggiore per consentire al solvente di estrazione di bagnare completamente l'intera superficie delle foglie e permettere l'estrazione di composti antiossidanti. Al contrario, le foglie più piccole vengono bagnate più velocemente permettendo, in breve tempo, un maggior rilascio di sostanze fenoliche. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti nel nostro studio precedente in cui alcuni tè bianchi, a foglia intera, sono stati estratti con acqua a 70°C (ma non termostata) per 7 min e con acqua a temperatura ambiente per 120 min (Damiani E. et al., 2014). Quindi si può ipotizzare che la macinazione delle foglie di tè aumenta la superficie a contatto con il solvente di estrazione, facilitando così la migrazione dei polifenoli nell'infuso.

#### 10.2.3.4 *Valutazione sensoriale*

Le valutazioni sensoriali effettuate dai volontari sui due tè africani sono riportate nei due grafici a radar relativi all'odore e al sapore (amaro, astringente, dolce e persistente) (Figura 86A) e al profumo (fiori, erba medica, agrumi, noci, resina, muschio bianco e castagne) (Figura 86B). In Figura 86A, sono evidenziati gli attributi principali e si può osservare che tutti gli estratti di tè sembrano essere percepiti come piuttosto amari e astringenti. Inoltre, il sapore amaro è sempre maggiore negli infusi ottenuti dalle foglie di tè macinate (linea tratteggiata, valori 3.55-4.3) rispetto a quelli a foglie intere (linea continua, valori 1.7-2.45) sia nel tè freddo (C) che caldo (H). Di conseguenza, i tè sono stati percepiti tutti come non molto dolci (0.1-0.55 per macinati e 0.9-1.1 per gli interi) e i tè macinati, rispetto agli interi, sono risultati più astringenti (2.1-2.8 > 1.0-1.35) e più persistenti (2,9- 3.1 > 2.0-2.5). Per quanto riguarda l'odore, i tè bianchi (2.45-3.0) sono stati riconosciuti come più intensi di quelli verdi (1.7-1.9).

Non sono state riscontrate differenze significative nel gusto tra i tè freddi e caldi, ad eccezione di alcune differenze nei tè a foglia intera: il tè bianco è più profumato quando estratto a caldo (3.0) rispetto a freddo (2.45,  $p = 0.05$ ) e il tè verde è più amaro a freddo (2.45) rispetto che a caldo (1.7,  $p = 0.05$ ).

Per quanto riguarda gli attributi aromatici secondari tutti i tè testati mostrano note di fiori, erba medica, agrumi e noci ma tutte le note sono risultate meno intense di quelle primarie e hanno dato dei valori

inferiori a 2. Inoltre, tutte le note secondarie sono state percepite maggiormente sugli estratti preparati in acqua fredda (0.45-1.85) piuttosto che in acqua calda (0.2-1.6).

La temperatura di infusione non fa modificare il profilo dei tè bianchi tuttavia gli infusi di tè verde mostrano alcune differenze a freddo o a caldo: nei tè a foglia intera è stato rilevato un accenno di sentore di castagno e di muschio bianco solo nell'estrazione a freddo (0.95 per entrambi). Per quanto riguarda i tè macinati negli infusi a freddo appare il sentore di resina (0.95 e 1.2 rispettivamente per il bianco e il verde) e nel tè verde un accenno di erba medica (1.7).

Alcuni volontari hanno infine segnalato altri attributi non presenti sulla scheda di valutazione (come il luppolo, le mandorle amare, la cicoria, il carciofo, il cardo, il miele, il cioccolato bianco, i frutti di bosco, le mele, il rabarbaro, il tabacco, il caffè, la terra, le alghe marine, la liquirizia, il tarassaco, la menta, la rosa e la camomilla), e tra questi i sentori di cicoria, carciofi e cardo, verdure tipicamente amare con un alto contenuto di polifenoli, sono stati percepiti più frequentemente e in modo particolare nei tè macinati e infusi a caldo. Il sentore di miele è stato percepito in quasi tutti i campioni anche se con una frequenza inferiore.

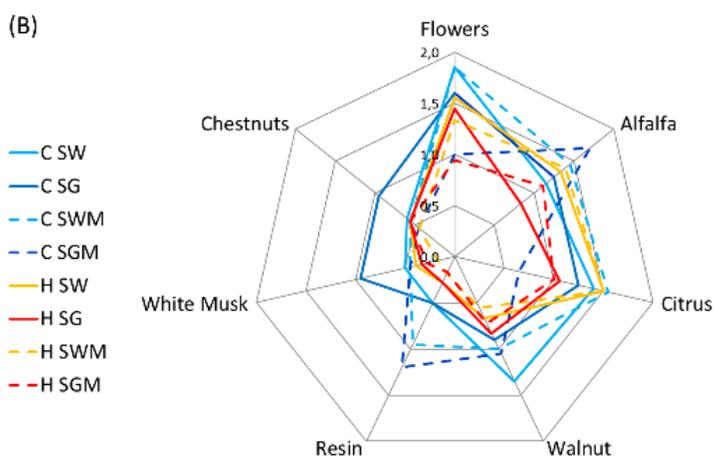
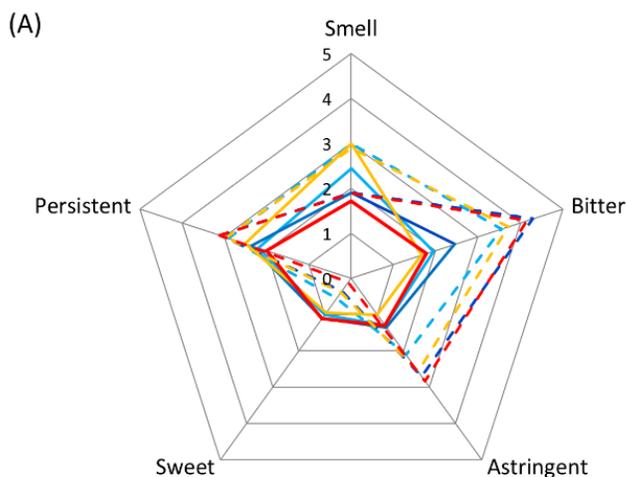


Figura 86: Profili sensoriali dei due tè africani (SW e SG) preparati in acqua fredda max (temperatura ambiente per 120 min) che calda max (90°C per 7 min) come interi o macinati (M). (A) Attributi legati all'odore e al sapore (amaro, astringente, dolce, persistente). (B) Attributi legati all'aroma (fiori, erba medica, agrumi, noci, resina, muschio bianco e castagne). Codici dei campioni C SW; Salima Peony bianco intero a freddo max; C SG: Salima Peony verde intero a freddo max; C SWM: Salima Peony bianco macinato a freddo max; C SGM: Salima Peony verde macinato a freddo max; H SW: Salima Peony bianco intero a caldo max; H SG: Salima Peony verde intero a caldo max; H SWM: Salima Peony bianco macinato a caldo max; H SGM: Salima Peony verde intero a caldo max.

I risultati dell'analisi sensoriale, dimostrano che tutte le infusioni ottenute dalle foglie macinate hanno un sapore più amaro e astringente rispetto a quelle preparate da foglie intere, e confermano la nostra ipotesi secondo la quale la macinazione delle foglie di tè permette probabilmente l'estrazione di un maggior numero di sostanze fitochimiche in quanto aumenta la superficie di contatto con il solvente di estrazione. In effetti, sembra che l'astringenza possa essere attribuita ai flavonoli gallati e alle teaflavine, in particolare mono-e di-gallato, e anche alle catechine, alla caffeina e ad alcuni aminoacidi (come l'arginina e l'alanina) che contribuiscono alla nota amara degli infusi di tè verde (Chaturvedula V. S. P. et al., 2011).

È anche importante considerare che il tè macinato da noi analizzato è stato ottenuto dalla macinazione di foglie di tè di qualità superiore, per cui questi risultati non possono essere estrapolati sui tè meno preziosi detti "fannings", prodotti da piccole particelle (1.5 mm) derivanti dal taglio delle foglie e utilizzati principalmente per il tè in bustine.

Per quanto riguarda il giudizio generale, la maggior parte dei volontari hanno valutato come "buono" l'infuso di tè bianco a foglia intera estratto in acqua fredda per un paio di ore (15/20), che è risultato il più gradevole (Figura 87). La maggior piacevolezza degli infusi estratti a freddo piuttosto che a caldo è stata riportata anche da Lin S. D. et al. (2014) in un recente lavoro.

Inoltre, secondo gli assaggiatori, entrambi i tè bianchi e verdi ottenuti dalle foglie intere risultavano essere più piacevoli rispetto a quelli macinati (Figura 87-90) e l'estratto a freddo del tè verde macinato è stato considerato "non soddisfacente" (12/20) (Figura 88). In generale, i tè verdi macinati sono stati percepiti meno sgradevoli quando estratti in acqua calda (Figura 90).

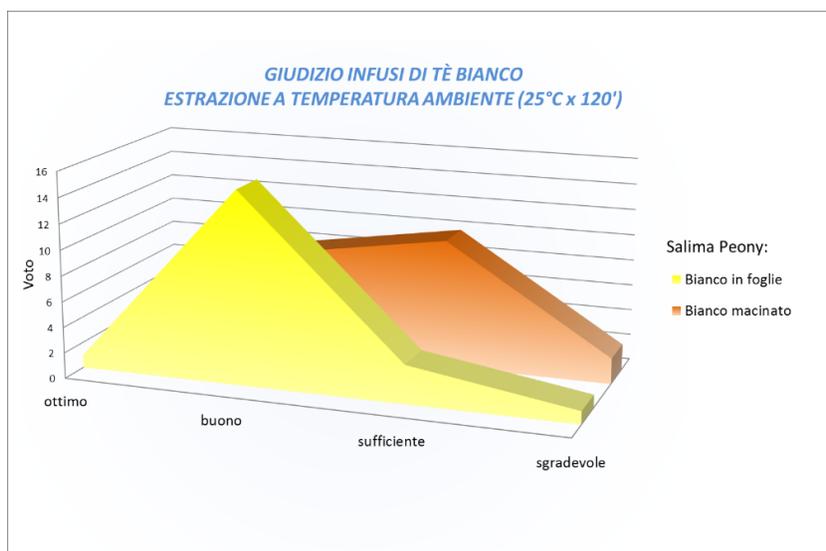


Figura 87: Giudizi di infusi di tè di Salima Peony bianco a foglie intere e macinate, estratti a temperatura ambiente.

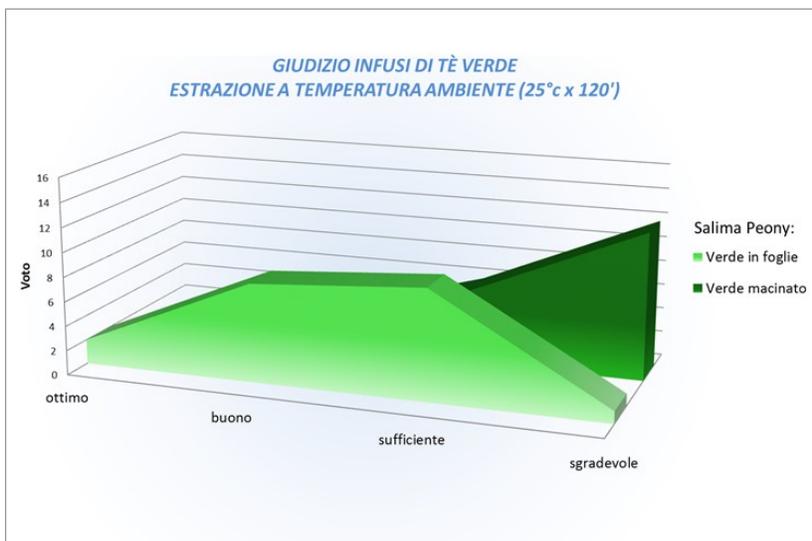


Figura 88: Giudizi di infusi di tè di Salima Peony verde a foglie intere e macinate, estratti a temperatura ambiente.

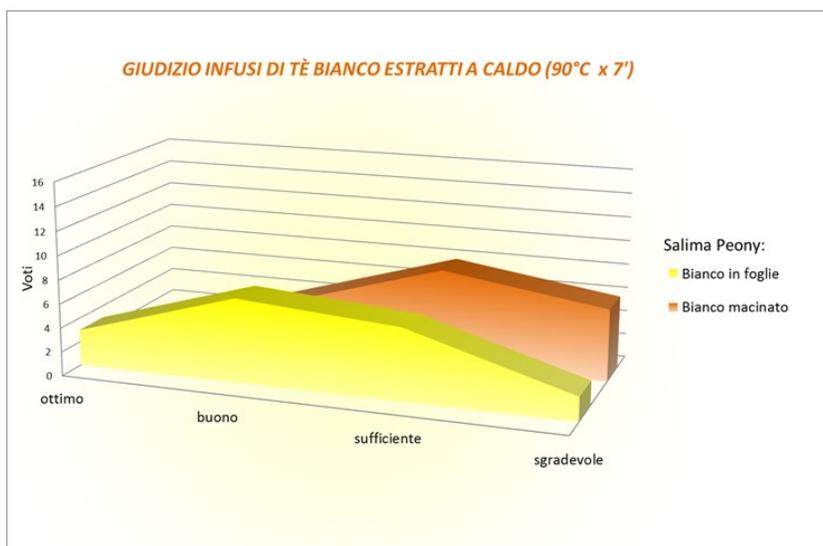


Figura 89: Giudizi di infusi di tè di Salima Peony bianco a foglie intere e macinate estratti a caldo.

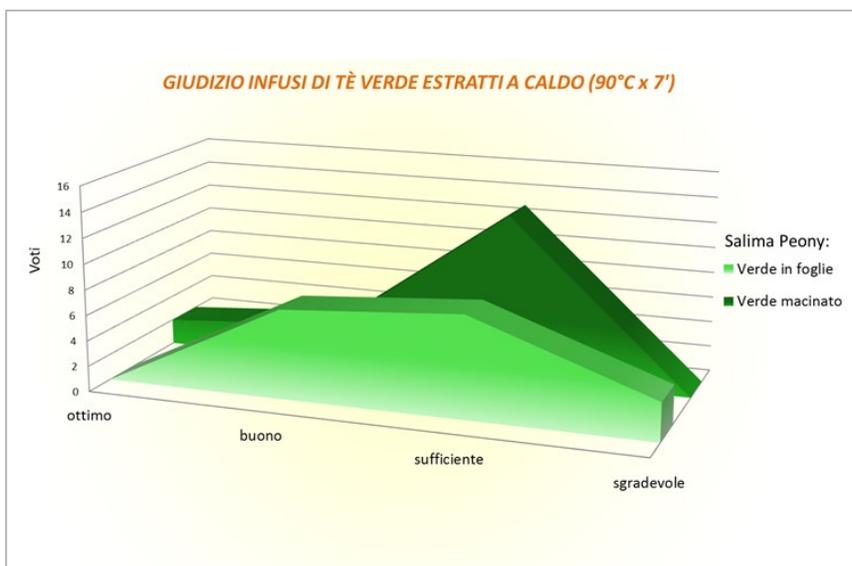


Figura 90: Giudizi di infusi di tè di Salima Peony verde a foglie intere e macinate estratti a caldo.

### ***10.2.4 Conclusione***

In conclusione, questo lavoro di ricerca contiene informazioni utili sulle proprietà antiossidanti, sul contenuto totale di polifenoli, sul contenuto totale di flavonoidi e sugli attributi sensoriali di alcuni tè bianchi e verdi disponibili in commercio ed estratti con i comuni metodi di preparazione del tè. I risultati ottenuti mostrano che l'attività antiossidante è direttamente proporzionale: al tempo di infusione per i tè estratti a temperatura ambiente (l'efficienza di estrazione è massima dopo 120 minuti di infusione); alla temperatura per tempi brevi di estrazione (il potere antiossidante è sempre maggiore nell'estrazione a

90°C, piuttosto che in quella a 70°C); e alla superficie delle foglie (il tè macinato rilascia una maggiore quantità di antiossidanti rispetto a quello a foglie intere). Inoltre, l'estrazione a freddo è più efficiente di quella a caldo solo per i tè a foglia larga, mentre è meno efficiente per i tè caratterizzati da foglie di piccole dimensioni; l'estrazione non è inoltre particolarmente influenzata dai diversi trattamenti (fermentazione/ossidazione) che le foglie subiscono per ottenere tè bianco o verde.

