

UNIVERSITÀ DI PISA

**Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e
Agro-ambientali**



Corso di Laurea Magistrale in
Biosicurezza e Qualità degli alimenti

TESI DI LAUREA

**Valore nutrizionale del polline di castagno e di salice
sottoposto a differenti metodi di conservazione**

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Annamaria RANIERI

Correlatore

Chiar.mo Dott. Angelo CANALE

Candidato

Ilaria Vullo

ANNO ACCADEMICO 2014/15

Alla mia famiglia

| | |
|---|----------|
| 1.INTRODUZIONE..... | 5 |
| 1.1 L'apicoltura italiana..... | 5 |
| 1.2 Il polline..... | 6 |
| 1.2.1 Il polline: cos'è dal punto di vista botanico..... | 7 |
| 1.2.2. Il polline: cos'è per le api e loro raccolta..... | 7 |
| 1.2.3.La raccolta mediante trappole..... | 10 |
| 1.3 Composizione chimica..... | 11 |
| 1.3.1 Carboidrati..... | 12 |
| 1.3.2 Fibre grezze..... | 13 |
| 1.3.3 Lipidi..... | 13 |
| 1.3.4 Minerali e tracce di elementi..... | 13 |
| 1.3.5 Vitamine..... | 14 |
| 1.3.6 Proteine e aminoacidi..... | 14 |
| 1.3.7 Composti fenolici..... | 15 |
| 1.4 Valore nutrizionale del polline..... | 17 |
| 1.5 Biodisponibilità del polline..... | 18 |
| 1.6 Digeribilità del polline..... | 19 |
| 1.7 Attività antimicrobica del polline..... | 20 |
| 1.8 Attività antiossidante del polline radicali liberi e difese endogene..... | 21 |
| 1.9 Gli antiossidanti: definizione e meccanismo di azione..... | 23 |
| 1.9.1 Gli antiossidanti più diffusi in natura..... | 25 |
| 1.9.2 I composti fenolici..... | 26 |
| 1.9.3 Biosintesi dei composti fenolici..... | 29 |
| 1.9.4 Attività antiossidante dei composti fenolici..... | 36 |
| 1.9.5 Biodisponibilità e metabolismo dei composti fenolici..... | 39 |
| 1.10 Gli aminoacidi..... | 40 |
| 1.10.1 Strutture e proprietà generali..... | 40 |
| 1.10.2 Legame peptidico..... | 41 |
| 1.10.3 Classificazione e caratteristiche degli amminoacidi..... | 42 |
| 1.10.4 La prolina: caratteristiche e biosintesi..... | 45 |

| | |
|--|------------|
| 2. SCOPO DELLA TESI | 47 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 48 |
| 3.1 Campioni analizzati..... | 48 |
| 3.2 Estrazione dei composti fenolici..... | 50 |
| 3.3 Dosaggio dei fenoli totali..... | 51 |
| 3.4 Dosaggio dei flavonoidi..... | 53 |
| 3.5 Dosaggio del contenuto di rutina mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)..... | 54 |
| 3.6 Estrazione degli aminoacidi liberi..... | 54 |
| 3.7 Estrazione degli aminoacidi totali..... | 55 |
| 3.8 Determinazione della prolina..... | 55 |
| 3.9 Determinazione degli aminoacidi..... | 56 |
| 3.10 Analisi statistica..... | 56 |
| 4. RISULTATI..... | 57 |
| 4.1 Contenuto di prolina libera totale, aminoacidi liberi e totali e loro rapporti..... | 57 |
| 4.2 Contenuto di rutina..... | 64 |
| 4.3 Contenuto di composti fenolici..... | 70 |
| 5. DISCUSSIONE..... | 78 |
| 5.1 Contenuto di prolina libera totale, aminoacidi liberi e totali e loro rapporti..... | 82 |
| 5.2 Contenuto di rutina..... | 86 |
| 5.3 Contenuto di composti fenolici..... | 88 |
| 6. CONCLUSIONE..... | 90 |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 93 |
| 8. RINGRAZIAMENTI..... | 104 |

1.INTRODUZIONE

1.1 L'apicoltura italiana

L'apicoltura italiana è un settore della produzione primaria in continua espansione ed è da sempre funzionale all'agricoltura e all'economia interna.

L'indotto legato al settore apistico è dell'ordine di 57-62 milioni di euro, quindi circa il 3% della produzione lorda vendibile dell'intera agricoltura italiana; in questi termini sembrerebbe un settore marginale nell'economia nazionale.

Se tuttavia si esamina il valore economico che può apportare l'azione impollinatrice svolta dalle api nei confronti delle colture agrarie e della flora spontanea, l'apicoltura può essere ritenuta fra le più importanti attività economiche nazionali. Numerose ricerche hanno messo in rilievo che il reddito diretto ascrivibile alle api in termini di produzione agricola può stimarsi dai 1.500 ai 2.600 milioni di euro. Anche il successo riproduttivo della flora spontanea dipende dalle api, con un valore molto importante per la tutela dell'ambiente e la salvaguardia della biodiversità.

La presenza delle api è poi indice di una buona qualità dell'ambiente, rivelando l'esistenza delle condizioni minime di sopravvivenza anche per altre forme biologiche. Per di più, sul piano culturale, l'esercizio dell'apicoltura è portatore di valenze storiche e tradizionali che possono rappresentare un importante elemento per mantenere viva l'identità territoriale.

Inoltre l'attività apistica rappresenta un modello di sfruttamento agricolo non distruttivo, con un impatto ambientale praticamente nullo, cosa che rende l'apicoltura un'attività agricola di elezione per le aree marginali e le zone protette. Praticare l'apicoltura in queste zone disagiate può essere quindi una fonte di reddito, dato che le tecniche agricole più consolidate non sono praticabili.

La competitività dell'agricoltura moderna può essere quindi migliorata utilizzando a fini commerciali i sottoprodotti dell'alveare, in particolare il polline di api.

Le api raccolgono il polline dai fiori e lo trasportano all'alveare. Questo viene usato dalle api per soddisfare il loro fabbisogno proteico e ne raccolgono una

quantità molto maggiore rispetto alle loro necessità. È dunque possibile raccogliere una parte di polline in eccesso e utilizzarlo per fini commerciali.

Numerosi studi sono stati effettuati riguardo il valore nutrizionale del polline, tali da considerarlo un alimento completo (Tunner et al., 2006). Esso contiene un alto numero di proteine, vitamine e composti antiossidanti (Human e Nicolson, 2006).

Ulteriori studi hanno analizzato le proprietà nutraceutiche del polline ed hanno dimostrato come sia in grado di aumentare i livelli di minerali del sangue, soprattutto in ferro e aumenti l'assorbimento di elementi quali il calcio, fosforo e magnesio (Haro et al., 2000) e un aumento delle proteine (Oian et al., 1990).

Grazie agli studi condotti, molti paesi produttori stanno definendo degli standard nazionali di riferimento per stabilire il valore nutrizionale e funzionale del polline sulla base di parametri analitici ben definiti, al fine di commercializzare il polline come integratore alimentare.

1.2 IL POLLINE

1.2.1 Il polline: cos'è dal punto di vista botanico

Il polline è costituito da numerosi granuli dalle dimensioni di circa 2,5-250 μm , presenti all'interno dei sacchi pollinici delle antere dei fiori. Il colore e la forma dei granuli varia in base alla specie di fiori a cui appartengono (Couto et al., 2006).

Il polline rappresenta il gametofito maschile dei fiori, che andrà poi a raggiungere gli organi femminili dei fiori (pistilli). Tutte le piante terrestri hanno un ciclo biologico caratterizzato dall'alternanza della fase aploide (gametofitica) e di quella diploide (sporofitica).

Le piante superiori (gimnosperme e angiosperme), nella forma vegetativa, rappresentano la generazione sporofitica e producono per meiosi due tipi di spore aploidi: le microspore e le macrospore. Dopo divisioni mitotiche, la microspora forma un microgametofito che sarebbe il granulo di polline (gametofito maschile), mentre la macrospora forma un macrogametofito o sacco embrionale (gametofito femminile) (Abbate, Pasqua).

Dato che il polline deve germinare per produrre i gameti maschili, deve necessariamente possedere tutte le sostanze necessarie per riprodursi.

Il microgametofito produce i gameti maschili, mentre il macrogametofito dà origine ad una sola cellula uovo. I gameti maschili arrivano in corrispondenza del gamete femminile tramite il tubetto pollinico. I gameti si uniscono mediante fecondazione andando a formare lo zigote diploide, che in seguito a un certo numero di divisioni mitotiche costituirà l'embrione, cioè il nuovo sporofito.

Ogni granulo di polline è rivestito esternamente da una doppia membrana. La membrana interna si chiama intina, mentre quella esterna esina.

