

# VARIABILITÀ ALL'ORIGINE E FATTORI DI QUALITÀ: NUOVE ESPERIENZE ANALITICHE PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLA PROPOLI

di Valeria Leoni<sup>1,2</sup>, Luca Giupponi<sup>1,2</sup>, Radmila Pavlovic<sup>1,2</sup>,  
Gigliola Borgonovo<sup>1,3</sup>, Angela Bassoli<sup>1,3</sup>, Anna Giorgi<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup>Centro di Ricerca Coordinata di Studi Applicati per la Gestione  
Sostenibile e la Difesa della Montagna - Ge.S.Di.Mont, Edolo

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione  
e l'Ambiente – DeFENS, Milano

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione,  
Territorio, Agroenergia – DISAA, Milano  
valeria.leoni@unimi.it

La propoli resta una delle matrici naturali più complesse, la cui efficacia è direttamente correlata alla sua variabilità. Pur non esistendo standard di riferimento per il mercato, l'evoluzione delle tecniche analitiche permette di realizzare comparazioni multifattoriali attraverso le quali è possibile caratterizzare le diverse produzioni e orientare le scelte degli utilizzatori (proprio come fanno le api). Un esempio di questa metodologia nel caso di studio.

La propoli è stato forse uno dei primi prodotti naturali utilizzato dall'uomo per la salute. Il nome, di derivazione dal greco antico (πρό πολις, letteralmente "a difesa della città"), è descrittivo del ruolo che questa sostanza resinosa ha nella protezione dell'alveare: prevenire la contaminazione da batteri, virus o parassiti; evitare la decomposizione di intrusi



occasionalmente morti al suo interno grazie al suo potere antisettico; venire applicata come cemento dalle api per sigillare crepe o spazi aperti.

### UNA MATRICE COMPLESSA, CONOSCIUTA SIN DALL'ANTICHITÀ, MA ANCORA NON COMPLETAMENTE DEFINITA

Esistono testimonianze storiche della raccolta e dell'utilizzo della propoli da parte degli antichi Egizi, dei Persiani e dei Romani. Gli Egizi hanno rappresentato api intente a produrla su vasi e altri oggetti: ne sfruttavano le proprietà antiputrefattive per l'imbalsamazione delle salme e la utilizzavano come rimedio per alleviare molti disturbi. Nell'Antico Testamento è il balsamo medicinale, *tsori*; le sue proprietà terapeutiche sono invocate nel libro di Geremia (versetti 8.22, 46.11 e 51.8). I Greci usavano la propoli insieme ad altre resine come Olibano e Benzoino, e ad essenze aromatiche per la preparazione di profumi. Diversi autori greci e romani hanno lasciato scritti sulle preparazioni e l'applicazione della propoli; il cosiddetto terzo prodotto naturale delle api accanto a miele e cera. Ippocrate la indica per la cura di ferite e ulcere, sia esterne sia interne. Nel Medioevo e tra i medici arabi la propoli veniva usata come antisettico e cicatrizzante nel trattamento delle ferite, e come disinfettante per la bocca. Dioscoride, in *De materia medica*, ne cita le sue proprietà espettoranti; Plinio il Vecchio, nella sua famosa *Naturalis historia*, parla del sollievo che la propoli porta per le malattie da raffreddamento e del suo effetto cicatrizzante. Azione nota anche agli arabi, poiché Avicenna descrive una "cera nera" usata contro il freddo e come rimedio contro eczemi, mialgia e reumatismi. L'uso della propoli come protezione dai malanni del freddo, disinfettante e cicatrizzante continuò anche nelle epoche successive, e le farmacopee londinesi del XVII secolo elencano la propoli tra le droghe medicinali riconosciute. La propoli era conosciuta anche da popoli lontani, dalle civiltà del Vecchio Mondo: è testimoniato l'uso da parte degli Inca come agente antipiretico.