Per quanto riguarda i risultati della valutazione sensoriale eseguita dal gruppo di volontari, tutti gli infusi ottenuti dalle foglie macinate mostrano avere un gusto più amaro e astringente rispetto a quelli preparati dalle foglie intere. Nel complesso, i tè bianchi vengono percepiti come più profumati di quelli verdi e sono stati giudicati come i preferiti dalla maggioranza dei giudici, in particolare gli infusi preparati in acqua fredda da foglie intere. Questo aspetto è in accordo con i risultati ottenuti nel test TPC che mostra che il contenuto polifenolico è più alto nei tè verdi rispetto a quelli bianchi con la conseguenza che i primi risultano più amari.

Queste informazioni possono essere utilizzate per trovare le condizioni ottimali di estrazione per i consumatori, i rivenditori, e i produttori al fine di preparare un buon tè caldo o freddo ricco di sostanze benefiche per la salute.

## 11 LA MELAGRANA

(Faria A. et al., 2010; Stover E. et al., 2007; Holland D. et al., 2009; Mir M. M. et al., 2012; Palmieri J., 2011)

La melagrana (*Punica granatum* L.) è un frutto mistico e antico appartenente alla famiglia delle Punicaceae. Il nome *Punica* è il nome latino di Cartagine, l'antica città nel nord della Tunisia da cui arrivarono le prime melagrane nell'impero romano. Fu Linneo, il famoso classificatore botanico, ad aggiungere successivamente l'epiteto *granatum* per indicare la presenza di numerosi grani all'interno del frutto. La melagrana è una pianta nativa della regione che si estende dall'Himalaya nel nord dell'India all'Iran, ma veniva coltivata, fin dai tempi antichi, anche in tutta la zona mediterranea. La pianta di melograno può essere considerata come un piccolo albero o un grande arbusto mentre il frutto viene ritenuto come una grande bacca che contiene numerosi arili, ciascuno circondato da una membrana traslucida contenente il succo. Dal pericarpo, all'interno del frutto, si estendono delle sottili membrane dal sapore aspro che fungono da sostegno per gli arili.

## 11.1 CULTIVAR

Diverse cultivar di melograno sono state selezionate in tutto il mondo, compresa l'Europa (Spagna, Francia, Italia, Grecia e Cipro), l'Asia (Turchia, Turkmenistan, Kirghizistan, Azerbaigian, Iran, India, Cina, Russia, Israele) e il Nord Africa (Marocco, Tunisia, Egitto). Spesso le caratteristiche dei frutti delle diverse cultivar rispecchiano i gusti e la cultura del popolo dove sono state selezionate. Ad esempio, in India, in genere la frutta acida non è molto amata, e quindi sono state selezionate cultivar prive di acidità. In Israele, la popolazione proveniente dai paesi dell'Europa occidentale preferisce cultivar agrodolci, come la Wonderful mentre gli israeliani provenienti dai paesi del Medio Oriente predilige, in genere, cultivar non acide con semi molto morbidi, come la Malisi.

La maggior parte delle cultivar oggi conosciute sono selezioni di cui non si hanno documentazioni relative alla loro origine.

Possiamo classificare le cultivar in funzione dalla zona di coltivazione come segue.

### *11.1.1 Cultivar Asiatiche*

Le cultivar asiatiche si distinguono in:

- *Indiane* quali la Bhagwa, la Ganesh e la Mridula aventi caratteristiche comuni come un sapore dolce e una bassa acidità e un frutto di piccole-medie dimensioni con la buccia sottile. La Bhagwa è la varietà indiana

maggiormente esportata in Europa ed è considerata la varietà migliore per il consumo fresco. I frutti hanno la buccia e gli arili di un rosso intenso e presentano semi morbidi. Il loro gusto è poco acido e dolce con dimensioni relativamente piccole (da 200 a 300 g). La buccia è relativamente sottile e questo comporta una maggior suscettibilità del frutto a subire danni fisici (<http://www.freshplaza.com/>; <http://www.sunimpex.nl/>);

- *Iraniane* (la Malas-e-Saveh, la Rabab-e-Neyriz, la Malas-e-Yazdi, la Sishe Kape-Ferdos e la Naderi-e-Budrood) con frutti di media-grande taglia, buccia spessa rossa e arili rossi;

- *Cinesi*, caratterizzate da frutti sia piccoli che molto grandi. Il sapore può essere aspro o dolce. Le cultivar cinesi possono essere sia selezioni con origine sconosciuta che esemplari provenienti da altre varietà note;

- *Turche*, come l'Hicaznar, la Izmir e la Silifke, di solito dal sapore aspro e dolce e dal colore rosso. La Hicaznar è la cultivar più coltivata e diffusa in Turchia ed è considerata altamente produttiva. Ha un frutto di calibro medio grande con forma arrotondata e colore rosso-violetto, con semi di colore rosso scuro e intenso; ha un sapore aspro e dolce e i semi sono duri e mediamente succosi, con caratteristiche in qualche modo simili alla Wonderful. Tali proprietà la rendono ottima per la produzione di succo (Holland D. et al., 2009);

- *Israeliane*, di cui ne sono state individuate più di 50 accessioni diverse. Esse differiscono molto sia nell'aspetto esterno che interno dei loro frutti, nella modalità di crescita, nel tempo di maturazione, nel

sapore e nella morbidezza del seme. Il colore della buccia delle cultivar israeliane varia da viola intenso a giallo-rosa, o verde. Le varietà considerate di maggior valore commerciale sono la Wonderful, la Akko, la Shani-Yonay, la Black, la Hershkovich, la Rosh Hapered, e la Malisi, ma tradizionalmente, solo le ultime due e la Red Lufani vengono coltivate. Tra queste, la Rosh Hapered e la Malisi hanno gli arili rosa e sono dolci senza sentori acidi. La Red Lufani è un sinonimo di Wonderful: questa è la cultivar che oggi viene maggiormente coltivata e sembra essere stata importata dagli USA circa cento anni fa. Questa melagrana dai frutti grandi, giunge a maturazione durante i primi di ottobre, è di sapore agro-dolce, con arili e buccia rossa a maturazione completa. Vi sono diversi tipi di Wonderful in Israele che differiscono nelle epoche di maturazione, nel colore esterno, e nelle tempistiche di colorazione delle bucce durante lo sviluppo del frutto, e nel grado di morbidezza dei semi.

### ***11.1.2 Cultivar Europee***

Le cultivar europee sono classificate in base alla provenienza come segue:

- *Spagnole*, in letteratura sono state riportate almeno 40 cultivar e vengono divise in tre gruppi: dolci, agrodolci, e aspre.

La più nota cultivar spagnola è la varietà locale Mollar de Elche, che produce frutti dolci con semi molli e raggiunge la maturazione nei mesi

di ottobre-novembre. Il colore esterno è rosa-rosso e gli arili sono rossi. La varietà Mollar viene raccolta all'inizio dell'autunno (da fine settembre fino alla fine di novembre) e rispetto alla Valenciana, una delle più commercializzate in Europa occidentale, è soggetta a più danni da sole e/o spaccature, ma ha una resa maggiore, un'eccellente qualità della parte interna, dimensioni superiori, un periodo di raccolta più lungo ed un maggior appeal per i consumatori. Proprio a causa delle differenze osservate in termini di qualità e produttività delle piantagioni commerciali, i ricercatori spagnoli hanno selezionato specifici cloni (Stover E. et al., 2007);

- *Italiane*, ne sono state individuate 21 varietà, le quali sono principalmente di dimensioni medio-grandi, esternamente poco colorate, dolci e coltivate esclusivamente al Sud Italia per il consumo fresco. Alcune hanno un nome tradizionale come la *Dente di Cavallo*, mentre altre sono identificate da una sigla. La Dente di Cavallo è una varietà molto antica, parecchio diffusa in Sicilia e presenta lievi differenze a seconda della zona di coltivazione. Ad oggi due varietà che si stanno diffondendo velocemente sono la Akko e la Wonderful, già impiantate in Puglia, Basilicata, Sicilia, Calabria e Campania. In Italia, molte risorse interessanti di germoplasma di melograno sono presenti nei frutteti semi-abbandonati o come piante sparse e le informazioni sulla qualità dei frutti è scarsa. Alcuni studi sono stati effettuati su accessioni locali di piante coltivate in Sicilia e nel Lazio ma non sono noti studi scientifici che caratterizzino approfonditamente le varietà che

si possono trovare nella nostra regione, le Marche (Cristofori V. et al, 2011).

### ***11.1.3 Cultivar Americane***

Le cultivar americane si differenziano come segue:

- *Statunitensi*, costituiscono un numero di cultivar relativamente limitato tra le quali la Wonderful è la varietà più importante. Questa infatti dopo essere stata scoperta in Florida e portata in California intorno al 1896, è stata la prima varietà messa in commercio negli Stati Uniti. Il frutto ha un aspetto esterno molto attraente, con una colorazione rosso brillante: è infatti una delle varietà di melagrana più colorate sia per quanto riguarda la buccia che il succo, è dotata di un gusto ricco, una buona resa in succo che la rende ideale per la spremitura, leggermente acidula e con un sentore leggermente astringente ma dissetante, simile a quello del succo di pompelmo. Diversi amanti delle melagrane la considerano tra le migliori cultivar in quanto a sapore. È inoltre un frutto molto resistente alle crepe che possono sussistere in seguito a piogge sui frutti maturi. Non è ben chiaro se le melagrane Wonderful americane siano geneticamente distinguibili dalle Wonderful israeliane. Il frutto delle Wonderful americane è più duro e si presta meno all'estrazione meccanica degli arili rispetto alle varietà israeliane e queste differenze possono essere ritrovare in ragione di condizioni di crescita diverse. La Wonderful è anche coltivata

nell'Europa occidentale, in Medio Oriente e in Cile (Stover E. et al., 2007).

- *Peruviane*, la Wonderful è la varietà di melograno più prodotta in Perù, anche se le esigenze della pianta non si adattano bene alle condizioni climatiche e al tipo di terreno del paese, le quali causano una scarsa produttività e la rottura dei frutti. Per limitare questi problemi i coltivatori peruviani hanno introdotto sei nuove varietà che si adattano meglio alle condizioni del paese.

#### ***11.1.4 Cultivar Africane***

Le cultivar africane si classificano in:

- *Tunisine*, come la Gabsi (la cultivar principale, dolce), la Tounsi (dolce, che matura più tardi), la Zehri (dolce, matura alla fine di agosto o all'inizio di settembre), la Chefli (dolce con colorazione della buccia scarsa e arili grandi) e la Andalouisi (dolce).

- *Egiziane*, quali l'Arabi, la Manfaloty, la Nab-el-Gamal e la Wardy.

- *Sudafricane*, come la Wonderful, la Acco, la Herkovitz e la Bagwa.

La varietà Herskovitz viene raccolta da fine febbraio a fine marzo e presenta un frutto leggermente più piccolo rispetto a quello della varietà Wonderful e per le sue caratteristiche qualitative è molto usata per il consumo fresco (<http://www.freshplaza.com/>; <http://www.starsouth.biz/>).

## **11.2 COMPOSIZIONE CHIMICA DELLA MELAGRANA**

(Faria A. et al., 2010; Viuda-Martos M. et al., 2010; El-Nemr S.E. et al., 1990; Ravindran P.N. et al., 2004; Holland D. et al., 2009; Mir M. et al., 2012; Palmieri J., 2011)

Il frutto della melagrana può essere diviso in tre parti: i semi (circa il 3% del peso del frutto), il succo (in genere il 30% del peso del frutto) e le bucce che comprendono anche le membrane interne.

Gli arili, rappresentano circa il 52-58% del frutto totale e sono composti per il 78% di polpa e per il 22% di semi. Il colore della polpa varia da bianco a rosso scuro.

In generale, il frutto è costituito principalmente da acqua e carboidrati, anche se sono presenti in minor quantità proteine, lipidi, fibre, ceneri, elementi come Ca, Na, P, K, Mn, Zn, Cu e Se, acidi, vitamine e altre sostanze fitochimiche come gli antiossidanti. Nella Tabella 19 sono indicati i valori nutrizionali (per 100 g di prodotto edule) del frutto che possono variare in base al tipo di cultivar (Codex alimentarius commission, 2009).

Gli zuccheri principali sono il glucosio e il fruttosio ma in misura minore possono essere presenti anche il saccarosio, il maltosio e l'arabinosio. Tra gli acidi, quello predominante varia a seconda dei diversi gruppi varietali; nelle varietà acide e nelle agro-dolci predomina sempre il citrico sul malico, mentre nelle dolci la differenza è sempre

poco rilevante, a volte predomina il malico ed altre il citrico. Anche se con alcune eccezioni, in generale il contenuto in grassi nella frutta è basso e questo vale anche per la melagrana, nella quale i grassi si trovano invece nei semi dai quali è possibile ricavare oli con un alto contenuto di acidi grassi essenziali. Il contenuto di olio nei semi oscilla tra 66 e 193 g/kg, una quantità non sufficiente per l'estrazione industriale, ma interessante dal punto di vista nutrizionale per quelle varietà a seme tenero (masticabile) nelle quali esso viene ingerito, e può così fornire acidi grassi essenziali polinsaturi come linoleico, linolenico e arachidonico e altri componenti minori quali gli steroli, gli steroidi e i cerebrosidi. I minerali, come potassio, calcio, fosforo, magnesio e sodio sono invece contenuti maggiormente nella buccia.

Composizione	Unità di misura	Quantità
Acqua	g	80-82,3
Energia	kcal	63-78
Proteine	g	0,5-0,95
Grassi	g	0,3-0,9
Carboidrati	g	16,4
Fibre	g	0,2-0,6
Ceneri	g	0,5
Fosforo	mg	8
Ferro	mg	0,3
Potassio	mg	258
Calcio	mg	3
Sodio	mg	3
Manganese	mg	3
Zinco	mg	0,12
Magnesio	mg	0,15
Rame	mg	0,07
Selenio	mg	0,6
Acido pantotenico	mg	0,596
Vitamina B1	mg	0,03
Vitamina B2	mg	0,03
Vitamina B3	mg	0,03
Vitamina C	mg	4-6

Tabella 19: Valori nutrizionali della melagrana.

### ***11.2.1 Antiossidanti***

I principali antiossidanti che troviamo nella melagrana sono i polifenoli. L'80% dei polifenoli è costituito da punicalagine (Figura 91), cioè una classe di tannini idrolizzabili di massa molare 1084 g/mol formati da isomeri complessi del glucosio legati ad acido ellagico e acido gallico; i numerosi gruppi ossidrilici presenti nella molecola, le conferiscono una spiccata capacità antiossidante (Figura 91).

L'acido ellagico (Figura 91) che viene prodotto dal metabolismo delle punicalagine è un fenolo naturale con attività antiossidante che si trova anche in altri frutti e vegetali. Esso è il dilattone dell'acido esaidrossidifenico e ha proprietà antiproliferative e antiossidanti nei confronti di diversi modelli in vitro e piccoli animali. Le proprietà antiproliferative possono essere dovute alla sua capacità di inibire direttamente il legame con il DNA di alcune sostanze cancerogene, incluse le nitrosammine e gli idrocarburi policiclici aromatici. Inoltre, come altri polifenoli antiossidanti, l'acido ellagico ha un effetto chemioprotettivo in modelli cellulari in quanto riduce lo stress ossidativo. Tali proprietà hanno generato interesse per i potenziali benefici per la salute umana che possono derivare dal suo consumo.