L'esina è molto resistente ai fattori chimici e fisici (Couto et al., 2006). Essa è costituita da sporopollenina, appartenente alla classe dei terpeni. Questa sostanza protegge il granulo dall'ossidazione, dall'essiccamento e dall'attività nociva della luce (Contessi).

Inoltre l'esina presenta sulla superficie numerosi pori e solchi che facilitano l'adesione del polline all'addome dell'ape (Couto et al., 2006).

L'endina è la parete più interna ed è di natura celluloso-peptidica, offre una protezione meccanica contro lo schiacciamento (Contessi). Sia l'endina che l'esina hanno particolari pori che permettono la fuoriuscita del tubetto pollinico.

1.2.2. Il polline: cos'è per le api e raccolta

Il polline è l'unica fonte proteica dell'alveare. Viene utilizzato dalle api bottinatrici per nutrire le larve delle operaie e dei fuchi che hanno tre giorni di vita; rappresenta inoltre un alimento per le giovani api che devono produrre pappa reale (Contessi).

Il polline, avendo l'importante funzione di garantire la sopravvivenza dell'intera colonia, deve essere un alimento completo. Contiene infatti proteine, minerali, grassi e altre sostanze indispensabili per lo sviluppo di un organismo (Serra-Bonhevi et al.).

Il polline presente in commercio è raccolto dalle api appartenente alla specie *Apis mellifera*. Quando le api lo raccolgono dalle antere, lo mescolano con una

piccola quantità di secrezione, proveniente dalle ghiandole salivari oppure lo mescolano col nettare dei fiori (Couto et al.).

Le api bottinatrici che hanno raggiunto il ventesimo giorno di vita, sono specializzate alla raccolta del polline.

Queste raccolgono sia polline di piante anemogame (dispersione del polline tramite il vento) che di quelle entomogame (dispersione del polline tramite gli insetti).

Nel primo caso, quando le api raggiungono le infiorescenze, mordono con l'apparato boccale le antere e provocano la fuoriuscita del polline; il polline resterà adeso all'apparato boccale, alla testa ed ai peli delle zampe.

Quando le api vanno su fiori di piante entomogame, cominciano a spostarsi avanti e indietro attirando su di sé le antere e imbrattandosi in questo modo tutto il corpo di polline (Contessi).

Esistono poi altri meccanismi particolari di raccolta del polline, ma una volta che l'ape ne ha il corpo ricoperto, volando di fiore in fiore, si ripulisce il corpo andando a formare delle pallottole. Le api utilizzano le spazzole del primo paio di zampe e raccolgono il polline aderente alla testa e al collo; questo viene impastato col nettare raccolto o col contenuto della borsa mielaria al fine di proteggerlo.

Tramite il secondo paio di zampe, le api raccolgono il polline sul torace e lo mescolano con quello proveniente dal primo.

Infine, col terzo paio di zampe raccolgono il polline presente sull'addome, che viene rimpastato con quello raccolto in precedenza. Quando le api sfregano le zampe posteriori, il polline viene trasferito da una zampa all'altra e cade in una concavità ricavata nella parte superiore del tarso.

Per ultimo le api flettono l'articolazione tibio-tarsale, in modo da spingere il polline nella cestella. Col tempo si accumula altro polline e le pallottole raggiungono il peso di circa 7,5 mg ciascuna; in seguito vengono lasciate nell'arnia dalla bottinatrice.

Successivamente è compito delle operaie comprimere le pallottole entro le celle.

Le operaie depositano il polline nelle celle attorno alla covata, ma le celle non vengono mai riempite completamente, né opercolate (Contessi).

Le api cominciano a bottinare su una determinata specie e continuano fino al termine della fioritura, di conseguenza le pallottole hanno una composizione omogenea ed hanno forma, consistenza e sapore particolari a seconda della specie floreale da cui provengono.

Nell'alveare, il polline raccolto, viene inumidito con la saliva e poi impacchettato nei favi. In seguito, la superficie del polline viene coperta con un sottile strato di miele e cera. Il composto che è stato creato è il "pane delle api" che subisce fermentazione anaerobica ed è poi conservato grazie all'acido lattico. Questo composto finale costituisce la risorsa proteica per la colonia ed è inoltre la fonte di sostanze minerali e nutrizionali per la pappa reale prodotta dalle api operaie (R.H.N. Couto; Pereira).

Ogni specie di pianta produce granuli di polline diversi; questi differiscono in forma, colore, dimensione e grandezza. Esistono diverse forme dei granuli: rotondi, cilindrici, triangolari, spinosi (Shbbarrani).

La maggior parte del polline consiste in un singolo granulo, oppure può essere formato da più grani raggruppati in due o in tre.

Il polline ha un colore che può variare dal giallo molto chiaro al nero; le api operaie vanno su determinate specie di fiori in cerca di polline, ma se non ne trovano abbastanza, si recano su altri fiori di altre specie e mescolano i due tipi di polline. Quest'ultimo si chiama polline millefiori, mentre il polline monofloreale mantiene le stesse proprietà organolettiche e biochimiche della pianta di origine, quello millefiori ha caratteristiche molto variabili (Stanley e Linsken, 1974). All'interno della stessa specie ci possono comunque essere variazioni di colore dovute a diversi fattori.

Le dimensioni delle pallottole variano in funzione della specie bottinata; è stato rilevato che un'ape impiega dai 5 a 15 min per completare un carico di polline e che in un giorno compie circa venti viaggi, per un totale di circa 300 mg di polline al giorno.

I dati sono molto variabili, dipendono dalla quantità di polline offerta dalla specie del fiore, dalla distanza dalla sorgente di polline e dalle condizioni meteorologiche.

Nell'arco di un anno è stata calcolata una media di 40 50 kg di polline (Contessi).

1.2.3. La raccolta mediante trappole

Il polline viene sottratto dalle api mediante l'utilizzo di trappole poste all'ingresso dell'alveare. In commercio esistono diversi tipi di trappole, il cui costo può variare dai 10 ai 40 euro, ma il funzionamento è lo stesso per tutte.

Per entrare nell'alveare le api dovranno attraversare una griglia costituita da fori calibrati che permetterà il loro passaggio, ma in grado di provocare la perdita di una certa percentuale di cestelle adese alle zampe posteriori. Le cestelle staccandosi, cadranno in un cassetto sottostante dove verranno raccolte dall'apicoltore. Generalmente il cassetto è costituito da una rete a maglia stretta tale da consentire una buona circolazione d'aria.

Sono state fatte numerose prove per raccogliere il polline direttamente dai favi, ma i risultati non sono stati soddisfacenti.

La scelta della trappola viene fatta in base al tipo di arnia che si ha a disposizione; molti apicoltori italiani preferiscono utilizzare il cassetto raccogli polline mobile, perché permette il raccolto giornaliero con il solo spostamento del cassetto e non di tutta la trappola. Questo deve avere una capacità di almeno 1,5 kg di polline che è il quantitativo massimo che in uno-tre giorni si può raccogliere. La rete nel cassetto deve essere in acciaio, preferibilmente inox, visto che deve contenere un alimento.

Quando si posiziona una trappola si deve considerare che l'efficienza di una trappola può variare tra valori che vanno dal 3 al 25% rispetto ai raccolti dei primi giorni/settimane. Questo è dovuto al fatto che col tempo le api si abituano alla trappola, col passare del tempo, riempiono sempre meno le cestelle e fanno arrivare all'interno dell'arnia sempre più polline. Secondo le medie europee i raccolti possono oscillare nell'arco di una stagione da un minimo di 1,5 kg a famiglia a un massimo di 9,2 kg a famiglia (www.apas.com).

Spesso viene trascurata la scelta di dove posizionare le trappole, invece gioca un ruolo fondamentale nella quantità e qualità di polline raccolto. Molto dipende dal numero di postazioni che si hanno a disposizione; potrebbe essere preferibile

avere postazioni su monoculture e su fioriture abbondanti e prolungate così da poter raccogliere polline monoflorale e decidere in seguito se vendere le partite separatamente o se mescolarle in base all'esigenza degli acquirenti. Comunque è meglio preferire luoghi con eterogeneità floreale tale da garantire un ampio spettro di aminoacidi indispensabili per la sopravvivenza della colonia (www.apas.com).

Attualmente vengono utilizzate diverse tipologie di trappole, ma sono tutte riconducibili a tre categorie fondamentali: trappole da entrata, sono poste davanti all'apertura di volo abituale delle api; trappole inferiori, poste sotto il nido, al posto del fondo dell'arnia. Infine sono presenti in commercio le trappole da soffitta, inserite al posto della soffitta sul nido o sul melario.

Queste tre trappole hanno aspetti positivi e negativi che devono essere valutati dall'apicoltore in base al tipo di arnia e al tipo di polline che vuole ottenere.