Studi recenti hanno confermato le numerose proprietà della propoli (1): anticariogenica (2), antimicrobica (3),



▲ Un'ape nell'arte giapponese



▲ Raffigurazione egizia

antinfiammatoria (4), antiossidante (5), immunostimolante (6), antivirale (7), antitumorale (6), epatoprotettiva (8), antifungina (9) e antibatterica (10); quindi è stata oggetto di un crescente interesse scientifico a causa della sua vasta gamma di proprietà biomediche. Un moderno approccio salutistico raccomanda questo prodotto apistico principalmente per aumentare l'immuno-resistenza naturale. Oggi la propoli è disponibile come prodotto commerciale, naturale o spesso come prodotto purificato in cui è stata rimossa la cera. È ampiamente diffusa sul mercato come macerato o estratto idroalcolico o glicolico, in polvere o in altre formulazioni, in forma pura o combinata con altri derivati vegetali: capsule, pastiglie, unguenti, creme e collutori. Oltre che

come ingrediente negli integratori, ha impiego nella formulazione di cosmetici.

Nonostante tale diffuso e storico utilizzo, non esistono ancora standard internazionali di qualità per questo prodotto (11) e anche la Comunità europea non ha ancora creato una precisa referenza merceologica, ragione per la quale è difficile determinarne i valori di mercato.

### VARIABILITÀ DELLA PROPOLI

In effetti gli scienziati si sono interessati all'investigazione dei costituenti e delle proprietà biologiche della propoli negli ultimi decenni (12), ma è un fatto riconosciuto che, poiché le api usano la vegetazione a loro disposizione per creare la propoli, la sua composizione presenti un'alta variabilità. Va tenuto presente che le api raccolgono ed elaborano i loro prodotti a proprio vantaggio e che gli esseri umani traggono beneficio dal duro lavoro di questi insetti. Se ci prendiamo cura di collocare l'apiario in un luogo ricco di fonti alimentari e materiali di cui hanno bisogno, allora abbiamo api sane che contribuiscono all'impollinazione e al mantenimento della biodiversità. La posizione dell'apiario influenza le caratteristiche di tutti i prodotti delle api; sono molti i fattori alla base della complessità chimica della propoli, ad esempio l'origine fito-geografica, il momento della raccolta e il tipo di foraggiamento delle api. Molti studi comparativi hanno confrontato la propoli raccolta da

gemme differenti o da altri organi vegetali. Le migliori fonti di propoli sono: Pioppo, Salice, Betulla, Olmo, Ontano, Faggio, conifere varie e Ippocastano. La composizione chimica complessa della propoli è la causa più importante di molte delle sfide analitiche e dei problemi di standardizzazione di questo rimedio naturale. In letteratura vengono citati diversi tipi di propoli (propoli di pioppo, betulla, "del Pacifico" e "delle Canarie") e proposte anche delle classificazioni a seconda del colore (verde, rosso, marrone ecc.). Tuttavia, a partire dagli studi preliminari è stato facile intuire come piccole variazioni bioclimatiche portino a notevoli cambiamenti fisici e chimici, anche in aree ristrette come il Nord Italia.

### L'ESIGENZA DI UN'ANALISI POLISTRUMENTALE

In generale la propoli viene caratterizzata definendo il contenuto di alcune classi di metaboliti secondari. Il contenuto di fenoli totali può essere determinato per via colorimetrica utilizzando il metodo di Folin-Ciocalteu, mentre uno dei metodi ampiamente utilizzati nella valutazione dell'attività antiossidante della propoli (13) è basato sul saggio che sfrutta la riduzione del radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH) da parte dell'antiossidante.

Tuttavia, come abbiamo visto, la sua composizione può variare enormemente in base alle condizioni ambientali. Una descrizione generica delle proprietà antiossidanti e la definizione dei fenoli e dei flavonoidi totali, nonostante dia un dato generale dell'attività biologica della propoli, spesso non è caratterizzante di tutte le sue proprietà. Tradizionalmente, il metodo di estrazione è l'estrazione idroalcolica, che si è dimostrato essere il metodo più efficace, nonché il più utilizzato data

l'innocuità dei solventi; per questo è anche il metodo di estrazione più comunemente utilizzato anche a scopi sperimentali.