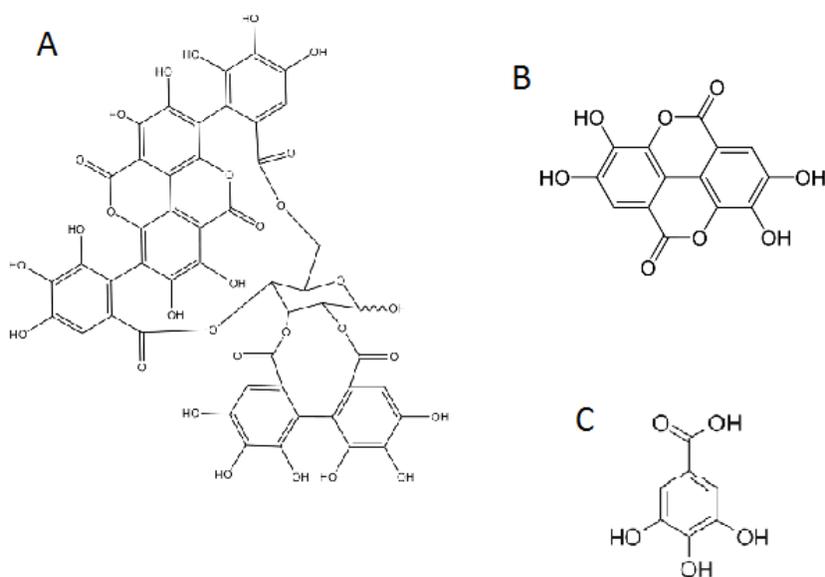


Figura 91: Struttura chimica della punicalagina (A), dell'acido ellagico (B) e dell'acido gallico (C).

L'acido gallico o acido triidrossibenzoico (Figura 91) è invece un acido organico contenuto in molti prodotti di origine vegetale e rientra nella categoria degli acidi fenolici; esso ha azione antiossidante. In campo medico, l'acido gallico è un potente antiemorragico ed è utilizzato nei casi di menorragia. Alcuni suoi esteri (etilico, propilico, ottilico, ecc.) sono ampiamente utilizzati come conservanti alimentari ad azione antiossidante.

Il succo di melograno attualmente commercializzato contiene anche flavonoidi, come la quercetina e il caempeferolo, flavoni come la luteolina e le antocianine (Figura 92), che danno il colore rosso alla

melagrana (cianidina-3-glucoside, delphinidina-3-glucoside, pelargonidina-3,5- diglucoside, cianidina-3,5-diglucoside, delphinidina-3,5-diglucoside).

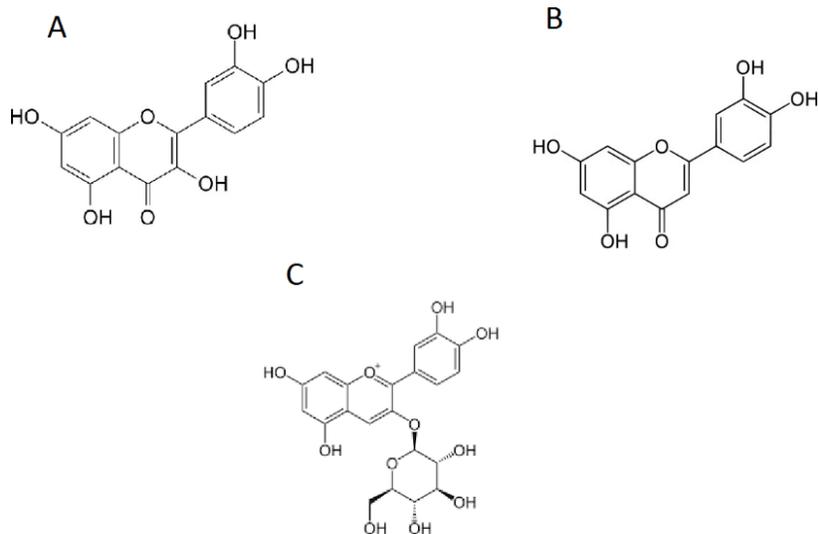


Figura 92: Struttura chimica di quercetina (A); luteolina (B), antocianine (C).

Naturalmente le concentrazioni di questi composti possono variare a seconda della varietà e della zona di coltivazione ma anche in base alla modalità di spremitura dei frutti. Durante la produzione industriale del succo l'utilizzo dei soli arili o del frutto intero comprese le bucce, può influenzare il contenuto di polifenoli e di conseguenza l'attività antiossidante del succo.

### 11.3 CARATTERISTICHE SENSORIALI

Nonostante l'aumento dell'importanza commerciale della melagrana, specialmente per le recenti scoperte dei suoi effetti benefici sulla salute, poco si conosce delle sue caratteristiche sensoriali o dei composti che le determinano. I composti volatili, responsabili delle sensazioni retroolfattive comprendono gli esteri, le aldeidi, i terpeni, gli alcoli e i furani. I gusti principali del succo di melagrane sono: il dolce, dovuto dalla presenza principalmente di glucosio e fruttosio e di altri zuccheri minori; l'acido, naturalmente dovuto dalla presenza di acidi, principalmente l'acido citrico e l'acido malico, ma anche da quantità minori di altri acidi come l'acido succinico, l'acido ossalico, l'acido tartarico e l'acido ascorbico; e in misura minore l'amaro, che può derivare dalla presenza di un alto contenuto di polifenoli. L'astringenza è invece una sensazione al palato che può essere suscitata dall'assunzione di frutti acerbi che contengono tannini idrolizzabili, che si legano alle proteine salivari, causando la loro precipitazione o aggregazione e portando così a una sensazione di secchezza e rugosità nella bocca. Il principale tannino idrolizzabile presente nella melagrana, responsabile dell'astringenza, è la punicalagina.

Anche la durezza del seme è un importante attributo sensoriale delle melagrane coltivate per il consumo fresco: i semi possono essere difficili da masticare e di conseguenza compromettere la soddisfazione dei consumatori. In funzione della durezza del seme, i genotipi di melograno sono suddivisi in tre classi principali: a seme sofficе,

semiduro e duro. In diversi studi su nuove varietà di melograno, è stato chiaramente dimostrato che le varietà con semi morbidi hanno raggiunto un punteggio di valutazione sensoriale superiore rispetto a quelli con i semi duri (Mayuoni-Kirshinbaum L. et al., 2014).

## **11.4 EFFETTI BENEFICI**

(Ismail T. et al., 2012; Viuda-Martos M. et al., 2010)

Nel corso degli ultimi anni, gli studi effettuati hanno confermato alcune delle proprietà delle melagrane utilizzate negli usi tradizionali di tale frutto (agente antiparassitario, per curare afte, diarrea e ulcere) ed è aumentato notevolmente l'interesse nei confronti delle sue proprietà salutistiche.

Il rapporto tra i costituenti chimici della melagrana e i loro effetti farmacologici deve però ancora essere pienamente compreso. Tuttavia, in questi ultimi anni sono stati compiuti progressi significativi sull'identificazione dei composti e sulla comprensione dei meccanismi farmacologici che sono alla base dei suddetti effetti.

Diversi studi dimostrano che la melagrana possiede delle proprietà benefiche sulla salute quali l'attività antiossidante, antitumorale, antidiabetica, antiinfiammatoria, antimicrobica svolgendo un ruolo preventivo nei confronti delle malattie cardiovascolari.

L'attività antiossidante del succo di melagrana si ritiene possa essere attribuita alla presenza di polifenoli come le punicalagine e l'acido gallico, e le punicalagine e le punicaline sembra che siano anche responsabili dell'attività antiinfiammatoria. I polifenoli sono inoltre i principali composti della melagrana che danno attività antidiabetica e gli ellagitannini, la punicalagina, l'acido ellagico e l'acido gallico hanno dimostrato avere anche un effetto battericida e antivirale.

La determinazione dell'attività antiossidante dei frutti del melograno e dei suoi derivati è diventato quindi un target importante per i ricercatori e per i produttori agroalimentari per lo studio delle proprietà benefiche e il suo possibile utilizzo come additivo naturale, in sostituzione gli antiossidanti sintetici.

## **11.5 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI SUCCHI DI ARILI E DI POLPE DI MELAGRANE DI DIVERSA CULTIVAR E ORIGINE GEOGRAFICA**

Questa ricerca nasce con lo scopo di compiere un'indagine quantitativa dell'attività antiossidante di succhi di arili e di polpe di melagrane di diverse cultivar e diversa origine geografica.

I risultati di questo studio sono stati presentati al congresso Foodomics svoltosi a Cesena nel 2015 e alla giornata studio organizzata dal CRA a Roma nel 2014.

### ***11.5.1 Campioni***

Per questo studio sono state selezionate 5 cultivar note (Mollar, Wonderful, Hicaznar, Herskovitz, Bhagwa), 1 varietà tunisina non identificata e 4 accessioni locali di melagrane. Queste ultime sono state raccolte presso appezzamenti di terreno nelle Marche mentre tutte le altre sono state acquistate presso mercati locali e provengono non solo dall'Italia ma anche da paesi esteri come Spagna, Israele, Egitto, USA, Turchia, India, Sud Africa, Perù e Tunisia. I campioni differiscono quindi sia per cultivar che per zona di produzione (Figura 93).

Come confronto, sono stati analizzati anche dei campioni di succo commerciale biologico al 100% di melagrana in bottiglia, di succo fresco commerciale di arancia rossa conservato in frigo, e di spremuta di arance rosse di Sicilia IGP.

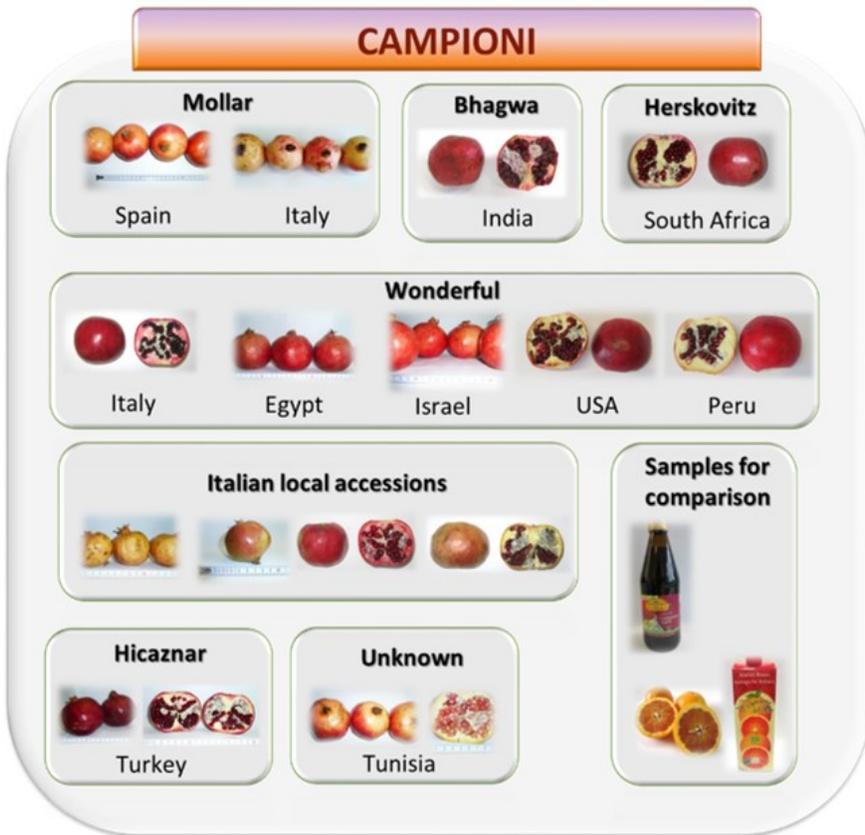


Figura 93: Cultivar e provenienza geografica dei campioni di melagrane e dei campioni di riferimento (succhi imbottigliati di melograno e arancia e spremuta fresca di arance) oggetto dello studio.

Di seguito la descrizione dettagliata dei campioni in esame.

Cultivar: Mollar

*Origine: Spagna (MS01 e MS02)*

Le melagrane Mollar provenienti dalla Spagna presentano una buccia di consistenza normale con una colorazione rosso chiaro sfumata al giallo, arili di consistenza farinosa, rosso rubino e seme interno bianco. Sono state reperite in due Ipermercati locali.

*Origine: Italia (MI01 e MI02)*

Le melagrane Mollar sono state reperite in un frutteto locale situato nella provincia di Pesaro-Urbino. I due campioni sono stati raccolti in due diversi momenti. Presentano una buccia di consistenza normale con una colorazione prevalentemente gialla chiara con sfumature rosso-rosa, arili mediamente duri, rosso rubino e seme interno bianco.

Cultivar: Wonderful

*Origine: Israele (WI)*

Le melagrane Wonderful provenienti da Israele presentano una buccia mediamente spessa con una colorazione sfumata dal giallo al rosso al rosa, arili mediamente duri, dal rosso rubino al rosso sfumato di giallo-rosa e seme interno bianco. Sono state reperite in un Ipermercato locale.

*Origine: Egitto (WE)*

Le melagrane Wonderful provenienti dall'Egitto presentano una buccia di consistenza normale con una colorazione rossa sfumata al viola, arili

duri sfumati dal rosso-rosa al rosso rubino e seme interno bianco. Sono state reperite al Mercato Ortofrutticolo locale.

*Origine: USA (WU)*

Le melagrane Wonderful provenienti dagli USA presentano una buccia di consistenza normale con una colorazione sfumata dal rosso al rosa, arili duri rosso rubino e seme interno bianco. Sono state reperite in un Ipermercato locale.

*Origine: Perù (WP)*

Le melagrane Wonderful provenienti dal Perù presentano una buccia di consistenza normale non troppo spessa, con una colorazione rossa con sfumature gialle, arili molto duri rosso rubino e seme interno bianco. Sono state reperite in un Ipermercato locale.

*Origine: Italia (WIT)*

Le melagrane Wonderful provenienti dall'Italia presentano una buccia spessa, con una colorazione rossa con leggere sfumature gialle, arili rosso rubino tendenti al nero. Sono state reperite in un ipermercato locale.

#### Cultivar: Accessioni Locali

*Origine: Arcevia (A01)*

Questa accessione locale è stata reperita in un giardino privato ad Arcevia in provincia di Ancona. Presentano una buccia piuttosto spessa di colore giallo con lievi sfumature rosa, arili molto duri rosso rubino e seme interno bianco.

*Origine: Ancona (A02)*

Questa accessione locale è stata reperita in un giardino pubblico situato nella zona del Parco del Conero di Ancona (Pietralacroce). Presentano una buccia di consistenza normale con una colorazione rossa chiara sfumata di verde, arili duri, rosso rubino e seme interno bianco.

*Origine: Ancona (A03)*

Questa accessione locale è stata reperita in un giardino privato situato nella zona del Parco del Conero di Ancona (Pietralacroce). Presentano una buccia poco spessa, con una colorazione gialla, arili duri, rosso rubino e seme interno bianco.

*Origine: Arcevia (A04)*

Questa accessione locale è stata reperita in un giardino privato ad Arcevia in provincia di Ancona. Presentano una buccia spessa con una colorazione rossa con sfumature rosa e gialle, arili duri rosso intenso e seme bianco.

Cultivar: Hicaznar

*Origine: Turchia (HT)*

Le melagrane Hicaznar provenienti dalla Turchia presentano una buccia di consistenza normale con una colorazione rosso porpora e una polpa gialla, arili duri, rosso sangue e seme interno bianco. Sono state reperite al Mercato ortofrutticolo locale.

Cultivar: Bhagwa

*Origine: India (BI)*

Le melagrane Bhagwa provenienti dall'India presentano una buccia non molto spessa di colore rosso e arili rosso intenso non molto duri, rispondenti alle caratteristiche generali della varietà. Sono state reperite in un Ipermercato locale.