Le griglie che costituiscono le trappole sono costruite in modo tale che venga trattenuta solo una percentuale del 10-20% del polline importato, altrimenti la covata e la colonia potrebbero morire in breve tempo. Dato che la trappola rallenta l'attività delle api, si preferisce raccogliere il polline nei periodi in cui si ha una forte produzione (Contessi).

1.3 Composizione chimica

Il polline ha una composizione che può variare in base alla specie dei fiori da cui proviene, ed è possibile notare diverse caratteristiche in base all'area di provenienza e al periodo di raccolta (Szczesna et al., 2002).

È un prodotto ricco di sostanze biologiche, infatti ne sono state trovate nei granuli più di 200, provenienti da diverse specie di piante (Campos et al., 2008).

Il polline è costituito da proteine, aminoacidi, lipidi e acidi grassi, carboidrati, fibre, minerali, sali, composti fenolici, enzimi e coenzimi come vitamine e bioelementi (Campos et al., 2008).

Il prodotto appena raccolto dalle api, ha un contenuto d'acqua compreso tra il 20-30 g su 100 g, questa umidità favorisce la crescita di microrganismi come batteri, lieviti e acari (Szczesna et al., 1999). Conservare il polline in congelatore immediatamente dopo la raccolta è in grado di prevenire il deterioramento e

conservare la qualità; poi una volta scongelato, deve essere processato il prima possibile. Viene effettuato un essiccamento in particolari forni che hanno temperatura di 50°C che sono in grado di ridurre il contenuto idrico a 4-8 g per 100 g di polline. Grazie a questo processo il polline è in grado di conservarsi per due anni se stoccato in un posto secco, freddo e buio (Szczesna et al., 1999).

Alcuni paesi hanno stabilito dei requisiti minimi per il polline essiccato: Brasile massimo 4 g/100 g; Svizzera, Polonia massimo 6 g/100g, Uruguay massimo 8 g/100 g, Bulgaria massimo 10 g/100 g (Campos et al., 2008).

In tabella 1 sono indicati i principali costituenti del del polline di api espressi su base secca.

| Componenti principali | Contenuto minimo-massimo (g/100g di sostanza secca) |
|------------------------------|--|
| Proteine | 10-40 |
| Lipidi | 1-13 |
| Carboidrati totali | 13-55 |
| Fibre | 0,3-20 |
| Ceneri | 2-6 |
| Composti non determinati | 2-5 |

Tabella 1: Principali costituenti del polline e loro valore massimo e minimo espresso in g su 100g di sostanza secca.

1.3.1 Carboidrati

Sono tra i componenti presenti in maggiore quantità e variano con le specie. Sono costituiti soprattutto da polisaccaridi come amido, materiali della parete cellulare e fibre alimentari (Stanley and Linsken, 1974; Talapy, 1984).

Il polline derivante dalle angiosperme è maggiore in zuccheri riducenti e generalmente più povero in zuccheri non riducenti. Il contenuto di zuccheri riducenti è di 32,9 g/100 g e quello del saccarosio è 6,12 g/ 100g (su sostanza secca) secondo quanto rilevato dagli autori Solberg e Remedios (1980).

Sempre gli stessi autori hanno ritrovato che gli zuccheri presenti in maggiore concentrazione sono il fruttosio, glucosio e saccarosio, invece in minori concentrazioni ci sono i disaccaridi come trealosio, isomaltosio e maltosio. Sono

presenti anche i trisaccaridi come raffinoso, erlosio e meleztosio ed è stato riscontrato anche un alto livello di fruttosio con un indice fruttosio/glucosio che varia tra 1,13 a 1,53. Il contenuto in amido è invece molto variabile ed è circa di 2,13 g su 100 g

Il contenuto di carboidrati è generalmente calcolato: 100 meno la somma del contenuto di acqua, grassi e proteine. Il contenuto di carboidrati calcolati, sarà maggiore di quello ottenuto mediante metodi analitici (GC, HPLC). La spiegazione è che una parte dei carboidrati (composta da fibre grezze e materiale cellulare) non è possibile determinarla mediante metodi analitici, ma sono determinati mediante calcoli.

La quantità di carboidrati digeribili è circa del 30,8% su sostanza secca (Kędzia B. et al., 2005).

1.3.2 Fibre grezze

Il polline analizzato ha rivelato valori compresi tra 7 e 20 g/100 g di sostanza secca, ma secondo gli autori Bell *et al.*, (1983) ci può essere una variazione dei valori più ampia, in base alle diverse metodiche di analisi utilizzate.

1.3.3 Lipidi

Tra le diverse specie di polline ci sono numerose differenze nella composizione dei lipidi (Szczesna et al., 1999), la loro quantità è compresa tra 5 e 10 g /100 g di sostanza secca.

Sono presenti gli acidi grassi essenziali (EFSAs) come acido linoleico, α -linoleico, oleico, questi sono presenti in quantità di circa 0,4 %.

I fosfolipidi sono circa l'1,5 %, mentre i fitosteroli, soprattutto il P-sitosterolo è presente in quantità dell'1,1 % (Szczesna et al., 2006).

Gli acidi grassi insaturi costituiscono il 70% del totale dei grassi (Serra- Bonvehi and Escola-Jorda, 1997).

1.3.4 Minerali e tracce di elementi

Sono presenti valori discordanti che dipendono dal tipo di polline analizzato. La determinazione è stata fatta dagli autori Szczesna and Rybak-Chmielewska (1998) ed è stata fatta sul valore delle ceneri del polline. Il minerale presente in maggiore quantità è il potassio (circa il 60% del contenuto del totale dei minerali), poi si ha per il 20% il magnesio, mentre il sodio e il calcio sono presenti solo per il 10%.

1.3.5 Vitamine

Il polline contiene numerose vitamine sia liposolubili che idrosolubili. Tra le prime sono presenti la provitamina A, E e D, nella quantità dello 0,1%, mentre tra le idrosolubili sono presenti la vitamina B1, B2, B6 e C nell'ordine dello 0,6% (Campos et al., 1997).

1.3.6 Proteine e aminoacidi

Il polline contiene in media il 20 % di proteine su sostanza secca, di cui il 10% sono aminoacidi essenziali che l'organismo non è in grado di sintetizzare come metionina, lisina, treonina, istidina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e triptofano, mentre la cistina è presente in bassa quantità (Kedzia B. and Holderna-Kedzia E., 2005).

Il contenuto proteico del polline varia molto in base alla pianta, cambiando dal 7% per il pino al 35% per il dattero (Witherell, 1975). La maggior parte degli aminoacidi sono nella forma legata, di conseguenza il numero degli aminoacidi liberi è molto minore, di circa un quinto (Grünfeld, Vincent et al., 1989).

La prolina, l'acido glutammico, aspartico, la lisina e la leucina sono gli amminoacidi predominanti e costituiscono il 55% del totale degli amminoacidi (Szczesna et al., 2006). È stato notato che quando il polline viene essiccato a basse temperature per un periodo breve di tempo, non vengono prodotti i composti di Maillard; invece quando il processo di essiccamento è effettuato alla temperatura di 60°C per 2 ore o a 40°C per una settimana, si ha la degradazione di S-metilmetionina in dimetilsulfide responsabile di sapori sgradevoli (Collin et al., 1995). La qualità del polline dipende quindi soprattutto da come viene trattato e conservato.

Dagli studi effettuati da Serra Bonvehi et al., (1991) tra gli amminoacidi liberi la prolina è quella presente maggiormente e può raggiungere anche quantità di 19,7 mg/g ed essere il 63,1 % del contenuto degli amminoacidi totali.

Gli stessi autori, nel 1986 avevano individuato che la prolina è l'aminoacido predominante nel polline essiccato e conservato, mentre l'acido glutammico è predominante nel polline fresco. Il livello di prolina che viene formato dall'acido glutammico durante il processo di *drying* è influenzato dalla presenza e

dall'attività della glutammato deidrogenasi (Britikov et al., 1964, Pálfi et al., 1974). Quando la temperatura e la durata del processo di *drying* sono eccessivamente alti o lunghi, il contenuto di amminoacidi diminuisce (<2 g/100 g) e di conseguenza, la quantità media della prolina nei confronti degli amminoacidi liberi aumenta (>80%). Al contrario, quando il processo di *drying* è eseguito correttamente e il contenuto di acqua raggiunge 4-8 g/100 g, il contenuto di amminoacidi liberi resta alto cioè maggiore di 2,5 g/100g.

Il rapporto tra prolina/amminoacidi totali liberi può essere usato come indicatore dell'invecchiamento e della freschezza del polline. Questo rapporto deve essere inferiore al 65%.