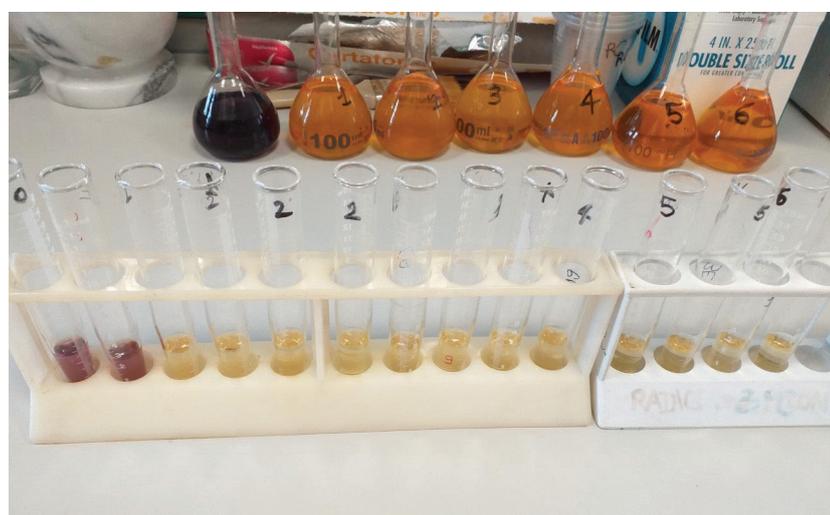
La propoli è uno dei prodotti apistici più affascinanti, sicuramente un fattore chiave per il successo del superorganismo dell'alveare, e la sua complessità chimica rappresenta una grande sfida alla conoscenza della sua costituzione e dell'attività biologica connessa.

La composizione chimica complessa, in particolare la polarità dei componenti, rende difficile l'applicazione di una singola tecnica analitica alla sua caratterizzazione e standardizzazione: ad oggi è ancora necessario il confronto dei dati restituiti da diversi strumenti analitici per lo studio della composizione della propoli.

Molto spesso i composti fenolici che la caratterizzano non vengono singolarmente quantificati e anche il loro contenuto totale trova un ampio intervallo in letteratura. Le tecniche cromatografiche strumentali permettono di quantificare i composti singoli, tuttavia è difficile utilizzarli come metodi di routine a causa del costo elevato e alla variabilità della matrice. La scelta degli standard è molto complessa: la propoli ligure può risultare completamente diversa da una della zona del comasco e ogni volta è necessario uno studio preliminare qualitativo per individuare i composti principali.

Tecniche avanzate di cromatografia liquida accompagnata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (LC-HRMS) e studi di metabolomica possono essere abbastanza descrittivi, grazie al fatto che possono individuare marcatori molecolari presenti anche a bassissima concentrazione.

Un'altra importante componente della propoli, spesso poco considerata, è rappresentata dai composti organici volatili (VOCs) che comprendono diversi terpeni e terpenoidi dall'importante attività biologica, che possono essere quantificati con l'utilizzo di tecniche di gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) accompagnate da microestrazione in fase solida (SPME). Quest'ultima tecnica permette l'estrazione della componente



◀ Preparazione delle analisi spettrofotometriche dell'attività antiossidante misurata come FRSA (*Free Radical Scavenging Activities*). È evidente l'effetto contro i radicali liberi della propoli rispetto alla cuvetta di controllo

volatile di una matrice evitando alcuni aspetti negativi come la maggiore manodopera e maggiori tempi di analisi, nonché la degradazione di volatili durante i processi di idrodistillazione e preparazione degli oli essenziali della propoli.

**LA CARATTERIZZAZIONE DI UNA PROPOLI MONTANA (APPENNINO LIGURE) VERSUS UNA PROPOLI DELLA PIANURA PADANA**

Nel caso studio effettuato dal gruppo di lavoro del Centro di Ricerca Coordinato di Studi per la Montagna (CRC Ge.S.Di.Mont.) dell'Università degli Studi di Milano, la propoli è stata caratterizzata sia con metodi fisico-chimici e spettrofotometrici sia con tecniche di indagine più approfondite come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa a trappola ionica (Orbitrap LC-MS), la gascromatografia associata a spettrometria di massa e microestrazione in fase solida (SPME/GC-MS) e la risonanza magnetica nucleare (NMR). Le tecniche utilizzate sono ampiamente descritte nel lavoro scientifico recentemente pubblicato dalla rivista *Molecules, Effectiveness of Different*