Cultivar: Herskovitz

*Origine: Repubblica Sudafricana (HS)*

Le melagrane provenienti dalla Repubblica Sudafricana presentano una buccia spessa con una colorazione rossa piuttosto uniforme, arili molto duri rosso rubino e seme interno bianco. Sono state reperite in un Ipermercato locale.

Cultivar sconosciuta

*Origine: Tunisia (UT)*

Le melagrane provenienti dalla Tunisia presentano una buccia spessa con una colorazione sfumata dal rosso, al rosa, al giallo, arili mediamente duri, dal bianco al rosa chiaro e seme interno bianco. Sono state reperite al Mercato Ortofrutticolo locale.

*Succo di melograno biologico 100% non ricostituito (BOP)*

Il succo commerciale biologico di melagrana al 100% non ricostituito è stato acquistato in un negozio specializzato in articoli biologici situato ad Ancona ed è un prodotto ottenuto senza l'utilizzo di succo concentrato.

*Succo di melograno biologico 100% da concentrato (BOPC)*

Il succo commerciale biologico di melagrana al 100% da succo concentrato è stato acquistato in un negozio specializzato in articoli biologici situato ad Ancona.

*Succo di arancia biologico (BOJ)*

Il succo commerciale biologico di arance rosse al 100% è stato acquistato in un Ipermercato situato ad Ancona, era conservato nel banco frigo ed è ottenuto dalla spremitura di arance fresche.

*Succo di Arance di Sicilia IGP (OJ)*

Il succo di arance preparato da noi, è stato ottenuto dalla spremitura di Arance rosse fresche di Sicilia IGP varietà Tarocco Gallo CAL5Cat(I), che sono state reperite in un Supermercato Locale.

## ***11.5.2 Materiali e metodi***

### ***11.5.2.1 Preparazione dei campioni***

I frutti sono stati conservati, per tutta la fase di preparazione dei campioni, a temperatura ambiente. Ogni campione è stato trattato con lo stesso metodo e con la stessa serie di operazioni entro due giorni dall'acquisto. Sono stati selezionati per ogni campione almeno due frutti maturi non deteriorati.

Le melagrane sono state lavate, asciugate e pesate ed è stato quindi misurato il loro diametro. Il frutto è stato sbucciato e gli arili sono stati separati manualmente dalle bucce e dalle polpe, eliminando quelli più danneggiati. Prima dell'estrazione del succo effettuata mediante una centrifuga domestica, è stata eseguita una sommaria valutazione sensoriale degli arili. Il succo ottenuto dagli arili è stato porzionato e conservato a -20°C fino all'esecuzione delle analisi. Il succo ottenuto dalle bucce e dalle polpe è stato centrifugato a 7000 giri per 15 minuti per eliminare l'eventuale residuo solido prima di essere porzionato e conservato a -20°C.

### 11.5.2.2 *Contenuto in Polifenoli Totali (TPC)*

Il contenuto fenolico totale nei campioni di succo di melagrane è stato determinato utilizzando il reagente Folin-Ciocalteu (Singleton V. L. et al., 1999) il cui principio è descritto nel paragrafo 5.2.3.

Per l'analisi in ogni pozzetto di una piastra trasparente a 96 pozzetti sono stati introdotti 150  $\mu\text{l}$  di reagente di Folin-Ciocalteu, diluito 10 volte e quindi, 50  $\mu\text{l}$  di succo di arile diluito 50 volte in acqua (2% v/v) oppure, di succo di bucce e polpe diluito 1000 volte in acqua (0.1% v/v) oppure come standard, di una soluzione di acido gallico 60 mM in etanolo opportunamente diluita (0-1.0 mM in acqua) oppure come bianco, di acqua. La piastra è stata agitata per 10 secondi ed è stata lasciata riposare al buio per 10 minuti. In ogni pozzetto, sono stati quindi aggiunti 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10% e la piastra dopo essere stata agitata è stata lasciata riposare al buio per 120 minuti a temperatura ambiente. Trascorso tale tempo è stata letta l'assorbanza a 760 nm, rispetto al bianco, utilizzando lo spettrofotometro a piastre Synergy HT, Biotek. I risultati sono espressi come concentrazione mM di Acido Gallico Equivalenti (GAE) utilizzando una retta di taratura costruita dall'analisi di soluzioni diluite di acido gallico (0-170  $\mu\text{M}$ ).

### 11.5.2.3 *Attività antiossidante*

#### **Test ABTS**

L'attività antiossidante dei diversi campioni di succhi di melagrana è stata determinata utilizzando il test ABTS (Re R. et al., 1999), basato sulla capacità degli antiossidanti di decolorare una soluzione di radicale catione ABTS (per approfondimenti vedere paragrafo 5.2.1). Circa 12 - 16 ore prima dell'analisi è stato preparato il radicale catione colorato (ABTS<sup>•+</sup>) come descritto nel paragrafo 8.2.2.2 – saggio ABTS; questo è stato quindi diluito circa 50 volte subito prima dell'analisi. Per il saggio in ciascun pozzetto di una piastra trasparente a 96 pozzetti sono stati introdotti 30 µl di succo di arile diluito al 1% v/v in acqua o di succo di bucce e polpe diluito al 0.01% v/v in acqua, o di una soluzione di Trolox 1.8 mM (in etanolo) opportunamente diluita (0 – 0.30 mM in acqua) come standard, o di acqua come controllo; a questi sono stati quindi aggiunti 270 µl di soluzione di ABTS<sup>•+</sup> diluita o di acqua come bianco. La piastra è stata agitata per 10 secondi e lasciata per 120 minuti al buio a temperatura ambiente, prima di leggere l'assorbanza della soluzione a 734 nm contro il bianco con l'ausilio dello spettrofotometro a piastre Synergy HT, Biotek. L'attività antiossidante è stata determinata come percentuale di inibizione (paragrafo 5.2.1). I risultati sono stati espressi come concentrazione mM di Trolox Equivalenti (mM TXE) utilizzando una retta di taratura costruita dall'analisi di soluzioni diluite di Trolox (0-30 µM).

## Test ORAC

Il saggio ORAC si basa sulla procedura messa a punto da (Ou B. et al., 2001) e descritta nel paragrafo introduttivo 5.1.2.1. Per il saggio tutte le soluzioni sono state preparate in tampone fosfato 75 mM a pH 7.4. L'analisi è stata effettuata utilizzando una piastra nera a 96 pozzetti, dove sono stati introdotti 25  $\mu$ l di succo di arile diluito allo 0.25% v/v in tampone, o di succo di bucce e polpe diluito allo 0.01% v/v in tampone o di una soluzione di Trolox 0.45 mM in etanolo opportunamente diluita (4.5 – 62.0  $\mu$ M in tampone) come standard, o di tampone come controllo; a questi sono stati addizionati 150  $\mu$ l di una soluzione di fluoresceina 4  $\mu$ M diluita 1:500 in tampone preparata immediatamente prima dell'uso. La piastra è stata agitata per 10 secondi ed è stata incubata a 37°C per 30 minuti al buio, dopo di che, per innescare la reazione di perossidazione, in ogni pozzetto sono stati introdotti 75  $\mu$ l di una soluzione di AAPH 25 mM (in tampone) preparata di fresco. Immediatamente dopo l'aggiunta dell'iniziatore la piastra è stata velocemente agitata ed è stato monitorato il decadimento della fluorescenza ogni 2 minuti per 120 min a 37°C, utilizzando una eccitazione a 485 nm (banda 20 nm), una emissione a 528 nm (banda 20 nm) e mantenendo il gain fisso pari a 100, contro il bianco (Tampone).

I risultati sono stati espressi in concentrazione mM di Trolox Equivalenti (mM TXE) utilizzando una retta di taratura costruita dall'analisi di soluzioni diluite di Trolox (0- 6.5  $\mu$ M).

### Test Antociani (TAC)

Il saggio per la determinazione degli antociani si basa sulla procedura descritta da Giusti M.M. et al. nel 2001.

L'analisi è stata effettuata utilizzando una piastra trasparente a 96 pozzetti, dove sono stati introdotti 25 µl di succo di arile tal quale, o di succo di bucce e polpe tal quale ai quali sono stati addizionati 275 µl di una soluzione di tampone a pH 1 di KCl 0.025 M oppure di soluzione tampone di CH<sub>3</sub>COONa 0.4 M a pH 4.5. La piastra è stata agitata per 10 secondi ed è stata riposta al buio a temperatura ambiente per 15 minuti. Trascorso tale tempo la piastra è stata agita e sono state lette le assorbanze a 520 nm e a 700 nm contro il bianco (300 µl di acqua distillata) utilizzando lo spettrofotometro a piastre Synergy HT, Biotek. La concentrazione di antocianine (TAC = Total Anthocyanin Content), espressa come cianidina-3-glucoside equivalenti, è stata calcolata dalla seguente formula:

$$\text{TAC (mg/l)} = A \times \text{PM} \times \text{DF} \times 1000 / (\epsilon \times l)$$

Dove:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

PM = peso molecolare della cianidina-3-glucoside (449.2 g/mol)

DF = fattore di diluizione (12)

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare della cianidina-3-glucoside (26900 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

l = percorso della cella (0.844 cm).

### **Determinazione del pH**

Il pH dei succhi di arili o di polpe tal quali è stato misurato attraverso il pHmetro (Eutech pH 700).

### **Determinazione dei Solidi Solubili Totali**

La determinazione del grado zuccherino è stata effettuata per mezzo di un rifrattometro (Mettler-Toledì Refracto 30PX), uno strumento di misura ottico che determina la variazione dell'indice di rifrazione di una sostanza all'aumentare della sua densità, che nel nostro caso varia con il contenuto in zuccheri.

A tale scopo è stata posta una goccia di succo di melograno tra i due prismi del rifrattometro e nell'oculare dello strumento è stata letta la percentuale di zuccheri espressa in gradi Brix (da 0° a 35° Brix con intervalli di 0.2 unità) che indicano i grammi di zucchero per ml di succo. I valori osservati nell'oculare sono stati poi corretti per la temperatura seguendo una tabella di riferimento in dotazione con lo strumento.

#### 11.5.2.4 *Analisi dei dati*

In tutti gli esperimenti descritti sono stati eseguiti gli appropriati controlli. Per scartare i dati anomali, è stata effettuata un'analisi esplorativa preliminare utilizzando i box plot, sulla base delle mediane e dei quartili (Pellerano R. G. et al., 2012). I risultati del test TPC,

ABTS, ORAC e degli antociani sono stati espressi come valori medi di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in quadruplica ( $n = 3$ ) ed è stata indicata la deviazione standard. I risultati dei solidi solubili totali rappresentano la media aritmetica di almeno due esperimenti indipendenti di ciascun campione ( $n = 2$ ).

Tutte le elaborazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il software XLSTAT (Addinsoft SARL).

### ***11.5.3 Risultati***

Nella Tabella 20 sono riportate le rese in succo di arili e di quelli di buccia e polpa, la circonferenza e il peso medio dei frutti di melagrane; nella Tabella 21 invece è presente una sommaria descrizione sensoriale degli arili dei campioni di melagrana analizzati. La resa del succo degli arili delle melagrane varia dai 20 al 55 ml/100 g di frutto fresco mentre quella in succo di buccia e polpa è di solito molto inferiore e varia dai 6 ai 20 ml/100 g di frutto fresco. La circonferenza media dei frutti di melagrana presi in esame varia da 23.9 cm a 33.2 cm e il peso medio da 169.8 g a 553.7 g. Dall'osservazione di questi dati emerge che le cultivar che mostrano i frutti con dimensioni maggiori sono la Wonderful, l'Hicaznar e la varietà sconosciuta tunisina.

CAMPIONE	VARIETÀ	CODICE	RESA	RESA	CIRCONF ERENZA MEDIA (cm)	PESO MEDIO (g)
			SUCCO ARILI (ml/100 g frutto fresco)	SUCCO POLPA (ml/100 g frutto fresco)		
MOLLAR SPAGNA	MOLLAR	MS01	26	10	24.8	232.7
MOLLAR SPAGNA		MS02	33	06	28.4	353.4
MOLLAR ITALIA (MARCHE)		MI01	27	11	27.6	297.6
MOLLAR ITALIA (MARCHE)		MI02	22	12	23.8	200.8
WONDERFUL ISRAELE	WONDEFUL	WI	23	10	32.5	463.5
WONDERFUL EGITTO		WE	29	06	29.1	347.0
WONDERFUL USA		WU	33	06	31.8	486.2
WONDERFUL PERU		WP	20	18	25.6	262.3
WONDERFUL ITALIA (PUGLIA)		WIT	29	16	33.1	553.7
ARCEVIA	ACCESSIONI LOCALI	A01	23	12	28.3	320.6
ANCONA		A02	27	10	23.9	224.1
ANCONA		A03	25	08	26.1	246.0
ARCEVIA		A04	55	20	21.5	162.8
HICAZNAR TURCHIA	HICAZNAR	HT	28	11	32.3	498.4
BHAGWA INDIA	BHAGWA	BI	29	07	24.0	228.2
HERSKOVITZ SUD AFRICA	HERSKOVITZ	HS	28	11	28.4	319.4
TUNISIA	IGNOTA	UT	31	08	33.2	529.3

Tabella 20: Resa in succo degli arili e delle polpe, circonferenza e peso medio dei campioni di melagrana analizzati.

SENSORIALE NOTE DISCRIMINANTI						
CAMPIONE	VARIETÀ	COD.	ACIDITÀ	ASTRINGENZA	DOLCEZZA	SEME INTERNO ARILE
MOLLAR SPAGNA	MOLLAR	MS01	ASSENTE	ASSENTE	FORTE SENTORE FRUTTI ROSSI	FARINOSO
MOLLAR SPAGNA		MS02	ASSENTE	ASSENTE	PRESENTE	FARINOSO
MOLLAR ITALIA (MARCHE)		MI01	ASSENTE	ASSENTE	LEGGERA	MEDIAMENTE DURO
MOLLAR ITALIA (MARCHE)		MI02	ASSENTE	ASSENTE	LEGGERA	MEDIAMENTE DURO
WONDERFUL ISRAELE	WONDEFUL	WI	PRESENTE	ASSENTE	LEGGERA	MEDIAMENTE DURO
WONDERFUL EGITTO		WE	LEGGERA	ASSENTE	ASSENTE	MEDIAMENTE DURO
WONDERFUL USA		WU	POCO	LEGGERA	LEGGERA	DURO, LAMELLARE
WONDERFUL PERU		WP	MOLTO PRESENTE	LEGGERA	ASSENTE	MOLTO DURO, LAMELLARE
WONDERFUL ITALIA (PUGLIA)		WIT	MEDIAMENTE PRESENTE	ASSENTE	LEGGERA	MEDIAMENTE DURO, LAMELLARE
ARCEVIA	ACCESSIONI LOCALI	A01	POCO PRESENTE	LEGGERA	ASSENTE	MEDIAMENTE DURO, LAMELLARE
ANCONA		A02	ASSENTE	LEGGERA	LEGGERA	DURO
ANCONA		A03	PRESENTE	ASSENTE	ASSENTE	DURO
ARCEVIA		A04	SI	MEDIA	ASSENTE	DURISSIMO
HICAZNAR TURCHIA	HICAZNAR	HT	PRESENTE	LEGGERA	MEDIA	DURO
BHAGWA INDIA	BHAGWA	BI	ASSENTE	ASSENTE	MEDIO- BASSA	MEDIAMENTE DURO, LAMELLARE
HERSKOVITZ SUD AFRICA	HERSKOVITZ	HS	MOLTO PRESENTE	ASSENTE	LEGGERA	MOLTO DURO, LAMELLARE
TUNISIA	IGNOTA	UT	PRESENTE	ASSENTE	MEDIA	MEDIAMENTE DURO

Tabella 21: Sommaria valutazione sensoriale degli arili dei campioni di melagrane prese in esame.