È presente inoltre un alto contenuto di acidi nucleici come il ribonucleico (Kedzia B. and Holderna-Kedzia E., 2005).

L'interesse nella conoscenza del profilo aminoacidico del polline si è concentrato su 3 campi: il primo, come strumento per una differenziazione botanica e geografica del polline e del miele (Cometto, P. M., Faye, P.F. et al., 2003). Il secondo campo riguarda la nutraceutica, infatti da un punto di vista nutrizionale, il polline può essere considerato come importante fonte di proteine o amminoacidi essenziali (Abreu, 1992).

Infine, come riportato in precedenza, il contenuto di amminoacidi liberi può essere indicatore di qualità, quale la freschezza e quindi di un corretto processo di essiccamento del polline. Infatti, il polline per essere commercializzato nel mercato europeo, deve contenere una quantità minima di 2g/100g di amminoacidi liberi.

1.3.7. Composti fenolici

Gli autori Serra Bonvehí et al., (2001) hanno evidenziato nel polline la presenza di un'alta quantità di composti fenolici e flavonoidi, altamente antiossidanti largamente diffusi in alimenti di origine vegetale.

La maggior parte dei flavonoidi presenti nel polline sono sottoforma di glicosidi, cioè legati ad uno zucchero tramite un legame emiacetalico ad uno o più gruppi idrossilici. Grazie all'azione degli enzimi glicosidasi, lo zucchero viene scisso dall'aglicone. Lo zucchero più legato è il D-glucosio, anche se è molto facile

trovare il D-galattosio e l'L-ramnosio; ci sono poi composti come la rutina, il cui aglicone è legato a un disaccaride, in questo caso il rutinosio.

Nelle piante sono stati trovati anche molti agliconi liberi e sono state fatte molte ipotesi se questi fossero presenti naturalmente nella forma libera oppure se fosse dovuta all'attività delle api. Il polline raccolto dalle api viene coperto col miele e con la loro secrezione salivare, quest'ultima contiene enzimi idrolitici come α e β -glucosidasi in grado di scindere i glicosidi e liberare agliconi. La presenza di una larga quantità di rutina libera nel polline è dovuta quindi all'attività di questi enzimi (Stanley, R. G. *et al.*, 1974).

La determinazione quantitativa di ogni flavonoide glicoside è complessa, ma mediante l'idrolisi dei glicosidi in agliconi è più semplice avere una determinazione quantitativa dei flavonoidi (Hertog, M. G. *et al.*, 1992).

Gli agliconi dei flavonoidi liberi sono correlati con la qualità del polline e valori minimi di questi composti possono indicare l'accettabilità del prodotto.

Serra Bonvehí *et al.*, (2001) hanno effettuato un'analisi degli agliconi liberi del polline, mediante HPLC e sono stati individuati 15 composti aventi composizione qualitativa simile, di questi 13 sono stati identificati. Sono stati identificati: derivati degli acidi benzoici (acido 3,4-diidrossibenzoico, acido protocatecuico, acido 4-idrossibenzoico etilestere, acido vanillico, acido siringico), gli acidi idrossicinnamici (acido p-cumarico, o-cumarico, trans-cinnamico), poi i flavonoli e flavoni tra cui rutina, quercitina, campferolo, miricetina, isoramnetina.

La rutina è l'aglicone libero più abbondante e la sua determinazione può definire la qualità del polline; è il componente che subisce maggiori variazioni quando viene sottoposto a elevate temperature e a processi di stoccaggio per tempi abbastanza lunghi, infatti basse quantità di rutina sono spesso correlabili a processi condotti a elevate temperature o a stoccaggi per tempi abbastanza lunghi. Quindi a livello europeo per essere commercializzato, il polline deve contenere una quantità minima di rutina di 20 mg/100 g.

Esiste inoltre una correlazione positiva tra il tenore in rutina e quello in amminoacidi liberi.

1.4 Valore nutrizionale del polline

Nei secoli l'uomo si è interrogato quale fosse il valore nutrizionale del polline; già nella Bibbia è lodato il consumo di piante capaci di produrre i semi, quindi il polline. Gli egizi lo descrivono come "polline in grado di dare la vita". I greci sostenevano le pallottole di polline portate dalle api fossero fatte di cera, ma Aristotele, nel trattato *Historia animalium*, sostiene che le api rassemblano la cera, ma che il polline sia il loro nutrimento.

I padri della medicina quali Ippocrate, Gaio Plinio Secondo e Pitagora prescrivevano spesso polline delle api ai pazienti, sostenendo che avesse numerose proprietà benefiche.

Per secoli, invece di essere chiamato polline, veniva chiamato "pane per le api". Il primo ad usare il termine polline è stato John Ray nel 1686, nel trattato *Historia plantarum*.

L'utilizzo del polline nella nutrizione umana su più ampia scala è cominciato solamente quando si è diffuso l'utilizzo di trappole, quindi dopo la seconda guerra mondiale. Negli ultimi decenni molti autori si sono concentrati sullo studio delle proprietà nutrizionali e terapeutiche del polline, soprattutto nel fornire dati scientifici evidenti tali da garantire un prodotto di qualità atto alla commercializzazione.

La maggiore difficoltà nell'utilizzo del polline a scopo terapeutico sta nella variabilità della composizione che dipende dall'origine botanica (Campos et al., 2010). Sin dall'inizio gli apicoltori dovrebbero fare una buona selezione dei diversi tipi di polline; in realtà la raccolta del polline monofloreale è possibile, ma richiede numerose accortezze e buone tecniche apistiche. Un altro modo per ottenere un prodotto standardizzato è quello di miscelare diversi tipi di polline al fine di ottenere una composizione costante.

Una volta che il polline viene definito dalla legislazione come alimento, diventa importante indicare anche il valore nutrizionale di questo prodotto.

1.5 Biodisponibilità del polline e effetti benefici

Come già citato in precedenza, il polline ha un alto contenuto di composti biologici, la quantità è molto variabile e dipende dalla specie botanica di appartenenza del fiore; esso contiene un'alta concentrazione di zuccheri riducenti, amminoacidi essenziali, acidi grassi saturi e insaturi, minerali, alto rapporto di K/Na e una significativa quantità di vitamine. È stato determinato che quando viene ingerito un cucchiaino intero di polline, questo corrisponde a 15 g di polline di api.

Il contenuto delle fibre e delle proteine della dieta può essere significativo e raggiungere il 20% dei valori richiesti giornalmente (RDI). È stato affermato che 15 g del polline esaminato è abbastanza per coprire la richiesta giornaliera di amminoacidi (Peris, 1984; Nagai et al., 2007), anche se questa percentuale così alta vale soprattutto per i pollini ricchi in amminoacidi.

Il 3% del totale dei lipidi sono acidi grassi liberi, solo la metà sono acidi oleici insaturi, appartenenti alla famiglia degli omega-6 e omega-3; questi ultimi sono acidi grassi essenziali, che l'organismo non è in grado di sintetizzare, sono importanti costituenti delle membrane cellulari e precursori di molte altre fondamentali sostanze.

Altri composti fisiologicamente importanti sono gli steroli; il polline apporta una buona quantità della maggior parte delle vitamine, quali provitamina A, vitamina E (tocoferolo), niacina, tiamina, acido folico e biotina.

Per quanto riguarda i minerali, il polline è in grado di apportare quasi tutti gli elementi della RDI (dose giornaliera consigliata), tranne il fosforo e il calcio; anche se in questo caso dipende dalla composizione e dalla varietà del polline.

Il polline apporta carboidrati solubili come glucosio e fruttosio, che però non sono così fondamentali dal punto di vista nutrizionale.

L'interesse invece si è rivolto ai polifenoli e flavonoidi. Questi composti secondari donano al polline numerose proprietà benefiche, quali antiossidanti, anti-invecchiamento, anticancerogene, anti-infiammatorie, cardio-protettive, prevengono l'aterosclerosi e migliorano le funzioni endoteliali. Molte di queste funzioni biologiche sono dovute alla loro intrinseca capacità riducente.

Questi possono inoltre proteggere indirettamente mediante l'attivazione del sistema endogeno e modulando diversi processi fisiologici (Han et al., 2007).

Un altro gruppo di composti presenti nel polline sono i fitosteroli. Hanno numerose proprietà, ma tra le più importanti si può annoverare la capacità di abbassare il livello di colesterolo nel sangue ed avere possibili effetti antiaterogenici; inoltre hanno proprietà immunostimolanti e antiinfiammatorie, queste dovute soprattutto ai beta-sitosteroli.