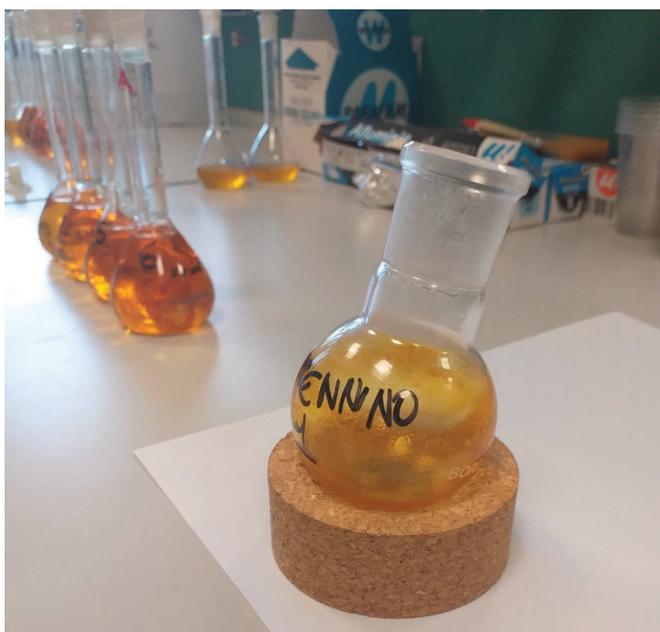


- ▲ Area di campionamento con evidenziati la collocazione dei due apiari oggetto di studio: Visone nella valle del Po e Ponzzone sull'Appennino Ligure
- L'azienda apistica Terra di Mezzo. Il simbolo aziendale evidenzia la collocazione degli apiari sull'Appennino e in pianura a livello del mare

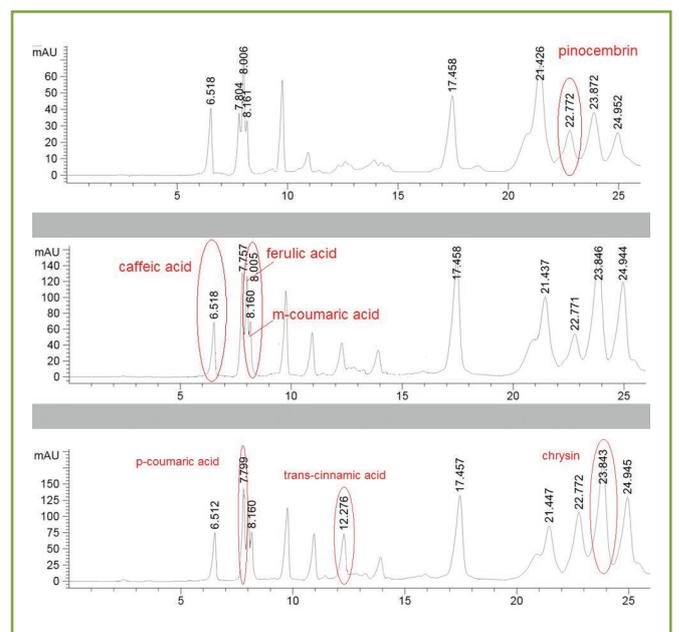


*Analytical Methods for the Characterization of Propolis: A Case of Study in Northern Italy (14)*, e realizzato nell'ambito del progetto Italian Mountain Lab e della convenzione UNIMONT-DARA (Dipartimento degli Affari Regionali).