### 11.5.3.1 *Contenuto in Polifenoli Totali (TPC)*

Come si può osservare dal grafico (Figura 94) e dalla Tabella 22 relativi ai risultati ottenuti dal saggio di Folin-Ciocalteu, il contenuto di polifenoli risulta molto più elevato (circa 30 volte) nei succhi estratti dalla buccia e polpa delle melagrane (a destra) piuttosto che nei succhi estratti dagli arili (a sinistra).

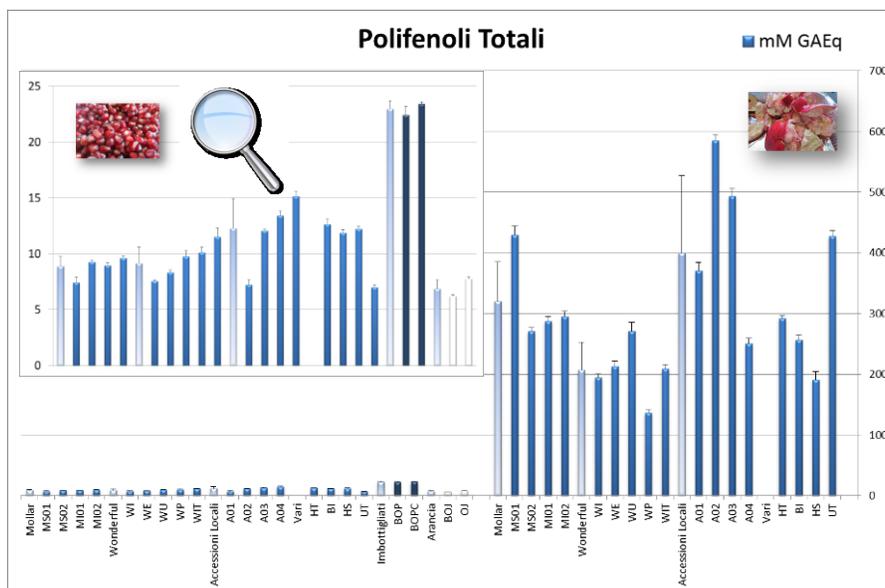


Figura 94: Contenuto in polifenoli totali (TPC) di succhi di melagrana di arili (a sinistra) e di bucce e polpe (a destra) e di succhi commerciali.

<b>CODICE CAMPIONI</b>	<b>FOLIN mM GAE/succo</b>	<b>ABTS mM TXE/succo</b>	<b>ORAC mM TXE/succo</b>
<b><u>ARILI</u></b>			
<b>MOLLAR</b>	<b>8.68 ± 1.43</b>	<b>14.27 ± 3.67</b>	<b>12.13 ± 1.99</b>
MS01	6.56 ± 0.46	8.80 ± 0.73	11.19 ± 0.49
MS02	9.16 ± 0.25	15.55 ± 0.40	15.11 ± 2.00
MI01	9.28 ± 0.40	16.40 ± 0.68	11.17 ± 1.17
MI02	9.70 ± 0.42	16.34 ± 0.49	11.06 ± 0.99
<b>WONDERFUL</b>	<b>9.25 ± 1.22</b>	<b>16.51 ± 4.02</b>	<b>17.18 ± 5.73</b>
WI	7.61 ± 0.23	12.15 ± 0.50	9.54 ± 1.06
WE	8.39 ± 0.21	13.46 ± 0.49	13.07 ± 0.77
WU	9.88 ± 0.99	17.36 ± 1.17	18.65 ± 2.21
WP	10.63 ± 0.41	17.15 ± 0.89	21.72 ± 0.94
WIT	9.72 ± 0.22	22.45 ± 1.20	22.94 ± 2.63
<b>ACCESSIONI</b>	<b>11.72 ± 2.96</b>	<b>21.19 ± 5.70</b>	<b>14.70 ± 2.19</b>
A01	7.41 ± 0.70	13.73 ± 1.27	11.49 ± 0.97
A02	12.18 ± 0.39	20.62 ± 0.68	15.08 ± 0.85
A03	13.49 ± 0.31	23.02 ± 0.67	16.09 ± 1.11
A04	13.80 ± 0.78	27.37 ± 1.58	16.15 ± 0.97
<b>VARI</b>			
HT	12.72 ± 0.35	20.83 ± 0.70	16.65 ± 2.04
BI	11.45 ± 0.82	22.37 ± 0.59	22.23 ± 1.00
HS	12.17 ± 0.80	20.54 ± 0.64	24.14 ± 0.76
UT	7.05 ± 0.22	11.49 ± 0.48	8.06 ± 1.91
<b>IMBOTTIGLIATI</b>			
BOP	22.57 ± 0.77	42.96 ± 3.11	23.65 ± 3.24
BOPC	23.49 ± 0.84	48.52 ± 4.97	30.62 ± 2.15
<b>ARANCIA</b>			
BOJ	6.26 ± 0.27	5.55 ± 0.94	11.21 ± 1.24
OJ	7.80 ± 0.19	5.66 ± 1.89	10.55 ± 0.98

<b><u>POLPA</u></b>			
<b>MOLLAR</b>	<b>326.34 ± 80.58</b>	<b>903.52 ± 230.99</b>	<b>349.52 ± 79.88</b>
MS01	445.47 ± 11.79	1246.20 ± 121.47	463.77 ± 44.48
MS02	268.04 ± 4.13	741.03 ± 18.46	295.77 ± 34.41
MI01	291.60 ± 2.21	814.02 ± 48.20	345.45 ± 20.09
MI02	300.24 ± 3.31	812.83 ± 27.95	293.09 ± 27.60
<b>WONDERFUL</b>	<b>203.74 ± 51.48</b>	<b>647.80 ± 114.99</b>	<b>251.96 ± 64.62</b>
WI	192.98 ± 3.59	578.48 ± 35.08	202.22 ± 19.30
WE	217.06 ± 4.34	617.22 ± 29.49	355.85 ± 49.43
WU	268.20 ± 14.61	812.74 ± 54.56	272.82 ± 23.67
WP	126.04 ± 4.86	520.87 ± 116.06	204.75 ± 27.81
WIT	214.42 ± 7.95	709.69 ± 95.87	224.16 ± 36.42
<b>ACCESSIONI</b>	<b>432.12 ± 143.57</b>	<b>1294.06 ± 347.60</b>	<b>437.34 ± 139.85</b>
A01	380.39 ± 5.24	1151.11 ± 154.01	390.07 ± 33.15
A02	584.44 ± 9.49	1697.81 ± 26.85	580.98 ± 24.74
A03	506.13 ± 12.29	1432.93 ± 24.92	513.98 ± 22.53
A04	257.52 ± 14.21	894.38 ± 112.82	264.33 ± 26.54
<b>VARI</b>			
HT	289.27 ± 4.30	821.63 ± 33.59	297.73 ± 19.63
BI	248.95 ± 9.89	825.45 ± 98.30	252.97 ± 7.66
HS	194.17 ± 10.01	749.29 ± 89.78	224.97 ± 29.82
UT	425.99 ± 9.02	1219.78 ± 33.10	379.90 ± 81.39

Tabella 22: Contenuto fenolico totale (TPC) e attività antiossidante ottenuta mediante i test (ABTS e ORAC) di succhi di arili e di polpe di diverse cultivar provenienti da varie zone geografiche.

In particolare prendendo in esame i valori medi che si ottengono mediando i risultati ottenuti dall'analisi di succhi provenienti da melograni della stessa cultivar ma coltivati in paesi diversi si ottiene

che il contenuto in polifenoli aumenta nel seguente ordine: Mollar  $\leq$  Wonderful < Accessioni locali.

Per quanto riguarda le varietà di cui abbiamo un solo campione (Hicaznar, Bhagwa, Herskovitz e Tunisina), le prime tre mostrano un contenuto in polifenoli abbastanza alto e tra loro paragonabile, mentre il campione proveniente dalla Tunisia, di varietà ignota, mostra un contenuto in polifenoli molto inferiore rispetto agli altri campioni; dall'analisi visiva si nota che tale campione presenta arili molto chiari. Confrontando i succhi ottenuti dagli arili con i due succhi di melagrana imbottigliati, 100% biologici (di cui uno ricostituito da concentrato), presi come riferimento, aventi una colorazione marrone scuro, è risultato che questi ultimi hanno un contenuto in polifenoli, molto più spiccato rispetto a tutti gli altri.

Passando ad analizzare i risultati ottenuti dall'analisi dei succhi di bucce e polpe, si nota che il contenuto in polifenoli totali dei succhi di polpa è tendenzialmente superiore nei campioni Mollar rispetto ai Wonderful. Il contenuto in polifenoli totali delle accessioni locali risulta, invece, essere superiore di quello ottenuto dai campioni delle cultivar Mollar e Wonderful anche per il succo di polpa.

Inoltre, i succhi di polpa delle varietà Hicaznar, Bhagwa, Herskovitz e quella di origine tunisina mostrano un alto contenuto di polifenoli. Quest'ultima in particolar modo, spicca tra le altre in quanto mostra contenere una elevata concentrazione di polifenoli a differenza del succo degli arili che erano scarsamente colorati e ne contenevano pochi.

### 11.5.3.2 *Attività Antiossidante*

#### **Test ABTS**

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dall'analisi dell'attività antiossidante misurata per mezzo del test ABTS e mostrati nella Figura 95 e in Tabella 22, possiamo osservare che l'andamento è analogo a quello ottenuto per il contenuto in polifenoli totali ( $r = 0.99055$ ).

Riassumendo, dai risultati ottenuti dal succo di arili si evince il seguente andamento: Succhi di Arancia < Tunisia < Mollar  $\leq$  Wonderful < Herskovitz  $\leq$  Hicaznar  $\leq$  Accessioni locali  $\leq$  Bhagwa < Succhi melograno imbottigliati.

Per i succhi ottenuti dalle polpe e bucce, l'attività antiossidante varia nell'ordine: Wonderful < Herskovitz  $\leq$  Hicaznar  $\leq$  Bhagwa  $\leq$  Mollar < Tunisia  $\leq$  Accessioni locali e i valori ottenuti per le Accessioni locali sono significativamente maggiori di quelli per le Wonderful.

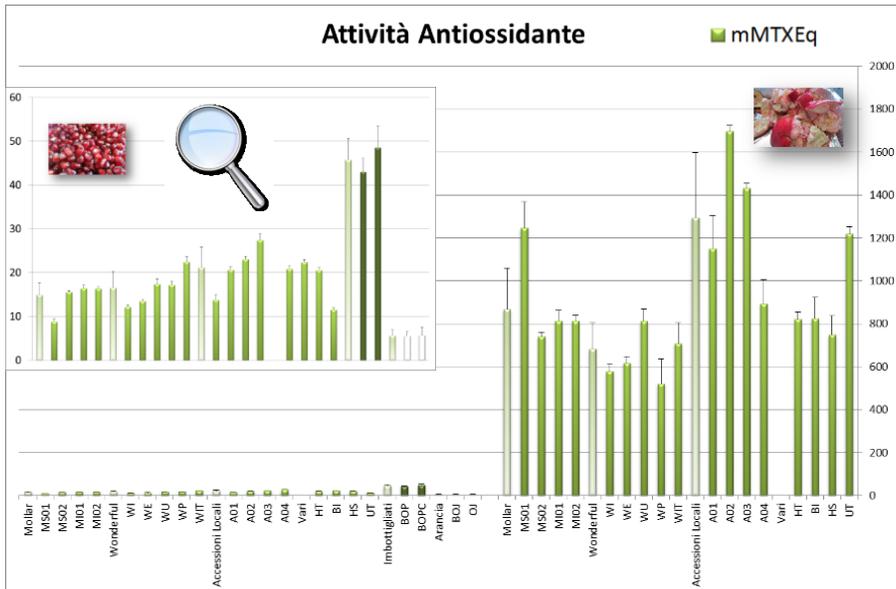


Figura 95: Attività antiossidante, misurata attraverso il test ABTS, di succhi di arili (a sinistra) e di bucce e polpe (a destra) di melagrana e di succhi commerciali.

Osservando il grafico si può inoltre notare che nel caso del test ABTS il rapporto tra l'attività antiossidante nei succhi di polpa e nei succhi di arili è circa 60 volte cioè molto maggiore rispetto al rapporto che si ottiene con il test Folin.

### Test ORAC

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con il test ORAC (Figura 96 e Tabella 22) che misura la capacità antiossidante dei campioni di inibire la degradazione ossidativa di un substrato (la fluoresceina) innescata

dai perossiradicali, l'andamento è analogo a quello del test ABTS ( $r = 0.98223$ ) nonostante alcuni campioni si discostino (MS02 per il succo di arili e WE per il succo di polpe) e i valori in mM TXE che si ottengono siano minori di quelli ottenuti con il test ABTS, soprattutto per quanto riguarda i succhi di polpa. Questo però è spiegabile con il fatto che i due test misurano la capacità antiossidante utilizzando principi molto diversi tra loro. Il fatto che la risposta sia diversa nei diversi test può essere dovuta al diverso profilo antiossidante presente nelle due matrici che dà risposte diverse ai vari test.

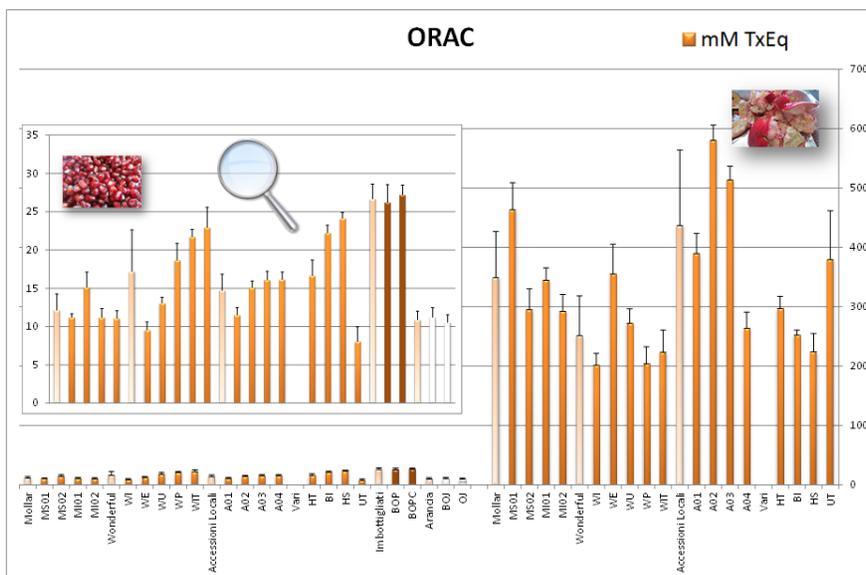


Figura 96: Attività antiossidante dei succhi di melagrana di arili (a sinistra) e di bucce e polpe (a destra) e di succhi commerciali, misurata attraverso il test ORAC.

Per quanto riguarda il confronto dei succhi ottenuti dagli arili con i due succhi di melagrana imbottigliati invece, è risultato, in tutti i test, che questi ultimi hanno un'attività antiossidante, molto più spiccata rispetto a tutti gli altri. Tale fatto potrebbe essere dovuto a due fattori:

- in fase di produzione, durante la preparazione del succo commerciale, possono essere state spremute, insieme agli arili, anche delle parti di polpa e buccia.

- il processo di pastorizzazione può avere formato composti melanoidinici per mezzo della reazione di Maillard che possono presentare anch'essi un certo potere antiossidante.

Poiché alcuni studi riportano che il processo di pastorizzazione non incrementa di molto l'attività antiossidante dei succhi di melograno (Mena P., 2013; Turkeyilmaz M., 2013), è possibile ipotizzare che la prima causa sia quella più plausibile.

Infine, da quanto mostrato dai risultati di tutti i test, sebbene l'attività antiossidante dei succhi di arili sia inferiore rispetto a quella dei succhi di bucce e polpe, è comunque superiore o comparabile, a quella del succo di arancia rossa, sia commerciale che ottenuto dalla spremitura di arance fresche.