1.6 Digeribilità del polline

Molti studiosi si sono chiesti se il rivestimento del polline potesse essere rotto e digerito dall'uomo. Inizialmente sono stati fatti esperimenti sugli animali che hanno dimostrato che il polline non era in grado di conservare il suo contenuto dopo aver transitato il tratto digestivo. Sono state quindi formulate le ipotesi che, negli animali, il contenuto nutrizionale del polline venisse ridotto dall'azione dei succhi gastrici (Schmidt et al., 1984; Roulston et al., 2000).

Altri studi, effettuati sugli umani, hanno dimostrato che il polline venisse assorbito nel tratto digestivo (Jorde et al., 1974) ma che erano presenti differenze nel grado di digestione del polline di papavero e di nocciola, con un assorbimento medio del 15% dei carboidrati e del 53% delle proteine (Franchi et al., 1997).

Gli autori Rimpler et al., (2003) hanno quindi ipotizzato che il polline non fosse stato digerito del tutto e che una rottura avrebbe aumentato la digeribilità e la biodisponibilità.

Ultimamente molte aziende vendono polline già frantumato, sostenendo che questo prodotto sia più facile da digerire. La macerazione di questo per molte ore in acqua o in altri liquidi è consigliata per aumentare la digeribilità; questo metodo è infatti utilizzato anche per alcune tipologie di grano.

Molti autori si sono concentrati sullo studio degli effetti nutrizionali del polline sui topi. L'autore Chauvin (1987) ha dimostrato che i topi nutriti col polline d'api avevano un maggiore aumento di peso, nonostante mangiassero meno dei controlli. Il nutrimento era costituito da polline assortito in diverse percentuali, da 10 a 50, mischiato con mais e i controlli erano integrati con supplemento di caseina.

È molto probabile che il polline migliori la digeribilità del cibo; è stato sottoposto il polline a un trattamento con acqua fredda, lasciandolo in ammollo. Questo

prodotto agisce in modo positivo soprattutto sulle cavie di sesso femminile, mentre causa una diminuzione della crescita in quelli di sesso maschile. La nutrizione con polline causa un aumento della riproduzione dal 40 all'80% rispetto ai controlli.

Ulteriori studi hanno confermato i risultati precedenti. Slijepcevic et al. (1978), hanno dimostrato che topi nutriti con polline per 6 mesi, mostravano un aumento del tasso di crescita.

Un altro esperimento è stato fatto nutrendo dei topi in gravidanza con polline d'api; i risultati hanno dimostrato che l'ingestione di polline era in grado di migliorare l'apporto nutrizionale della madre, senza influenzare il normale sviluppo del feto. Questo può quindi essere considerato un nutriente favorevole durante la gravidanza (Xie et al., 1994).

Altri studi sugli animali, in questo caso sui polli, hanno dimostrato che questi nutriti con polline avevano un migliore sviluppo dei villi intestinali del duodeno, digiuno e ileo. Il polline può quindi essere considerato promotore dello sviluppo iniziale del sistema digerente (Wang et al., 2007).

Per quanto riguarda l'uomo, il polline può essere adatto per gli sportivi. In alcuni paesi, gli sportivi competitivi hanno provato ad utilizzare gli estratti del polline come supplemento della dieta, credendo che potesse essere d'aiuto per migliorare le prestazioni. Esperimenti mirati hanno invece dimostrato che non sono stati ottenuti benefici positivi dall'utilizzo di questi supplementi.

1.7 Attività antimicrobica del polline

In uno studio condotto dagli autori Campos et al. (1998), sono stati isolati diversi flavonoidi da *Ranunculus sardous* e *Ulex europeans*. Questi flavonoidi hanno una marcata attività antibiotica contro *Pseudomonas aeruginosa*. Ulteriori estrazioni di flavonoidi da *Eucalyptus globulus*, soprattutto ricchi in derivati di quercitina, non mostravano alcuna attività antibatterica (Campos et al., 1998).

L'attività antibatterica del polline di origine turca è stata testata su 13 diverse specie di batteri patogeni per le piante, tra cui molte specie di *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. I risultati mostrano che il polline ha un effetto

inibitorio nei confronti di tutte le 13 specie dei patogeni, quindi questi estratti hanno il potenziale di proteggere i semi dalle infezioni (Basim et al., 2006).

Gli autori Baltrusaitye et al., (2007) hanno constatato che il polline possiede un'attività antibatterica contro *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*; mentre Carpes et al., (2007), hanno notato che in estratti di polline originario del Brasile, (con etanolo all'80%), l'attività antibatterica era effettuata contro *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp.*

Le sostanze antibatteriche presenti nel polline, sono attive contro *Streptococcus viridans* e sono simili a quelle trovate nel propoli e nei favi.

1.8 Attività antiossidante: radicali liberi e difese endogene

Nelle cellule umane e in generale in tutti gli organismi aerobici, avvengono processi biochimici che consumano ossigeno per generare energia. Questo processo, chiamato ossidazione, dà origine a prodotti di scarto potenzialmente dannosi: i radicali liberi.

I radicali liberi, dal punto di vista chimico, sono molecole molto reattive che hanno vita media brevissima, hanno uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno. Questo induce i radicali liberi ad acquisire elettroni mancanti da altre molecole, che diventano a loro volta instabili e cercano un elettrone da altre molecole ancora, innescando una reazione a catena, che crea instabilità. Questa elevata reattività può danneggiare spesso le cellule in modo irreversibile e provocare reazioni indesiderate e lesive per le cellule e di conseguenza anche per i tessuti e gli organi.

I ROS, cioè le "specie reattive dell'ossigeno", sono le molecole reattive più diffuse. I più importanti ROS sono l'anione superossido, il radicale idrossilico, il radicale perossidico e l'ossido di azoto; tra le specie non radicaliche sono presenti il perossido di idrogeno, l'acido ipocloroso e l'ossigeno singoletto.

La formazione di ROS avviene principalmente nei mitocondri, dove avvengono i processi ossidativi, nei quali l'ossigeno funge da accettore finale di elettroni per la produzione di energia (respirazione cellulare). L'ossigeno quindi, viene sottoposto

ad una serie di riduzioni in cui sottrae elettroni ad altre molecole, dando origine a intermedi radicalici.

Il ROS più reattivo e in grado di provocare più danni ai sistemi biologici è il radicale idrossilico; questo si genera dalla reazione dello ione ferroso (Fe^{++}) con il perossido di idrogeno, processo noto come reazione di Fenton.

Altre ROS si formano dal metabolismo degli acidi grassi poliinsaturi a partire dall'acido arachidonico durante la produzione degli eicosanoidi (prostaglandine, trombossani e leucotrieni), molecole che svolgono funzioni importanti a livello dell'apparato cardio-vascolare.

La produzione di radicali liberi, in alcuni casi, può essere considerata utile per l'organismo; nei macrofagi il radicale superossido viene utilizzato come "killer" contro batteri e virus patogeni.

Oltre ai meccanismi endogeni, altri fattori causano la produzione di radicali liberi quali stress di varia natura, diete sbilanciate, fumo, alcool, intensa attività fisica, raggi solari e inquinamento.

Un eccesso di ROS, contribuisce ai processi di invecchiamento precoce delle cellule ed è coinvolto nello sviluppo del cancro e di malattie croniche, neurodegenerative e cardiovascolari come sclerosi multipla, ischemia, arteriosclerosi, diabete, cataratta, morbo di Parkinson, Alzheimer, epatite, dermatiti e distrofia muscolare (Halliwell et al., 1990; Ames et al., 1992).

Nella cellula, in condizioni normali ci sono numerosi meccanismi di difesa endogeni costituiti da macromolecole (albumina, ceruloplasmina, ferritina e altre proteine), da enzimi (superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi), micromolecole (glutazione, acido urico, tocoferoli, acido ascorbico, carotenoidi, polifenoli), ormoni (estrogeni, melatonine, angiotensina). Questi composti evitano che i radicali liberi arrechino danni al DNA, proteine e lipidi.

Per esempio la SOD (superossido dismutasi), la catalasi e il glutazione, trasformano le ROS in perossido d'idrogeno per azione di enzimi citoplasmatici e mitocondriali.

Molto spesso però, i sistemi endogeni non riescono a fornire una adeguata protezione contro le ROS, occorre quindi introdurre nella dieta composti antiossidanti

1.9 Gli antiossidanti: definizione e meccanismo di azione

Gli antiossidanti sono sostanze chimiche (molecole, ioni, radicali) che, in basse concentrazioni rispetto al substrato ossidabile, sono in grado di rallentare o prevenire l'ossidazione del substrato stesso.

In base al meccanismo d'azione, gli antiossidanti si possono dividere in due categorie: chain breaker e metal scavenger .

I “**Chain breaker**”, sono composti che hanno il potenziale di riduzione negativo e possono fornire ai radicali liberi gli elettroni mancanti, ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. La loro efficienza dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si formano; quindi maggiore è la delocalizzazione degli elettroni spaiati prodotti nella reazione con i radicali liberi, maggiore è il loro potere antiossidante.