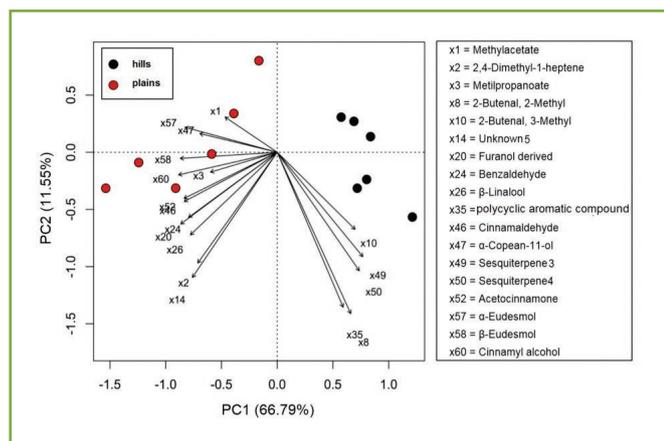
I campioni di propoli sono stati donati dall'azienda apistica Terra di Mezzo (AL) e raccolti con il metodo delle retine, che consiste nel piazzare una rete nell'aria tra il melario e la copertura, in modo che le api siano indotte a "tappare" gli spazi con la propoli. La propoli è stata raccolta con un campionamento randomizzato in due stazioni dell'azienda apistica distanti 25 km: una a Visone (AL; quota: 100 m s.l.m.; Latitudine: 44°35 21 N; Longitudine: 8°27 37 E) nella pianura alesandrina, nella valle del Po (pianura), e l'altra a Ponzzone (AL; quota: 550 m s.l.m.; Latitudine: 44°39 46 N;



► Balsamo estratto dalla propoli, in questo caso da uno dei campioni appenninici



▲ Cromatogrammi delle analisi HPLC; si vede la complessità della matrice con numerosi picchi



▲ PCA (Principal Component Analysis) dei diciotto composti trovati in quantità significativamente differenti nel profilo dei volatili

Longitudine: 8°30 06 E) sull'Appennino Ligure (montagna). Le due aree appartengono all'ecoregione delle Alpi Marittime e presentano un clima continentale sub-mediterraneo temperato.

Il contenuto in fenoli, flavoni e flavonoli totali, e l'attività contro i radicali liberi (misurata come FRSA, *Free Radical Scavenging Activities*) non è cambiato significativamente tra montagna e pianura: il valore medio del contenuto di flavonoidi totali è stato  $32,14 \pm 4,38$  mg/g per la propoli appenninica e  $26,91 \pm 4,31$  mg/g per la pianura; il valore medio dei fenoli totali è risultato  $24,42 \pm 11,67$  per i campioni di montagna e  $236,32 \pm 40,92$  mg/g per la pianura, e tali contenuti hanno confermato un'analoga attività antiossidante (FRSA  $45,01\% \pm 1,39$  per l'Appennino e  $46,44 \pm 0,96$  per la pianura). Per quanto riguarda alcuni composti fenolici singoli, è stato possibile quantificare tramite HPLC a tre diverse lunghezze d'onda: la pinocembrina è stata quantificata a una lunghezza d'onda di 375 nm, gli acidi caffeico, m-coumarico e ferulico sono stati quantificati a 325 nm, mentre il p-coumarico e il trans-cinnamico sono stati monitorati a 295 nm. In montagna sono stati trovati presenti principalmente l'acido p-coumarico, m-coumarico e ferulico, mentre in pianura l'acido trans-cinnamico è risultato essere il principale acido fenolico.

Il profilo dei composti volatili è molto simile per le due tipologie di propoli e si è distinto quantitativamente solo per 18 composti sui 60 individuati. Nei campioni di pianura sono stati ritrovati in quantità significativamente più elevata composti come il  $\beta$ -linalolo, la cinnamaldehyde, l' $\alpha$ -copaen-11-olo, l'acetocinnamone, l'alcol cinnamico, l' $\alpha$ -eudesmolo e  $\beta$ -eudesmolo. Nei campioni dell'Appennino Ligure, invece, sono stati trovati



▲ Le due propoli "scure" analizzate; già dalla tonalità del colore è visibile una certa differenza

significativamente presenti in quantità più elevate due sesquiterpeni, la cui struttura non è stata ancora definita nel dettaglio. Per entrambi i tipi di propoli, alcuni composti significativi (presenti in percentuale superiore all'1% di tutti i volatili) si sono rivelati il  $\beta$ -linalolo, l'alcol cinnamico, la cinnamaldehyde, il  $\beta$ -eudesmolo e il  $\delta$ -cadinene.