### 11.5.3.3 *Contenuto Totale di Antociani (TAC)*

Considerando infine il contenuto di antociani, il grafico (Figura 97) mostra come questi siano molto più presenti nel succo degli arili piuttosto che in quelli di polpa: gli arili infatti come il succo che ne deriva, sono, tranne quelli di alcune varietà come la Tunisina (UT), in genere colorati di rosso. Le bucce e le polpe invece sono in genere molto chiare e il succo che ne deriva ha per lo più una colorazione che va dall'arancio al giallo nonostante alcune varietà, come la Wonderful italiana (WIT), l'Accessione Locale A04 e la Bhagwa indiana (BI), presentino la parte interna della buccia intensamente colorata in rosso. Questo si riscontra, a parte alcune eccezioni, nel contenuto di antociani, in accordo con il fatto che il colore di questi frutti è dovuto per lo più alla presenza di questi composti. Come notazione possiamo evidenziare inoltre come la cultivar Hicaznar (HT), che presenta il più alto contenuto di antociani nella buccia, è anche tra quelle aventi tra il più alto contenuto di antociani negli arili; la varietà tunisina (UT) al contrario, presenta arili bianchi e una colorazione della buccia relativamente chiara in accordo con il basso contenuto di antocianine sia nel succo di arili che in quello di polpa.

Per quanto riguarda la correlazione del contenuto in antociani con i test che misurano l'attività antiossidante, l'andamento è del tutto diverso tra il succo di arili, il succo di polpe e i succhi commerciali. Per gli arili troviamo un andamento simile a quello dell'attività antiossidante misurata con il saggio ORAC ( $r = 0.8371$ ) ma la correlazione è buona

e significativa anche con gli altri test ( $r_{TPC} = 0.7475$ ;  $r_{ABTS} = 0.7613$ ). Per le polpe non si ha invece alcuna correlazione. Inoltre anche i succhi di melograno commerciale non correlano con l'andamento dei succhi di arili mentre esiste una buona correlazione di questi con i succhi di arancia. Possiamo quindi affermare che gli antociani contribuiscono in misura maggiore all'attività antiossidante dei succhi di arili.

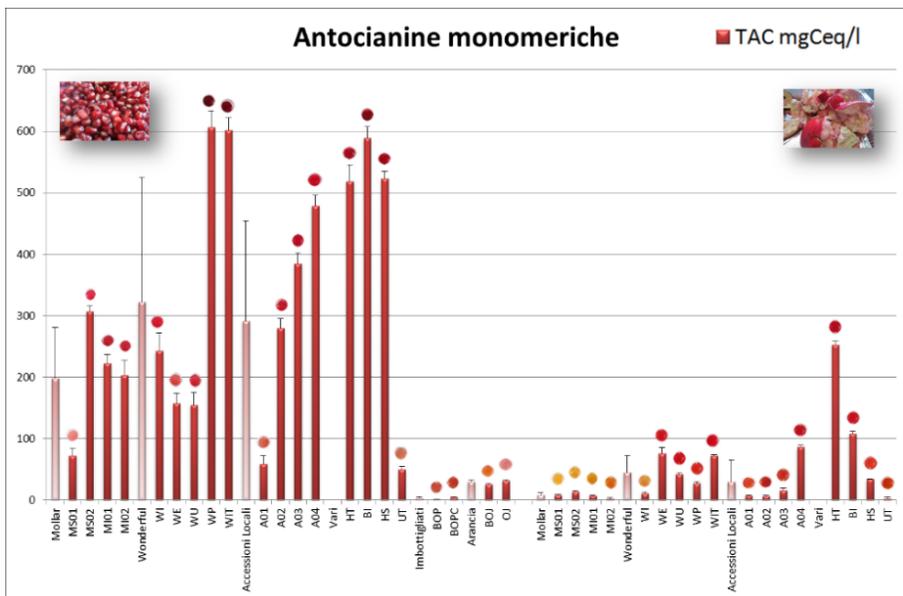


Figura 97: Contenuto in antociani (TAC) dei succhi di arili (a sinistra) e di bucce e polpe (a destra) di melagrana e di succhi commerciali. Il cerchio sopra l'istogramma riporta la foto del pozzetto contenete il campione analizzato e ne vuole descrivere il colore.

#### 11.5.3.4 *pH e Solidi solubili totali*

Di seguito è riportato il contenuto in solidi solubili totali ( Tabella 23 e Figura 98) di tutti i campioni oggetto di studio, misurato mediante rifrattometro. I succhi di melograno da noi spremuti (escludendo quindi i succhi di melograno imbottigliati e i succhi di arancia) mostrano un contenuto in solidi solubili totali che varia da 13.44 a 32.07 °Brix ed è maggiore nei succhi di polpa piuttosto che in quello di arili. Inoltre, nei succhi di polpa c'è una grande variabilità di questo parametro nei campioni della stessa cultivar ma provenienti da paesi diversi mentre nei succhi di arili queste differenze sono meno apprezzabili. Tuttavia il contenuto in solidi solubili dei succhi ottenuto dalla spremitura degli arili di melograno è paragonabile a quello dei succhi di melograno imbottigliati e al succo di arancia, utilizzati come riferimenti.

CAMPIONI	SOLIDI SOLUBILI TOTALI (°Brix)	pH
<b>ARILI</b>		
<b>MOLLAR</b>		
MS01	18.40 ± 0.42	4.04 ± 0.09
MS02	16.47 ± 0.25	3.64 ± 0.06
MI01	15.42 ± 0.20	3.71 ± 0.06
MI02	15.65 ± 0.51	3.46 ± 0.14
<b>WONDERFUL</b>		
WI	14.75 ± 0.37	3.19 ± 0.06
WE	14.55 ± 0.37	3.49 ± 0.07

WU	16.81	± 0.45	3.78	± 0.10
WP	15.05	± 0.51	3.14	± 0.11
WIT	17.72	± 0.32	3.28	± 0.09
<b>ACCESSIONI</b>				
A01	13.41	± 0.17	4.40	± 0.05
A02	15.15	± 0.08	3.35	± 0.13
A03	17.25	± 0.23	2.58	± 0.04
A04	17.76	± 0.66	2.89	± 0.07
<b>VARI</b>				
HT	18.36	± 0.37	3.20	± 0.04
BI	15.21	± 0.45	3.47	± 0.08
HS	15.95	± 0.08	3.37	± 0.12
UT	16.05	± 0.23	3.56	± 0.06
<b>IMBOTTIGLIATI</b>				
BOP	15.34	± 0.49	3.41	± 0.02
BOPC	14.55	± 0.37	3.03	± 0.04
<b>ARANCIA</b>				
BOJ	12.44	± 0.23	3.39	± 0.06
OJ	13.75	± 0.93	3.44	± 0.02
<b>POLPE</b>				
<b>MOLLAR</b>				
MS01	30.07	± 0.23	4.02	± 0.19
MS02	24.87	± 0.52	3.60	± 0.01
MI01	19.41	± 0.25	3.66	± 0.02
MI02	21.46	± 0.23	3.74	± 0.04
<b>WONDERFUL</b>				
WI	17.35	± 0.37	2.90	± 0.02
WE	27.57	± 0.09	3.14	± 0.01
WU	23.16	± 0.08	3.53	± 0.14
WP	16.15	± 0.20	3.48	± 0.15
WIT	19.26	± 0.51	3.41	± 0.14

ACCESSIONI			
A01	24.47	± 0.23	4.26 ± 0.14
A02	26.77	± 0.09	3.70 ± 0.05
A03	28.47	± 0.23	3.54 ± 0.17
A04	32.07	± 0.34	3.19 ± 0.01
VARI			
HT	27.67	± 0.23	3.05 ± 0.01
BI	23.97	± 0.37	3.93 ± 0.19
HS	20.56	± 0.37	3.55 ± 0.10
UT	31.47	± 0.23	3.62 ± 0.01

Tabella 23: Risultati dei solidi solubili totali e pH di succhi di arili e di bucce e polpe dei campioni di melagrane analizzati.

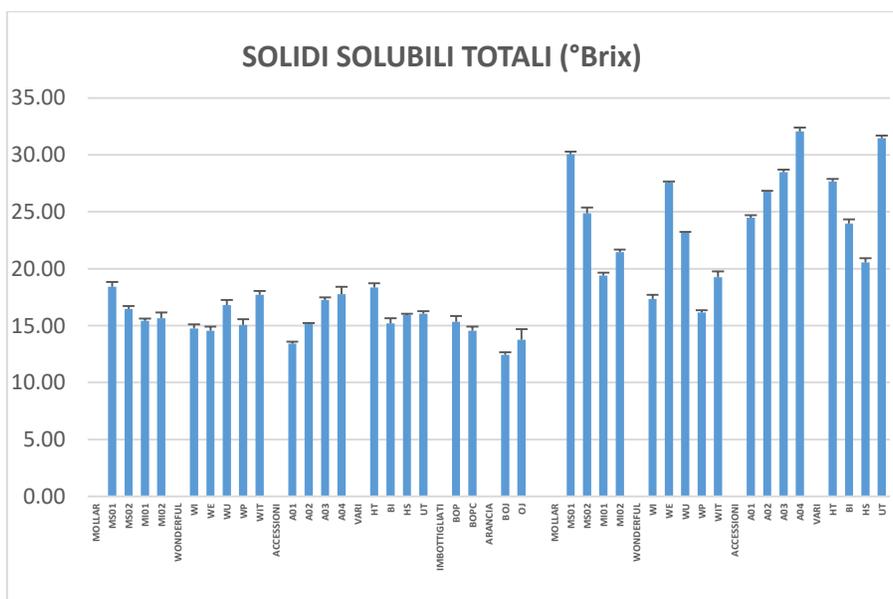


Figura 98: Risultati solidi solubili totali dei succhi di arili (a sinistra) e delle polpe (a destra).

Nella

Tabella 23 e nella Figura 99 è riportato il pH di tutti i campioni oggetto di studio che risulta essenzialmente acido con valori compresi tra 2.9 e 4.4.

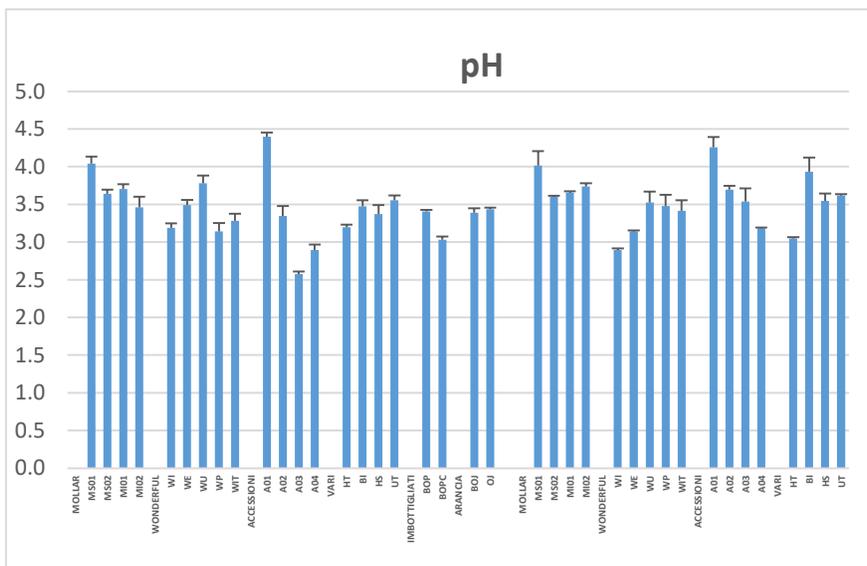


Figura 99: pH dei succhi di arili (a sinistra) e delle polpe (a destra).

### ***11.5.4 Conclusioni***

Dalla analisi dei risultati ottenuti nei diversi test possiamo trarre le seguenti conclusioni.

Sono state analizzate diverse cultivar di melograno: Wonderful provenienti dall'Italia, dall'Egitto, da Israele, dagli USA e dal Perù; Mollar coltivati in Spagna e in Italia; Bhagwa dall'India, Herskovitz dal Sud Africa e Hicaznar dalla Turchia; accessioni locali reperite in diverse aree del Parco del Conero e in altri comuni più interni delle Marche (AN).

Il potere antiossidante è stato valutato sottoponendo tutti i campioni a diversi saggi: il saggio Folin-Ciocalteu, per una misurazione del contenuto di polifenoli totali, il test dell'ABTS e il saggio ORAC per la determinazione dell'attività antiossidante, e il saggio del pH differenziale (TAC = Total Anthocyanins Content) per la misura delle antocianine monomeriche. L'ordine approssimativo di attività antiossidante tra i succhi di arili delle varie cultivar è risultato essere: Tunisina < Mollar  $\leq$  Wonderful < Accessioni locali  $\approx$  Hicaznar  $\leq$  Bhagwa  $\approx$  Herskovitz anche se ci sono piccole differenze tra i risultati dei diversi test. La zona di produzione influisce in qualche maniera ma per riuscire ad affermare ciò con sicurezza sarebbero necessari studi più approfonditi su un numero maggiore di campioni. L'attività antiossidante risulta molto più elevata (circa 30-80 volte) nei succhi di polpe e bucce piuttosto che nei succhi di arili.

Il contenuto di antociani, a differenza del potere antiossidante, è molto maggiore nel succo di arili piuttosto che in quello di bucce e polpe. Infatti gli arili sono dotati di colorazione rossa molto più intensa rispetto alla polpa, il cui succo risulta in genere di un colore tra il giallo e l'arancione. Solo la Hicaznar, che ha una intensa colorazione rossa presenta un alto contenuto di antociani sia negli arili che nella buccia. Questo fatto ci porta ad affermare che non sono gli antociani i composti fitochimici che maggiormente influenzano l'attività antiossidante dei succhi di bucce e polpe anche se sono tra i composti che contribuiscono maggiormente all'attività antiossidante dei succhi di arili.

L'attività antiossidante dei succhi ottenuti dalla spremitura di polpe e bucce può essere attribuita alla presenza di punicalagine, come riportato in diversi studi.

I risultati mostrano inoltre che, come ci si poteva aspettare, i succhi di melagrane hanno un pH piuttosto acido e che il contenuto in solidi solubili totali è maggiore nei succhi di polpa piuttosto che in quello di arili.

Il contenuto antiossidante dei succhi ottenuti dalla spremitura degli arili delle melagrane è comunque più elevato rispetto a quello di succhi di arancia. Questo ci conferma il valore nutrizionale di tale frutto che può essere utilizzato sia per il consumo fresco degli arili che per la preparazione di spremute casalinghe e può contribuire ad un notevole apporto di antiossidanti ad una dieta ben bilanciata.

Confrontando i succhi ottenuti dalla spremitura degli arili delle melagrane con succhi di melagrana commerciali 100% biologici presi come confronto, è risultato che questi ultimi hanno un'attività antiossidante molto più spiccata. Tale fatto può dipendere da due fattori: in fase di produzione, durante la preparazione del succo commerciale, possono essere state spremute, insieme agli arili, anche delle parti di polpa e buccia; il processo di pastorizzazione può avere formato composti melanoidinici per mezzo della reazione di Maillard che possono presentare anch'essi un certo potere antiossidante.

L'analisi di altri studi riportati in bibliografia che hanno valutato l'attività antiossidante di succhi ottenuti attraverso diversi processi tecnologici ha mostrato che la prima ipotesi potrebbe essere quella più veritiera in quanto sembra che il processo di pastorizzazione non incrementi di molto l'attività antiossidante dei succhi di melograno (Mena P. et al., 2013; Turkyilmaz M. et al., 2013).

Quindi in conclusione si può asserire che nella produzione dei succhi di melagrana, vista la notevole capacità antiossidante mostrata dal succo della polpa di tale frutto, sia da valutare l'ipotesi di utilizzare l'intera melagrana per ottenere spremute con una concentrazione superiore di sostanze antiossidanti e presumibilmente maggiori aspetti salutistici potenziali; ciò si potrebbe però scontrare con una minore gradevolezza della bevanda che presenterebbe sentori più aspri e amari.