Gli antiossidanti appartenenti a questa categoria possono disattivare le specie radicaliche tramite due fondamentali meccanismi: per trasferimento di un atomo di idrogeno, chiamate HAT (Hydrogen Atom Transfer), oppure mediante trasferimento di un singolo elettrone, chiamate SET (Single Electron Transfer); comunque il risultato finale è lo stesso, ma le cinetiche ed il potenziale delle reazioni sono diversi (Prior et al., 2005).

Queste due reazioni possono anche avvenire contemporaneamente, ma la struttura chimica dell'antiossidante, le proprietà di solubilità, coefficiente di partizione e solvente, determineranno quale sarà il meccanismo di azione prevalente.

L'energia di dissociazione dei legami ed il potenziale di ionizzazione, sono i fattori principali che influiscono sull'efficienza dell'antiossidante.

Gli antiossidanti donatori di un atomo di idrogeno agiscono in questo modo:

Trasferimento di un atomo di H al radicale libero



Perché una sostanza si comporti da antiossidante, una volta ossidata, la sua forma radicalica deve essere poco o non reattiva nei confronti di altre molecole.

Le reazioni HAT sono indipendenti dal solvente e dal pH del mezzo e, di solito, avvengono molto velocemente, finiscono nel giro di qualche secondo o qualche minuto. Le reazioni SET invece decorrono lentamente e sono pH-dipendenti.

L'elettrone può essere donato al radicale libero o a un metallo proossidante.

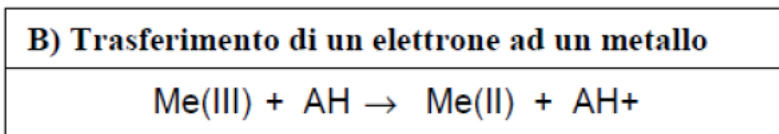
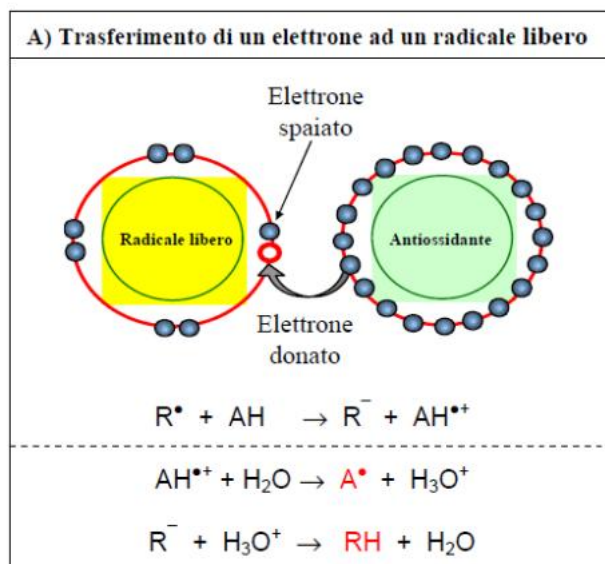
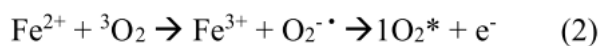
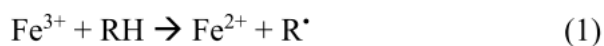


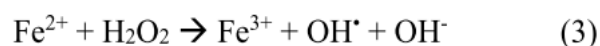
Figura 1A e 1B: schema di azione di un antiossidante donatore di elettroni (R = specie radicalica; AH antiossidante; Me=metallo)

A questo gruppo di antiossidanti appartengono il terz-butil-idrossianisolo (BHA), il diterz-butil-idrossitoluene (BHT), il terz-butil-idrossichinone (TBHQ), il propilgallato (PG), i tocoferoli ed i composti fenolici.

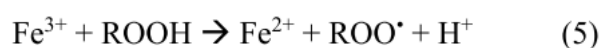
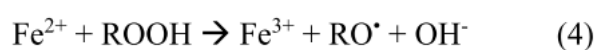
I “**Metal scavenger**” evitano la formazione di radicali liberi agendo da agenti chelanti dei metalli. Gli ioni metallici (ferro o rame) sono potenti pro-ossidanti perchè aumentano l'energia di attivazione delle reazioni di iniziazione dell'ossidazione lipidica, andando a generare radicali alchilici a partire da acidi grassi (1) oppure inducendo la formazione di ossigeno singoletto tramite l'anione superossido (2):



Inoltre i metalli producono radicali liberi tramite la reazione di Fenton (3), perpetuando l'ossidazione lipidica. Questa reazione è la via principale di formazione di radicali alcossilici, i più reattivi e pericolosi ROS dei sistemi biologici:



Dalla decomposizione degli idroperossidi lipidici, si formano altri radicali liberi dai metalli (4) e (5). Il metallo interviene sia nella forma ridotta (Fe^{2+}) che in quella ossidata (Fe^{3+}), è stato notato che quest'ultima produce radicali con una velocità dieci volte più bassa.



Alcuni metal-scavenger sono l'acido etilen-diamminotetraacetico (EDTA), l'acido ascorbico, l'acido citrico, e alcuni amminoacidi.

I limiti tra le due classi di antiossidanti, in natura, non sono così definiti, alcune sostanze come i composti fenolici, possono comportarsi sia da chain breaker che da metal scavenger (Cuvelier, 1997)

1.9.1 Gli antiossidanti più diffusi in natura

Gli antiossidanti sono presenti maggiormente nel regno vegetale. Molte piante sintetizzano questi composti per numerose esigenze come difendersi dai parassiti, dagli agenti tossici, dalle condizioni ambientali inadeguate e dai raggi ultravioletti;

Tra gli antiossidanti più diffusi ci sono gli antociani e i flavonoidi, che sono responsabili della colorazione di fiori e foglie, in grado di attirare gli insetti impollinatori; inoltre sono presenti lignina e tannini che danno un supporto strutturale. I flavonoidi e altre sostanze fenoliche semplici funzionano da regolatori e sono fitormoni.

Queste funzioni avvengono solo a spese del metabolismo primario delle piante come l'accrescimento e la riproduzione; parte degli assimilati sono destinati allo svolgimento delle attività del metabolismo secondario.

La protezione da stress ossidativi è particolarmente importante nel metabolismo secondario; infatti, le piante che hanno un metabolismo secondario spiccato, sono più ricche in sostanze antiossidanti.

Negli alimenti quali frutta e vegetali è presente una grossa quantità di antiossidanti, questi ricadono in tre grandi gruppi: le vitamine, i composti fenolici e i carotenoidi.

Tra gli antiossidanti idrofili, i più diffusi sono l'acido ascorbico e i fenoli, mentre tra quelli lipofili troviamo i carotenoidi. I minerali quali selenio, rame e zinco svolgono funzioni antiossidanti in modo indiretto, dato che partecipano alla regolazione di enzimi coinvolti nel meccanismo di difesa antiossidante.

1.9.2. I composti fenolici

Sono composti organici naturali; la molecola di base per la costruzione di svariate strutture fenoliche è un acido aromatico, definito acido trans-cinnamico che deriva dalla deamminazione dell'amminoacido L-fenilalanina, tramite l'azione dell'enzima fenilalanina ammoniaca liasi (PAL).

Le strutture più semplici sono costituite da un solo anello benzenico, per esempio il timolo. Per classificare le principali classi di composti fenolici, è utile prendere in considerazione lo scheletro carbonioso che costituisce l'asse fondamentale per la differenziazione strutturale:

| Classi fenoliche | Struttura |
|--|-------------------|
| Fenoli semplici, benzochinoni | C_6 |
| Acidi idrossibenzoici | C_6-C_1 |
| Acidi fenilacetici | C_6-C_2 |
| Acidi idrossicinnamici, fenilpropanoidi (cumarine, isocumarine, cromoni, cromeni) | C_6-C_3 |
| Naftochinoni | C_6-C_4 |
| Xantoni | $C_6-C_1-C_6$ |
| Stilbeni, antrachinoni | $C_6-C_2-C_6$ |
| Flavonoidi, isoflavonoidi | $C_6-C_3-C_6$ |
| Lignani, neolignani | $(C_6-C_3)_6$ |
| Biflavonoidi | $(C_6-C_3-C_6)_2$ |
| Lignine | $(C_6-C_3)_n$ |
| Tannini condensati (proantocianidine) | $(C_6-C_3-C_6)_n$ |

Figura 2: Classi dei composti fenolici presenti nelle piante e scheletro carbonioso

Inoltre le sostanze fenoliche si possono distinguere in composti a basso, intermedio ed alto peso molecolare (Figura 3)

| Peso molecolare | Struttura | Classe fenolica |
|-----------------|--|---|
| Basso | C ₆ -C ₁ C ₆ -C ₃ | Acidi idrossibenzoici Acidi idrossicinnamici |
| Intermedio | C ₆ -C ₃ -C ₆ | Flavonoidi |
| Alto | (C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n | Tannini idrolizzabili Tannini condensati |

Figura 3: Classificazione dei composti fenolici in base al loro peso molecolare

È possibile classificare i polifenoli in due gruppi flavonoidi e non flavonoidi.