### UNA RACCOLTA SELETTIVA DA PARTE DELLE API?

I due composti  $\alpha$ -eudesmolo e  $\beta$ -eudesmolo, trovati significativamente più alti nella propoli di Visone nella valle del Po, sono attribuiti, grazie a studi comparativi, alle resine provenienti dalle gemme di *Populus nigra* L. (Pioppo Nero) (15), il quale rappresenta una delle risorse botaniche principali per la produzione della propoli nelle zone temperate, tant'è che la propoli viene definita "di pioppo" o scura/marrone. La presenza ingente di eudesmolo è stata proposta essa stessa come carattere distintivo di alcune propoli (16). Molti altri composti volatili ritrovati durante la ricerca sono stati precedentemente attribuiti da altri lavori alla propoli di Pioppo Nero. Il Pioppo cresce nelle zone periferiali della valle del Po, quindi si può presupporre che le api provenienti dall'apiario di Visone abbiano cercato questa essenza arborea. Allo stesso modo, i flavonoidi e gli esteri dell'acido cinnamico sono i maggiori costituenti della propoli delle zone temperate ricche di piante di Pioppo Nero e nella nostra ricerca il profilo di composti volatili della propoli di Visone si è caratterizzato per la maggiore presenza di cinnamaldehyde, acetocinnamone e alcol cinnamico. La propoli di Ponzzone nell'Appennino Ligure si è distinta, invece, per la maggiore presenza di due sesquiterpeni sconosciuti che sono stati probabilmente

raccolti su altre essenze botaniche e che, per le api, potevano portare la propoli ad avere le medesime funzioni biologiche in assenza di grandi quantità di gemme di Pioppo Nero. Questo dato risulta molto interessante e dimostra come le api trovino nell'ambiente le materie prime per elaborare la propoli e utilizzarla al meglio per proteggere il loro alveare da contaminazioni batteriche e fungine (17). La scarsa presenza di terpeni come il pinene, caratteristico delle conifere, potrebbe essere dovuta alla poca presenza di queste piante nell'area di studio o anche al fatto che le api raccolgono le resine dalle gemme di conifere solo quando altre risorse non sono presenti in quantità sufficiente (18).

Per quanto riguarda l'analisi NMR, la propoli si è rivelata una matrice molto complessa, con la presenza e la sovrapposizione di molti segnali ascrivibili a composti simili. Ciò nonostante, sono stati identificati vari flavonoidi e acidi fenolici. Si sono rivelate risonanze specifiche attribuibili agli esteri fenolici del glicerolo come 1,3-di-p-cumaril-2-acetil-glicerolo e 1,3-diferulil-p-cumaril-glicerolo, ulteriormente confermate dalle analisi tramite cromatografia liquida accompagnata da una spettrometria di massa a trappola ionica Orbitrap. Con questa tecnica è stato individuato in tracce, nelle propoli dei due apiari, il CAPE (l'estere fenilico dell'acido caffeico), un importante composto bioattivo.

L'analisi in HPLC-Q-Exactive-Orbitrap<sup>®</sup>-MS, accompagnata dall'utilizzo del Software Compound Discoverer<sup>™</sup> (CD), ha permesso la profilazione delle due propoli individuando 90 composti ed evidenziando diverse molecole caratterizzanti la propoli appenninica di Ponzzone piuttosto che quella di pianura intorno a Visone. Gran parte dei fenoli ritrovati, in particolare l'acido trans-cinnamico,

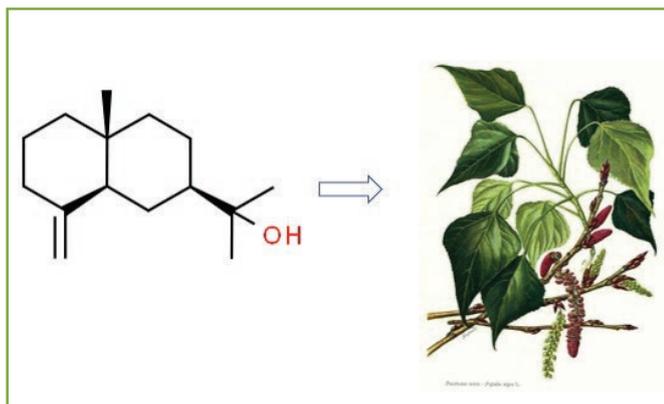
hanno confermato la propoli della pianura come appartenente al tipo di "propoli di pioppo" oltre che propoli "marrone" tipica delle aree continentali europee. Per quanto riguarda la propoli dell'Appennino, si è distinta per la presenza incisiva degli esteri fenolici del glicerolo. Ad oggi mancano studi sistematici della propoli di aree esenti dalla presenza del Pioppo Nero. Di 114 campioni di propoli analizzati in uno studio pan-europeo, solo 17 provenivano da zone "nordiche e montane" (19). In tale studio è stato verificato come queste propoli di aree montane contenessero sensibilmente meno polifenoli tipici della propoli di pioppo ma avessero, nonostante questo, la stessa attività biologica.