## 12 BIBLIOGRAFIA

Seguono gli articoli relativi alla parte introduttiva della tesi di dottorato elencati in ordine alfabetico:

- Alberti, A. et al., (2009). *Spin Trapping. In Electron Paramagnetic Resonance* John Wiley & Sons, Inc. 285-324.
- Alvarez-Suarez J. M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M. (2010a) *Contribution of honey in nutrition and human health: a review*. *Mediterr J. Nutr. Metab.* 3, 15–23. DOI 10.1007/s12349-009-0051-6.
- Alvarez-Suarez J. M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E., Battino M. (2010b) *Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds*. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2490–2499.
- Cabras P., Martelli Aldo, *Chimica degli Alimenti*, Piccin Ed., (2004).
- Castiglioni S. (A.A. 2011/2012), *Preparazione di infusi di tè: influenza della temperatura sul potere antiossidante*. Tesi di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari, Università Politecnica Delle Marche.
- Cimpoi C., Hosu A., Miclaus V., Puscas A., (2013). *Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties*. *Spectrochimica Acta Part A* 100, 149–154.
- Choe E., Min D. B., (2009). *Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(4), 345 – 358. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x.
- Corti A., De Tata V., Pompella A. (2009). *Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana (Rassegna)*. *Lingand Assay* 14 (1).

- Damiani E., Astolfi P., Carloni P., Greci L. (2003) *Antiossidanti naturali e di sintesi: meccanismi della loro azione: una breve rassegna*. Progress in Nutrition 5, 160-168.
- Damiani E., Astolfi P., Carloni P., Stipa P., Greci L. (2008) *Antioxidants: how they work*. Libro Oxidants in Biology. A Question of Balance di Valacchi G., Davis P. Eds. 251-266; Springer (VIII) ISBN: 978-1-4020-8398-3.
- Flora S. J. S., (2009). *Review Structural Chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2:4, 191-206.
- Gheldof N., Engeseth N. J. (2002) *Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on the Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples*, J. Agric. Food Chem., 50, 3050-3055.
- Ghiselli A., Serafini M, Maiani G., Azzin E., Ferro-luzzi A. (1995) Fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. Free Radical Biology & Medicine, 18, 1, 29-36.
- Giusti M.M., Wrolstad R.E., Schwartz S.J., (2001), *Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Wrostrand R.E., John Wiley & Sons, Inc., 1-13, (<http://dx.doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>).
- Hair J. F., Black W. C., Babin B. J., Anderson R. E., *Multivariate Data Analysis: A Global Perspective*. 7th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2009. Print.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C., (1995). *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. Free Radical Biology & Medicine, 18 (I), 125-126.
- Ingold K. U., (1961). *Inhibition of the autoxidation of organic substances in the liquid phase*. National Research Council Publication, 6537.

- Ingold K. U., Pratt D. A., (2014). *Advances in Radical-Trapping Antioxidant Chemistry in the 21<sup>st</sup> Century: A Kinetics and Mechanisms Perspective*. Chemical Reviews. dx.doi.org/10.1021/cr500226n.
- Lee J., Koo N., Min D.B., (2004). *Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals*. Institute of Food Technologists, 3 Comprehensive reviews in food science and food safety.
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. (1993) *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. Clin. Sci (Lond). Apr, 84(4), 407-12.
- Moon J. K., Shibamoto T., (2009). *Antioxidant Assays for Plant and Food Components*. J. Agric. Food Chem., 57 (5), 1655-1666.
- Prior R. L., Wu X., Schaich K., (2005). *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*. J. Agric. Food Chem. 53, 4290-4302.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., (1999). *Antioxidant activity applying an improved abts radical Cation decolorization assay*. Free Radical Biology & Medicine, 26 (9/10), 1231–1237.
- Reg. (UE) 1308/2013 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 dicembre 2013 che riporta “L’organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli”.
- Roginsky V. et al., (2005). *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*. Food Chemistry 92, 235–254.
- Schaich K. M. et al., (2015). *Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays*. Journal of functional foods. 14, 111–125.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventòs R. M., (1999). *Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent*. Methods in Enzymology, 299 (14), 152-178.

- Tuberoso C. I. G., Jerkovic I., Sarais G., Congiu F., Marijanovic Z., Kus P. M. (2014). *Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE L C<sub>ab</sub> h<sup>o</sup><sub>bh</sub> chromaticity coordinates*. Food Chemistry 145, 284–291.
- Zalibera M. et al., (2008). *Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys – An electron paramagnetic resonance study*. Food Chemistry 110, 512–521.

Seguono gli articoli relativi alla parte sulle matrici alimentari studiate:

## IL MIELE

- AL-Dany A. Atwa, AbuShahba R. Y., Mostafa M., Hashem M. I., (2014) *Effect of honey in preventing gingivitis and dental caries in patients undergoing orthodontic treatment*. The Saudi Dental Journal 26, 108–114.
- Alvarez-Suarez J. M., Giampieri F., Gonzalez-Paramas N. M., Damiani E., Astolfi P., Martinez-Sanchez G., Bompadre S., Quiles J. L., Santos-Buelga C., Battino M. (2012) *Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage*. Food and Chemical Toxicology 50, 1508–1516.
- Amorati R., Valgimigli L. (2015). *Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants*. Free Radical Research, 49 (5), 633-649.
- Baek Y., Kim Y. J., Baik M-Y., Kim D-O, Lee H. (2015). *Total phenolic contents and antioxidant activities of Korean domestic honey from different floral sources*. Food Science and Biotechnology, 24(4), 1453-1457.
- Belay A., W.K. S., Bultossa G., Adgaba N., Melaku S., (2015). *Botanical origin, color, granulation, and sensory properties of the Hareenna forest honey, Bale, Ethiopia*. Food Chemistry 167, 213–219.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Maffei Facino, R. (2005). *Standardization of antioxidant properties of honey by a*

*combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Analytica Chimica Acta, 533(2), 185-191.*

- Bertoncelj J., Doberšek U., Jamnik M., Golob T. (2007) *Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey.* Food Chemistry 105, 822–828.
- Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M. P., Albertini M. C., Piatti E., (2006) *Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants.* Food Chemistry 97, 217–222.
- Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M. P., Piatti E., (2007) *Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells.* Food Chemistry 104, 1635–1640.
- Bueno-Costa F. M., Zambiasi R. C., Bohmer B. W., Chaves F. C., Silva W. P., Zanusso J. T., Dutra I. (2016). *Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil.* LWT - Food Science and Technology, 65, 333-340.
- Can Z., Yildiz O., Sahin H., Turumtay E. A., Silici S., Kolayli S. (2015). *An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles.* Food Chemistry, 180, 133-141.
- Candiracci M., Citterio B., Piatti E. (2012a) *Antifungal activity of the honey flavonoid extract against Candida albicans.* Food Chemistry 131, 493–499.
- Candiracci M., Piatti E., Dominguez-Barragán M., García-Antrás D., Morgado B., Ruano D., Gutiérrez J. F., Parrado J., Castaño A., (2012b) *Anti-inflammatory Activity of a Honey Flavonoid Extract on Lipopolysaccharide-Activated N13 Microglial Cells* dx.doi.org/10.1021/jf302468h. | J. Agric. Food Chem., 60, 12304–12311.
- Canonico B., Candiracci M., Curci R., Papa S. (2014) *Honey flavonoids inhibit Candida albicans morphogenesis by affecting DNA behavior and mitochondrial function.* Future Microbiology, April. DOI: 10.2217/fmb.14.17 · Source: PubMed.

- Castiglioni S., Stefano M., Astolfi P., Carloni P. (2017) *Chemometric approach to the analysis of antioxidant properties and colour of typical Italian monofloral honeys*. International Journal of Food Science & Technology, in stampa, doi:10.1111/ijfs.13397.
- Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto M.C., de Torres C., Pérez-Coello M.S. (2010) *Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys*. Food Research International 43, 2335–2340.
- Cavazza A., Corradini C., Musci M., Salvadeo P., (2012). *High-performance liquid chromatographic phenolic compound fingerprint for authenticity assessment of honey*. J. Sci. Food. Agric. 93, 1169–1175.
- Chaikham P., Kemsawasd V., Apichartsrangkoon A. (2016). *Effects of conventional and ultrasound treatments on physicochemical properties and antioxidant capacity of floral honeys from Northern Thailand*. Food Bioscience, 15, 19-26.
- Comunità Economica Europea. (2001). Council Directive relating to honey. Rule. Number Official. Journal of the European Communities. L10, 47-52.
- Consonni R., Cagliani L. R., Cogliati C. (2013) *Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis*. Food Control 32, 543e548.
- Cosmina M. et. al., Gallenti G., Marangon F., Troiano S. (2015). *Attitudes towards honey among Italian consumers: A choice experiment approach*. Appetite, 99, 52-58.
- CREA. (2012). I mieli uniflorali italiani. <http://api.entecra.it/index.php?c=pp&id=120/> Accessed 05/07/2016.
- da Silva P. M., Gauche C., Gonzaga L. V., Oliveira Costa A. C., Fett R. (2016). *Honey: Chemical composition, stability and authenticity*. Food Chemistry, 196, 309-323.
- de Alda-Garcilope C., Gallego-Picó A., Bravo-Yagüe J.C., Garcinuño-Martínez R.M., Fernández-Hernando P.. (2012) *Characterization of*

*Spanish honeys with protected designation of origin “Miel de Granada” according to their mineral content.* Food Chemistry 135, 1785–1788.

- de Almeida-Muradian L.B., Stramm K. M., Horita A., Barth O. M., da Silva de Freitas A., Estevinho L. M. (2013) *Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from Melipona subnitida and Apis mellifera.* International Journal of Food Science and Technology 48, 1698–1706.
- Di Bella G., Lo Turco V., Potorti` A. G., Bua G. D., Fede M. R., Dugo G. (2015). *Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach.* Journal of Food Composition and Analysis, 44, 25-35.
- DIRETTIVA 2001/110/CE del consiglio del 20 dicembre 2001 concernente il miele. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee 12.1.2002L 10/47.
- Drewnowski A., Gomez-Carneros C. (2000) *Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review.* The American Journal of Clinical Nutrition, 72, 1424-1435.
- Drivelos Spiros A., Constantinos A., Georgiou. (2012) *Multi-element and multi-isotoperatio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union.* Trends in Analytical Chemistry, 40.
- Escriche I., Kadar M., Juan-Borras M., Domenech E. (2014) *Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment.* Food Chemistry 142, 135–143.
- Escuredo O., Dobre I., Fernández-González M., Carmen Seijo M., (2014) *Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon.* Food Chemistry 149, 84–90.
- Everette J. D., Bryant Q. M., Green A. M., Abbey Y. A., Wangila G. W., Walker R. B. (2010). *Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(14), 8139-8144.

- Fechner D. C., Moresi A. L., Ruiz Díaz J. D., Pellerano R. G., Vazquez F. A., (2016) *Multivariate classification of honeys from Corrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties*. Food Bioscience 1549–54.
- Fidaleo M., Lavecchia R., Zuorro A. (2015) *Antibacterial and anti-quorum sensing activities of selected Italian honeys against antibiotic-resistant pathogens* OnLine Journal of Biological Sciences. Article, January DOI: 10.3844/ojbsci.2015.236.243.
- Fiorani M., Accorsi A., Blasa M., Diamantini G., Piatti E. (2006) *Flavonoids from Italian Multifloral Honeys Reduce the Extracellular Ferricyanide in Human Red Blood Cells*. J. Agric. Food Chem. 54, 8328–8334.
- Gok S., Severcan M., Goormaghtigh E., Kandemir I., Severcan F. (2015) *Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis*. Food Chemistry 170, 234–240.
- Jandri Z., Frew R. D., Fernandez-Cedi L.N., Cannavan A. (2015) *An investigative study on discrimination of honey of various floral and geographical origins using UPLC-QToF MS and multivariate data analysis*. Food Control xxx (2015).
- Juan-Borrás M. E. D., Hellebrandova M., Escriche I. (2014) *Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys*. Food Research International 60, 86–94.
- Karabagias I. K., Louppis A. P., Karabournioti S., Kontakos S., Papastephanou C., Kontominas M. G. (2017) *Characterization and geographical discrimination of commercial Citrus spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics*. Food Chemistry 217, 445–455.
- Karabagias K. I., Badeka A., Kontakos S., Karabournioti S., Kontominas M. G. (2014) *Characterisation and classification of Greek pine honeys*

*according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics.* Food Chemistry 146, 548–557.

- Karabournioti S., Thrasyvoulou A., Eleftheriou E. P. (2006). *A model for predicting geographic origin of honey from the same floral source.* Journal of Apicultural Research 45(3), 117–124.
- Kaškonienė V., Venskutonis P. R., (2010). *Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A review.* Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 9, doi 10.1111/j.1541-4337.2010.00130.
- Kečkeš S., Gašić U., Ćirković Veličković T., Milojković-Opsenica D., Natić M., Tešić Z., (2013). *The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry.* Food Chemistry 138, 32–40.
- Kropf U., Korošec M., Bertoneclj J., Ogrinc N., Nečemer M., Kump P., Golob T., (2010) *Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey.* Food Chemistry 121, 839–846.
- Manzanares A. B., García Z. H., Galdón B. R., Rodríguez E. R., Romero C. D., (2014). *Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain.* LWT - Food Science and Technology 55, 572-578.
- Osservatorio Nazionale Miele. (2013). I numeri e il valore dell'apicoltura italiana. <http://www.informamiele.it/index.php/crt/i-numeri-dell-apicoltura-italiana/> Accessed 05/07/2016.
- Pellerano R. G., Uñates M. A., Cantarelli M. A., Camiña J. M., Marchevsky E. J. (2012). *Analysis of trace elements in multifloral Argentine honeys and their classification according to provenance.* Food Chemistry, 134(1), 578-582.
- Perna A. Intaglietta I., Simonetti A., Gambacorta E. (2013). *A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin.* International Journal of Food Science & Technology, 48(9), 1899-1908.

- Persano Oddo L., Piazza M. G., Sabatini A.G., Accorti M. (1995). *Characterization of unifloral honeys*. *Apidologie*, 26(6), 453-465.
- Petretto G. L., Cossu M., Alamanni M. C. (2015). *Phenolic content, antioxidant and physico chemical properties of Sardinian monofloral honeys*. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(2), 482-491.
- Pichichero E., Canuti L., Cani A., (2009). *Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin*. *J. Sci. Food Agric.* 89, 609–616.
- Pipicelli G., Tatti P., 2009. *Therapeutic properties of honey*. *Health* 1 (2), 281-283.
- Pubblicazioni Standard Italiani (2008). Miele - Analisi microscopica o melissopalinoologica. Rule. Number. 2008.
- Pyrzynska K., Biesaga M., (2009). *Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey*. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 7.
- Rosa A., Tuberoso C. I. G., Atzeri A., Melis M. P., Bifulco E., Dessì M. A. (2011). *Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress*. *Food Chemistry*, 129 (3), 1045-1053.
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). *Health Benefits of Fruits and Vegetables*. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(4), 506-516.
- Truzzi, C., Annibaldi A., Illuminati S., Finale C., Scarponi G. (2014). *Physicochemical Properties of Honey from Marche, Central Italy: Classification of Unifloral and Multifloral Honeys by Multivariate Analysis*. *Natural Product Communications*, 9(11), 1595-477 1602.
- Wei Z., Wang J., Wang Y. (2010) *Classification of monofloral honeys from different floral origins and geographical origins based on rheometer*. *Journal of Food Engineering* 96, 469–479.

- Wei Z., Wang J., Wang Y. (2010) *Classification of monofloral honeys from different floral origins and geographical origins based on rheometer*. Journal of Food Engineering 96, 469–479.
- White W. J. (1984). *Instrumental color classification of honey: collaborative study*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 6.
- Wilczyńska A., (2014). *Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey* Gdynia Maritime University, Department of Commodity. LWT - Food Science and Technology 57, 767-774.
- Zhao J., Dua X., Cheng N., Chen L., Xue X., Zhao J., Wu L., Cao W., (2016). *Identification of monofloral honeys using HPLC–ECD and chemometrics*. Food Chemistry, 194, 167-174.