Tra i non flavonoidi si distinguono:

- Acidi idrossicinnamici: derivano dall'acido p-cumarico (o p-idrossicinnamico), sono fenilpropanoidi. In natura sono comuni quattro varianti della formula di base C₆-C₃: acido cumarico, caffeico, ferulico, sinapico (Figura 4). Sono presenti nei vegetali legati chimicamente ad altri composti; per esempio l'acido colorogenico deriva dall'esterificazione dell'acido caffeico con l'acido chinico. Nelle piante, gli acidi idrossicinnamici svolgono azione antibiotica e molte funzioni connesse all'inibizione della crescita e della germinazione.

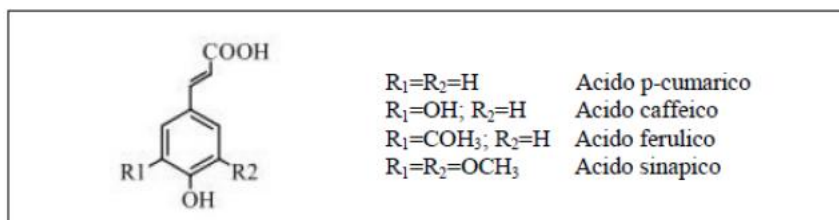


Figura 4: Principali acidi idrossicinnamici e strutture chimiche

- Acidi idrossibenzoici: la struttura di base deriva dall'acido idrossibenzoico (Figura 5). I composti presenti in maggiore quantità nel mondo vegetale sono l'acido gallico e l'acido vanillico. L'acido gallico è il monomero di base dei tannini idrolizzabili.

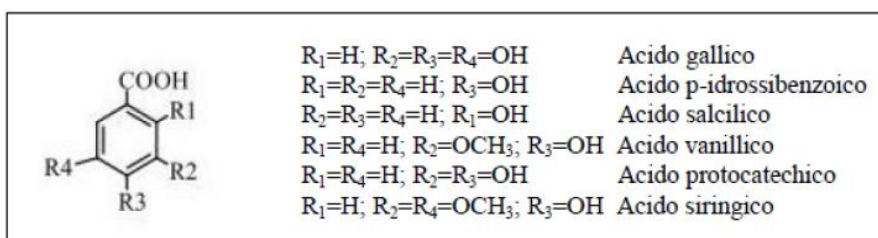


Figura 5: Strutture chimiche dei principali acidi idrossibenzoici

- Stilbeni: sono composti fenolici a basso peso molecolare. Sono costituiti nella loro molecola da due anelli benzenici separati da un etano o da un ponte etenico. Fanno parte di questa categoria i composti come il trans-resveratrolo e il cis-resveratrolo.

I flavonoidi sono costituiti da due anelli aromatici (A e B) e da un eterociclo di collegamento, sono derivati del benzo- γ -pirone (Figura 6).

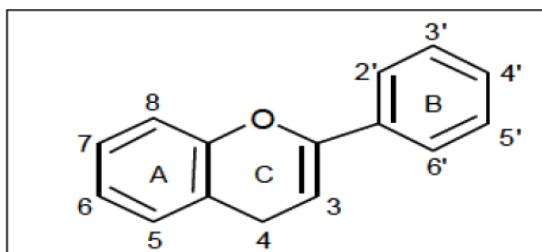


Figura 6: Scheletro di base dei flavonoidi

In base al tipo di eterociclo, al numero e alla posizione dei suoi sostituenti e dei sostituenti degli anelli benzenici, i flavonoidi sono suddivisi ulteriormente in:

- Antocianidine: hanno la caratteristica di essere colorati in modo diverso a seconda del pH del mezzo in cui si trovano e sono responsabili della pigmentazione di molti fiori e frutti. La cianidina, la delphinidina, la pelargonidina, la peonidina e la malvidina sono le antocianidine più comuni. Le loro formule di struttura si differenziano per il tipo di sostituente legato alla loro struttura base. In natura si trovano quasi esclusivamente le forme antocianiche, ovvero queste molecole legate con una o più molecole di zucchero, responsabile della loro stabilità e solubilità in acqua.
- Flavonoli: chiamati anche antoxantine, hanno una formula $C_6-C_3-C_6$. Spesso sono glicosilati, cioè legati a una molecola di zucchero. Le strutture monoglicosilate più diffuse sono 3-glucoside, 3-galattoside, 3-ramnoside e 3-glucoronide. Da questi sono stati isolati più di 200 agliconi; i più diffusi sono il kamferolo, la miricetina, la quercitina e l'isoramnetina.
- Flavanoli: presenti come monomeri come catechina, epicatechina; presenti invece come dimeri come teaflavina, proantocianidina e infine come polimeri.
- Flavani: la loro formula è $C_6-C_3-C_6$, l'eterociclo che è rappresentato dal pirano. È possibile distinguere in flavan-3-oli o catechine e flavan-3,4-

dioli o leucoantocianidine. A differenza degli antociani, le catechine non sono legate a molecole glucidiche e non hanno gruppi metossili come sostituenti dell'anello B. I flavan-3-oli costituiscono il gruppo di flavonoidi più diffusi nel mondo vegetale.

- Flavanoni: sono presenti essenzialmente negli agrumi, sono presenti in forma di agliconi. Sono invece molto meno presenti nelle altre forme glicosilate. I più comuni in natura sono naringenina, esperidina e naringina.
- Flavoni: costituiscono la classe dei fenoli meno rappresentata nel regno vegetale. Sono l'apigenina, la rutina, la luteolina.
- Isoflavonoidi: presenti soprattutto nelle piante leguminose. Hanno la caratteristica di avere legato l'anello B in posizione 3 e non in posizione 2 come i flavonoidi. Tra gli isoflavoni sono presenti la daidzeina, la daidzina, la formononetina, la genisteina, la genistina.

Per ultimo sono presenti i tannini, questi non possono essere considerati una vera e propria classe di composti, ma un gruppo di composti fenolici combinati tra loro, caratterizzati da un peso molecolare alto (tra 500 e 3000 Da) e da proprietà colloidali (sono colloidali negativi). Tendono a formare legami con alcaloidi, gelatine e altre proteine dando origine a precipitati. Esistono due tipologie di tannini: idrolizzabili e condensati. I tannini idrolizzabili sono poliesteri che tramite idrolisi acida o alcalina liberano acido gallico ed il suo dimero (acido diidrossifenolico), il quale per lattonizzazione forma l'acido ellagico.

I tannini condensati, chiamati anche proantocianidine, sono oligomeri (fino a dieci unità) o polimeri derivanti dalla condensazione o polimerizzazione ossidativa dei flavan-3-oli e dei 3,4 flavan-dioli, uniti con legami covalenti.

1.9.3 Biosintesi dei composti fenolici

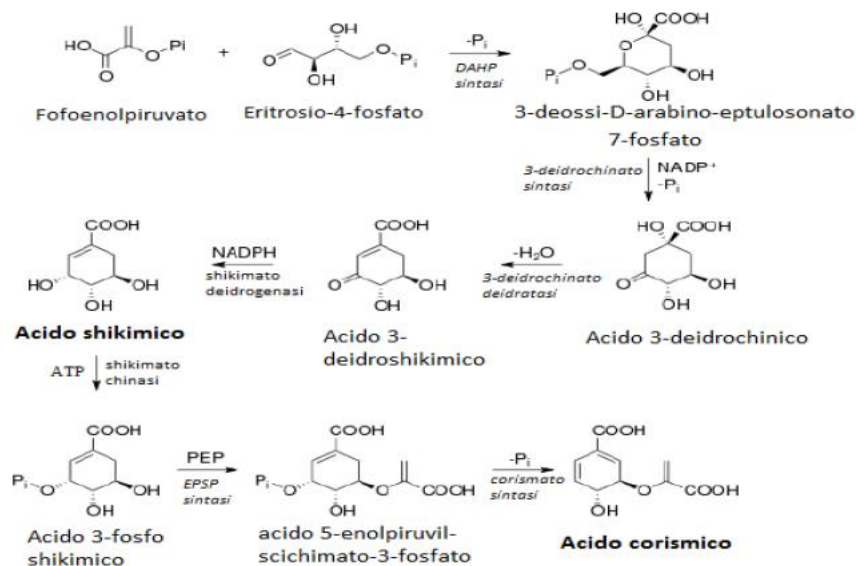
La via dell'acido scichimico e la via dell'acido malonico possono sintetizzare i fenoli.