Nel nostro studio, i composti caratterizzanti la propoli di Ponzzone sono stati identificati in maniera complementare dalle tecniche HPLC-Q-Exactive-Orbitrap<sup>®</sup>-MS e NMR. Tali composti, ovvero gli esteri fenolici del glicerolo, erano stati isolati da propoli proveniente dal nord della Russia (20) e da essudati del *Populus tremula* L. (Pioppo Tremulo), che quindi può essere un'importante fonte di resine in assenza del Pioppo Nero. Questi composti sono stati ritrovati anche nella propoli di una zona montana in Svizzera a 700 m.s.l.m., dove erano presenti diverse aree boschive caratterizzate dal Pioppo Tremulo (21). Il Pioppo Tremulo cresce nella zona collinare-montana oggetto di studio e in generale negli Appennini e nelle Alpi, in particolare nei campi abbandonati dove forma una comunità dell'alleanza fitosociologica *Sambuco-Salicion capreae* (22). Questo tipo di vegetazione si sta espandendo sia nelle Alpi sia negli Appennini, a causa dell'abbandono delle pratiche agricole (23).

### LA PROPOLI È UN IMPORTANTE PRODOTTO APISTICO DA CARATTERIZZARE E DA VALORIZZARE

Il nostro studio ha confermato che la definizione del "tipo" di propoli in base all'area di bottinatura è un aspetto importante nel controllo della qualità della propoli e che le api scelgono al meglio le risorse in loco per proteggere il loro alveare. Inoltre, è importante un approccio integrato utilizzando diverse tecniche analitiche per descrivere pienamente questo prodotto apistico assai complesso, uno dei più affascinanti che il duro lavoro delle api fornisce all'uomo e sicuramente un fattore chiave del successo del "super-organismo alveare".

Le conoscenze riguardanti la propoli hanno registrato un'importante evoluzione nel tempo, grazie agli studi



▲ Un esempio di come i composti caratterizzanti possono essere associati a determinate piante: il beta-eudesmol risulta caratteristico della propoli di Pioppo Nero



▲ Ape bottinatrice (© Fritz Geller-Grimm)

esaustivi sulla sua composizione chimica e le sue attività biologiche. Negli anni Sessanta, per esempio, si credeva che la composizione della propoli fosse piuttosto costante (24) e che le analisi spettrofotometriche fossero abbastanza descrittive di questa matrice così complessa. Negli ultimi dieci anni, invece, l'analisi di un gran numero di campioni di diverse aree geografiche ha rivelato che la composizione della propoli varia a seconda della vegetazione, della stagione, delle condizioni ambientali e del sito di raccolta (24), e che la standardizzazione di questo prodotto è decisamente sfidante.

Nel nostro studio una variazione di pochi chilometri ha portato a dei cambiamenti notevoli nella composizione di questo prodotto, anche se si trattava di propoli del tipo "scuro" o marrone. Le analisi qualitative tramite HPLC-Q-Exactive-Orbitrap®-MS e NMR si sono rivelate fondamentali per scoprire i dettagli sulla composizione di questo prodotto apistico e salutistico affascinante.