### POLLINE

- Almaraz-Abarca N., Maria da Graça Campos, Ávila-Reyes J. A., Naranjo-Jiménez N., Herrera-Corral J., González-Valdez L. S., 2004. *Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin*. Interciencia versión, 29 (10), 0378-1844.
- Almeida-Muradian L. B., Pamplona L. C., Coimbra S., Barth O. M., (2005). *Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets*. Journal of Food Composition and Analysis 18, 105–111.
- Bobis O., Marghitas L. A., Dezmiorean D., Morar O., Bonta V., Chirila F. (2010). *Quality Parameters and Nutritional Value of Different Commercial Bee Products*. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 67 (1-2), 1843-5262.
- Bogdanov S., (2011). *Pollen: composition, health, medicine. A Review*, Bee Product Science, [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).
- Bonvehí J. S., Torrento M. S., Lorente E. C. (2001). *Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen Produced in Spain*. J. Agric. Food Chem. 49, 1848-1853.

- Campos M. G. R., Frigerio C., Lopes J., Bogdanov S. (2010) *What is the future of Bee-Pollen?* Journal of ApiProduct and ApiMedical Science 2 (4), 131 – 144.
- Campos M. G., Webby R. F., Markham K. R., Mitchell K. A., Da Cunha A. P. (2003) *Age-Induced Diminution of Free Radical Scavenging Capacity in Bee Pollens and the Contribution of Constituent Flavonoids.* J. Agric. Food Chem., 51, 742-745.
- Castiglioni S., Carloni P. (2015) *Il polline: fattori che ne influenzano la composizione.* L'Apis n. agosto/settembre.
- De Arruda V. A. S., Pereira A. A. S., de Freitas A. S., Barth O. M., de Almeida-Muradian L. B. (2013). *Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition.* Journal of Food Composition and Analysis 29, 100–10.
- De Arruda V. A. S., Pereira A. A. S., Estevinho L. M., Almeida-Muradian L. B. (2013). *Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions.* Food and Chemical Toxicology 51, 143–148.
- Dimou M., Tananak C., Liolios V., Thrasyvoulou A. (2014) *Pollen Foraging by Honey Bees (Apis Mellifera L.) in Greece: Botanical and Geographical Origin.* December doi: 10.2478/jas-2014-0018.
- Estevinho L. M., Rodrigues S., Pereira A. P., Feas X. (2012) *Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation.* International Journal of Food Science and Technology 47, 429–435.
- Gasparotto J. A. S., Pereira de Melo P. L., Granato D., Araújo E., da Silva de Freitas A., Barth O. M., Sattler A., de Almeida-Muradian L. B. (2015) *Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study.* Food Research International 77, 82–91.
- Istituto nazionale apicoltura (2006). *La morfologia del polline.*

- Liolios V., Tananaki C., Dimou M., Kanelis D., Goras G., Karazafiris E., Thrasyvoulou A. (2016) *Ranking pollen from bee plants according to their protein contribution to honey bees*. Journal of Apicultural Research, DOI: 10.1080/00218839.2016.1173353.
- Morais M., Moreira L., Feas X., Estevinho L. M., (2011). *Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity*. Food and Chemical Toxicology 49, 1096–1101.
- Negri G., Weinstein Teixeira E., Teles Marques Florencio Alves M. L., de Camargo Carmello Moreti A. C., Pozar Otsuk I., Borguini R. G., Salatinoz A., (2011). *Hydroxycinnamic Acid Amide Derivatives, Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Extracts of Pollen Samples from Southeast Brazil*, J. Agric. Food Chem. 59, 5516–5522.
- Nogueira C., Iglesias A., Feás X., Estevinho L. M. (2012) *Commercial Bee Pollen with Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach*. Int. J. Mol. Sci. 13, 11173-11187, doi:10.3390/ijms130911173.
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. L. (2001) *Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe*. J. Agric. Food Chem., 49, 4619-4626.
- Pascoal A., Rodrigues S., Teixeira A., Feas X., Estevinho L. M. (2014). *Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory*. Food and Chemical Toxicology 63, 233–239.
- Persano Oddo L., Ricciardelli D'albore G. (1989). *Nomenclatura melissopalynologica*. Apicoltura. 5, 63-72.
- Piana L., (2007). *Che polline è?* Rivista L'apis 09, 15-21.
- Roulston T. H., Cane J. H. (2000). *Pollen nutritional content and digestibility for animals*. Plant Systematics and Evolution 222, 187-209.

- Yang K., Wu D., Ye X., Liu D., Chen J., Sun P., (2013). *Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China*. J. Agric. Food Chem. 61, 708–718.

## TE

- Adnan M., Ahmad A., Ahmed A., Khalid N., Hayat I., Ahmed I. (2013). *Chemical composition and sensory evaluation of tea (Camellia sinensis) commercialized in Pakistan*. Pakistan Journal of Botany 45, 901-907.
- Alipoor B., Rad AH. (2012). *A review on the therapeutical effects of tea*. Asian Journal of Clinical Nutrition 4, 1-15.
- Astill C., Birch M. R., Dacombe C., Humphrey P. G., Martin P. T. (2001). *Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 5340-5347.
- Barnum D. W. (1977). *Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols*. Analytica Chimica Acta 89,157-166.
- Carloni P., Tiano L., Padella L., Bacchetti T., Customu C., Kay A., Damiani E. (2013). *Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar*. Food Research International 53, 900-908.
- Castiglioni S., Damiani E., Astolfi P., Carloni P. (2015) *Influence of steeping conditions (time, temperature, and particle size) on antioxidant properties and sensory attributes of some white and green teas*. Int. J. Food Sci Nutr., Early Online: 1–7.
- Chacko S., Thambi P., Kuttan R., Nishigaki I. (2010). *Beneficial effects of green tea: A literature review*. Chinese Medicine 5, 13.
- Chaturvedula V. S. P., Prakash I. (2011). *The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea*. Journal of Medicinal Plants Research 5, 2110-2124

- Cheong W. J., Park M. H., Kang G. W., Ko J. H., Seo Y. J. (2005). *Determination of catechin compounds in Korean green tea infusions under various extraction conditions by high performance liquid chromatography*. Bulletin of the Korean Chemical Society 26,747-754.
- Craft B. D., Kerrihard A. L., Amarowicz R., Pegg R. B. (2012). *Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 11:148-173.
- Da Silva Pinto M. (2013). *Tea: A new perspective on health benefits*. Food Research International 53, 558-567.
- da Silveira T. F. F., Meinhart A. D., Ballus C. A., Godoy H. T. (2014). *The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study*. Food Research International 60, 241-245.
- Damiani E., Bacchetti T., Padella L., Tiano L., Carloni P. (2014). *Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions*. Journal of Food Composition and Analysis 33, 59-66.
- Gülçin İ. (2012). *Antioxidant activity of food constituents: an overview*. Archives of Toxicology 86, 345-391.
- Gursoy N., Sarikurkcu C., Cengiz M., Solak M. H. (2009). *Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven Morchella species*. Food and Chemical Toxicology 47, 2381-2388.
- ISO. (1980). *Tea - Preparation of liquor for use in sensory tests*. ISO 3103:1980. Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jayaganesh S., Venkatesan S. (2010). *Impact of magnesium sulphate on biochemical and quality constituents of black tea*. American Journal of Food Technology 5, 31-39.
- Jayasekera S., Kaur L., Molan A. L., Garg M. L., Moughan P.J. (2014). *Effects of season and plantation on phenolic content of unfermented and fermented Sri Lankan tea*. Food Chemistry 152, 546-551.

- Komes D., Horžić D., Belščak A., Ganić K. K., Vulić I. (2010). *Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds*. Food Research International 43, 167-176.
- Lee J., Chambers D. H. (2009). *Sensory descriptive evaluation: brewing methods affect flavour of green tea*. Asian Journal of Food and Agro-Industry 2, 427-439.
- Lin S-D., Liu E-H. Mau J-L. (2008). *Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea*. LWT - Food Science and Technology 41,1616-1623.
- Lin S-D., Yang J-H, Hsieh Y-J, Liu E-H, Mau J-L. (2014). *Effect of Different Brewing Methods on Quality of Green Tea*. Journal of Food Processing and Preservation 38,1234-1243.
- McGee H. (2011). *Iced Coffee and Tea: (Not) Taking the Heat*. The New York Times.
- Ramalho S.A., Nigam N., Oliveira G.B., de Oliveira P.A., Silva T. O. M., dos Santos A. G. P., Narain N. (2013). *Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea*. Food Research International 51,155-161.
- Sari F., Velioglu Y.S. (2011). *Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea*. Journal of Food Composition and Analysis 24,1130-1135.
- Sharangi A. B. (2009). *Medicinal and therapeutic potentialities of tea (Camellia sinensis L.) – A review*. Food Research International 42, 529-535.
- Venditti E., Bacchetti T., Tiano L., Carloni P., Greci L., Damiani E. (2010). *Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity?* Food Chemistry 119, 1597-1604.
- Vuong Q. V., Golding J. B., Stathopoulos C. E., Nguyen M. H., Roach P. D. (2011). *Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water*. Journal of Separation Science 34, 3099-3106.

- Yang D-J, Hwang L. S., Lin J-T. (2007). *Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions*. Journal of Chromatography A 1156, 312-320.

## MELAGRANE

- Codex alimentarius commission, (2009). Project document for a regional standard for Pomegranate. FAO/WHO Food Standards.
- Cristofori V., Caruso D., Latini G., Dell'Agli M., Cammilli C., Rugini E., Bignami C., Muleo R. (2011) *Fruit quality of Italian pomegranate (Punica granatum L.) autochthonous varieties*. Eur. Food Res. Technol. 232, 397–403.
- El-Nemr S.E., Ismail I.A., Ragab M., (1990) *Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit*, Molecular Nutrition & Food Research, , 34, 601–606.
- Faria, A., Calhau, C. (2010), *Pomegranate in Human Health: An Overview*. Bioactive Foods in Promoting Health, Chapter 36, 551–563. (<http://doi.org/10.1016/b978-0-12-374628-3.00036-0>).
- Holland, D., Hatib, K., Bar-Yaakov, I. (2009), *Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding*. Horticultural Reviews, 35, 127-191. (<http://ucanr.edu/sites/Pomegranates/files/164442.pdf>)
- Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S. (2012), *Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects*. Journal of Ethnopharmacology, 143, (397–405. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.004>)
- Mayuoni-Kirshinbaum, L., Porat, R. (2014). *The flavor of pomegranate fruit: A review*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(1), 21–27. (<http://doi.org/10.1002/jsfa.6311>)
- Mena P., Vegara S., Martí N., García-Viguera C., Saura D., Valero M., (2013). *Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds*

- and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice*. Food Chemistry, 141, 2122–2129.
- Mir, M. M., Umar, I., Mir, S., Rehman, M. U., Rather, G. H., Banday, S. (2012). *Quality evaluation of pomegranate crop -A review*. International Journal of Agriculture and Biology, 14(4), 658–667.
  - Palmieri J, (A.A. 2010/11), *La coltivazione del melograno nel bacino del mediterraneo*, Tesi di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie Università Politecnica delle Marche.
  - Ravindran P.N., Pillai G.S., Babu K.N., (2004) *Pomegranate*, in “*Handbook of Herbs and Spices*”, Peter K.V. Ed., Woodhead Publishing, 1, 5.12, ISBN 1 85573 562 8.
  - Stover, E., Mercure, E. W. (2007), *The pomegranate: A new look at the fruit of paradise*. HortScience, 42(5), 1088–1092.
  - Turkyilmaz M., Tağı Ş., Dereli U., Özkan M., (2013). *Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices*. Food Chemistry, 138, 1810–1818.
  - Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-álvarez, J. a. (2010), *Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(6), 635–654. (<http://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>).

## 13 SITOGRAFIA

### MIELE

- <http://api.entecra.it/index.php>
- <http://ec.europa.eu/>
- <http://www.ambasciatorimieli.it/>
- <http://www.apilandia.it/>
- <http://www.apitalia.net/it/speciale.php?id=746>
- <http://www.bee-hexagon.net/>
- <http://www.conapi.it/>
- <http://www.cra-api.it/online/mieli/>
- <http://www.eufic.org/article/it/artid/Nutrient-bioavailability-food-italian/>
- <http://www.fao.org>
- <http://www.federapi.biz/index.php>
- <http://www.informamiele.it/>
- <http://www.pollenergie.fr/accueil/>

### TÈ

- <http://allotment2kitchen.blogspot.it/2009/11/it-is-extremely-wet-today-with-rain.html>
- <http://blog.ridgewine.com/tag/lu-yu/>
- <http://lankapura.com/2009/06/a-tea-plantation-ceylon-1860/>
- <http://www.adagio.com/white/snowbud.html>
- <http://www.africaimagelibrary.com/media/d3ffe450-894e-11e1-a49a-19ead7828b71-satemwa-tea-estate-thyolo-malawi>

- <http://www.biblioteq.it/joomla/produzione-lavorazione-e-tipologie/84-lung-ching-o-long-jiin?start=5>
- [http://www.corriere.it/salute/11\\_marzo\\_01/longevita-sapore-amaro\\_4b2124de-441a-11e0-b1c1-dd3fc08b55ae.shtml](http://www.corriere.it/salute/11_marzo_01/longevita-sapore-amaro_4b2124de-441a-11e0-b1c1-dd3fc08b55ae.shtml)
- [http://www.darapri.it/immagini/nuove\\_mie/esercitazioni/flavanoli.htm](http://www.darapri.it/immagini/nuove_mie/esercitazioni/flavanoli.htm)
- <http://www.ellenskitchen.com/faqs/chinatea4.html>
- <http://www.nlm.nih.gov/exhibition/chinesemedicine/books.html>
- <http://www.prioriskincare.it/press/fo-polifenoli-35-pdf-172811.pdf>
- [http://www.signoredelte.it/classificazione\\_delle\\_foglie.html](http://www.signoredelte.it/classificazione_delle_foglie.html)
- <http://www.teavana.com/tea-info/japanese-tea-ceremony>
- <http://www.tuttocina.it/cina-tour/start.htm#.UP0GpcBd7C8>
- <http://www.wikipedia.it>
- <http://www.yourself.it/il-segreto-della-longevita-e-riconducibile-a-geniricettori-del-gusto-amaro/#>

## MELAGRANE

- <http://api.entecra.it/index.php?c=pp&id=120/>
- [http://ec.europa.eu/agriculture/honey/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/honey/index_en.htm)
- <http://vivaiserratore.it>
- <http://www.agraria.org>
- <http://www.freshplaza.com>
- <http://www.freshplaza.com>
- [http://www.freshplaza.com/;](http://www.freshplaza.com/)
- <http://www.lagazzettadelmezzogiorno.it>
- <http://www.starsouth.biz>
- <http://www.starsouth.biz/>

- <http://www.sunimpex.nl>
- <http://www.sunimpex.nl/>
- <https://www.researchgate.net>

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio tutti agli apicoltori e le loro innumerevoli api per la produzione di miele e di polline oggetto ed ispirazione delle ricerche effettuate. In particolare sono grata a tutti gli apicoltori che con tanto impegno si sono dedicati alla laboriosa raccolta dei campioni di polline uniflorale. Inoltre un importante riconoscimento va alla Dottoressa Mariasunta Stefano dell'A.S.S.A.M. e alla dottoressa Lucia Piana dello studio privato "Piana Ricerca e Consulenza srl" non solo per l'indispensabile fornitura dei campioni di miele e di alcuni dei campioni di polline ma soprattutto per il rapporto di fiducia e di collaborazione che si è instaurato negli anni. Esprimo inoltre gratitudine ad Alexander Kay dell'azienda "Satemwa Tea Estates" di Thyolo (Malawi) per il conferimento di tè africani e a Fabiola Ruggero di "Cose di Te'", Jesi (Italy) per il reperimento di tè cinesi.