## Bibliografia

- Houghton PJ (1998) Propolis as a medicine. Are there scientific reasons for its reputation?  
In: Beeswax and Propolis for Pleasure and Profit. International Bee Research Association, Cardiff, UK, p 10
- Koo H, Rosalen PL, Cury JA *et al* (2002) Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity.  
Antimicrob Agents Chemother 46(5):1302-1309
- Silva Cunha IB, Salomão K, Shimizu M *et al* (2004) Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*.  
Chem Pharm. Bull 52(5):602-604
- Borrelli F, Maffia P, Pinto L *et al* (2002) Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract.  
Fitoterapia 73(3):S53-S63
- Ahn M, Kumazawa S, Usui Y *et al* (2007) Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China.  
Food Chem 101(4):1383-1392
- Oršolic N, Knežević AH, Šver L *et al* (2004) Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds.  
J Ethnopharmacol 94 (issue 2-3):307-315
- Amoros M, Lurton E, Boustie J *et al* (1994) Comparison of the anti-herpes *simplex virus* activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate.  
J Nat Prod 57(5):644-647
- Seo KW, Park M, Song YJ *et al* (2003) The protective effects of propolis on hepatic injury and its mechanism.  
Phytotherapy Research 17(3):250-253
- Ota C, Unterkircher C, Fantinato V *et al* (2001) Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*.  
Mycoses 44(9-10):375-378
- Silici S, Kutluca S (2005) Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region.  
J Ethnopharmacol 99(1):69-73
- Stan L, Liviu AL, Dezmiorean D *et al* (2011) Quality criteria for propolis standardization.  
Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies 44(2):137-140
- Sforzin JM, Bankova V (2011) Propolis: Is there a potential for development of new drugs?  
J Ethnopharmacol 133(2):253-260
- Cottica SM, Sabik H, Antoine C *et al* (2015) Characterization of canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction.  
LWT - Food Sci and Tech 60 (1):609-614
- Pavlovic R, Borgonovo G, Leoni V *et al* (2020) Effectiveness of different analytical methods for the characterization of propolis: a case of study in Northern Italy.  
Molecules 25(3):504
- Jerkovic' I, Mastelic' J (2003) Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (*Salicaceae*).  
Phytochem 63(1):109-113
- Petri G, Lemberkovic E, Foldvari F (1988) Examination of differences between propolis (bee glue) produced from different flora environment.  
In: Flavors and Fragrances: A World Perspective. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp 439-446
- Bankova V, Popova M, Trusheva B (2014) Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review.  
Chem Central J8(28):1-8

18. Isidorov,VA, Szczepaniak L, Bakier S (2014) Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chem* 142(2014):101-106
19. Popova M, Bankova V, Bogdanov S *et al* (2007) Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* 38(2007):306-311
20. Popravko SA, Sokolov IV, Torgov IV (1982) New natural phenolic triglycerides. *Chem Nat Compd* 18:153-157
21. Bankova V, Popova M, Bogdanov S *et al* (2014) Chemical composition of european propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung* 57 C:530-533
22. Landolt E, Bäumler B, Erhardt A *et al* (2010) Flora indicativa. Ecological indicator values and biological attributes of the Flora of Switzerland and the Alps. Haupt Verlag, Bern-Stuttgart-Wien.
23. Cislighi A, Giupponi, L, Tamburini A *et al* (2019) The effects of mountain grazing abandonment on plant community, forage value and soil properties: observations and field measurements in an alpine area. *Catena* 181
24. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C (2015) Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evid Based Complement Alternat Med* doi:10.1155/2015/206439

### UNIMONT, FORMAZIONE INNOVATIVA PER LA MONTAGNA E LA SUA NATURA

UNIMONT - Università della Montagna, polo d'Eccellenza dell'Università degli Studi di Milano con sede a Edolo nelle Alpi, offre una formazione innovativa sui territori montani, con un corso di laurea in Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano, e numerosi corsi di perfezionamento e iniziative seminariali multidisciplinari. Sotto la guida del Centro di Ricerca Coordinato GeSDiMont, UNIMONT promuove attività di ricerca e organizza tavoli di lavoro interattivi e

virtuali con gli *stakeholder* della montagna a livello locale, nazionale e internazionale.

È possibile sapere di più sull'Università della Montagna attraverso questi canali:

Sito Web: [www.unimontagna.it](http://www.unimontagna.it);

FB: [universitadellamontagna](https://www.facebook.com/universitadellamontagna); TW: [@unimontagna](https://twitter.com/unimontagna);

IG: [unimont.edolo](https://www.instagram.com/unimont.edolo); YT: [corsoedolo](https://www.youtube.com/channel/UCorsoedolo)