Analizzando la via dell'acido scichimico, è possibile notare che la prima reazione comincia con la condensazione del fosfoenolpiruvato (prodotto terminale della

glicolisi) con l'eritrosio-4-fosfato (prodotto della via dei pentoso fosfati), per formare il 3-deossi-D-arabino-eptulonato 7-fosfato (DAHP), tramite l'azione dell'enzima DAHP sintasi. Nella seconda reazione, la 3-deidrochinato sintasi catalizza la formazione dell'acido 3-deidrochinico, un cicloesano variamente sostituito; questo rappresenta il substrato di un enzima bifunzionale, la 3-deidrochinato deidratasi e scichimato deidrogenasi.

Questo enzima permette la formazione dell'acido scichimico. Nel passaggio successivo, l'acido scichimico formato viene fosforilato: inizialmente si forma l'acido 3-fosfo-scichimico tramite una reazione catalizzata dall'enzima scichimato chinasi; in seguito si ha la formazione dell'acido 5-enolpiruvil-scichimato-3-fosfato (EPSP) mediante addizione del fosfoenolpiruvato in presenza della EPSP sintasi. Alla fine della reazione, l'enzima corismato sintasi permette la formazione dell'acido corismico allontanando una molecola di fosfato inorganico (figura 7).

Il termine corismico si riferisce alla biforcazione metabolica che porta da una parte alla sintesi acido prefenico (dunque degli amminoacidi fenilalanina e tirosina) e dall'altra parte quella dell'acido antranilico (precursore del triptofano) (Negro et al., 2011).



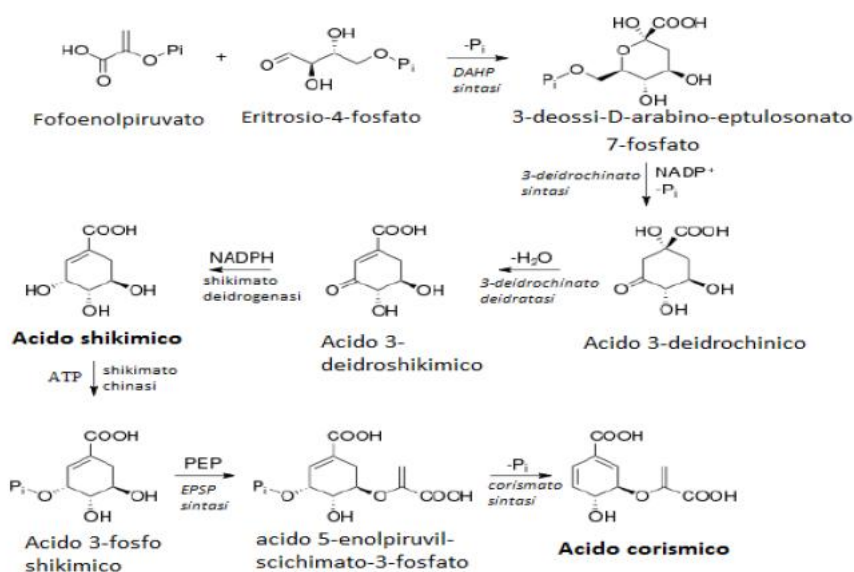


Figura 7: Biosintesi dell'acido corismico

Mediante l'enzima corismato mutasi, dall'acido corismico viene sintetizzato l'acido prefenico. Ed è il primo step specifico verso la sintesi della fenilalanina (Phe) e della tirosina (Tyr). Arrivati a questo punto, l'acido prefenico può intraprendere due vie differenti che conducono comunque alla formazione degli stessi prodotti.

Nella prima via, quando è presente un'amminotrasferasi, l'acido prefenico può essere convertito in acido L-arogenico; in seguito in una reazione catalizzata dall'arogenato deidratasi e dall'arogenato deidrogenasi, si formano la fenilalanina e la tirosina.

Nell'altra via, l'acido prefenico, tramite la profenato deidratasi e la profenato deidrogenasi, permette la formazione, rispettivamente, del fenil-piruvato e del 4-idrossifenilpiruvato, i quali produrranno, rispettivamente, la fenilalanina e la tirosina, mediante una reazione di transaminazione (Figura 8).

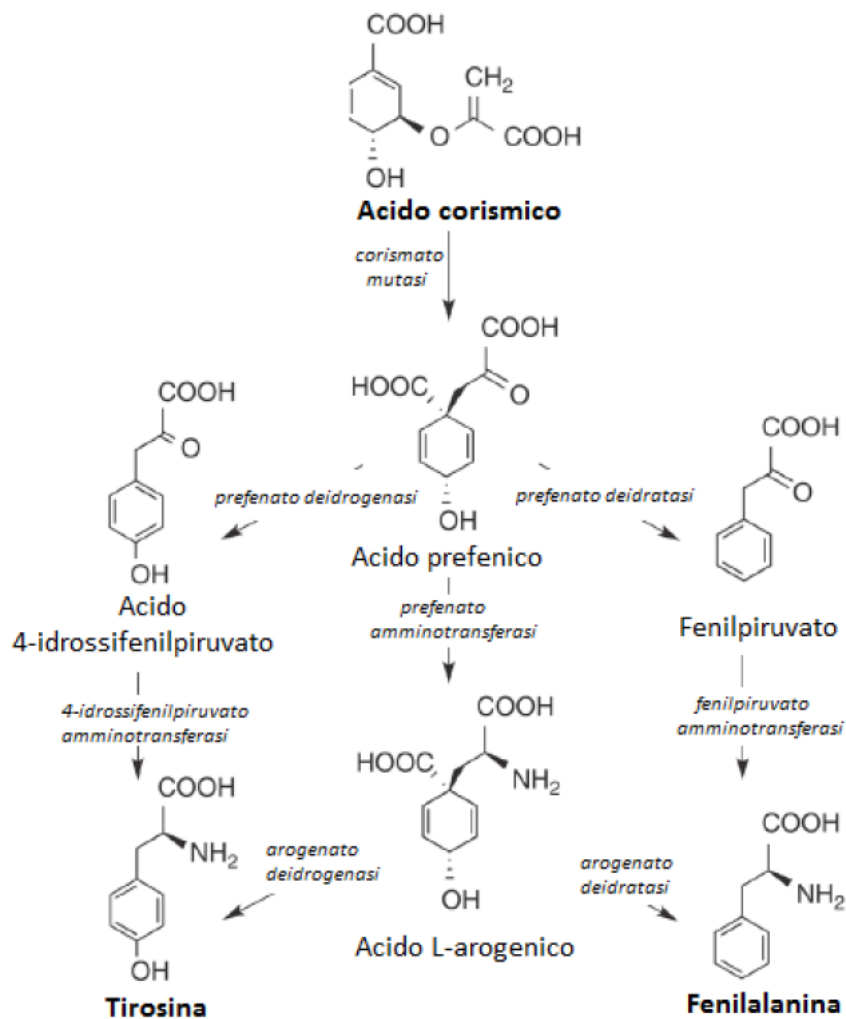


Figura 8: Biosintesi della fenilalanina e della tirosina

Una volta sintetizzata tramite questa via, la fenilalanina, viene utilizzata per la sintesi delle proteine.

L'enzima PAL (fenilalanina amonio liasi), opera la deaminazione della fenilalanina e si ottiene l'acido trans-cinnamico. La TAL (tirosina ammino liasi), un enzima analogo, catalizza la deaminazione della tirosina, mediante la formazione dell'acido trans-p-cumarico (Figura 9).

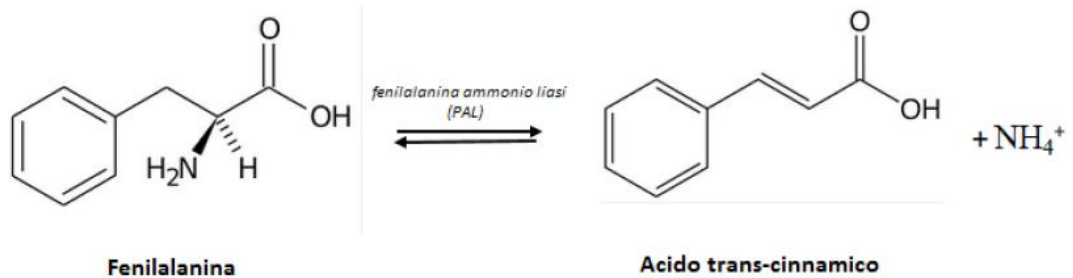


Figura 9: Sintesi dell'acido trans-cinnamico

Dall'acido trans-cinnamico vengono sintetizzati i principali acidi idrossicinnamici (figura 10).

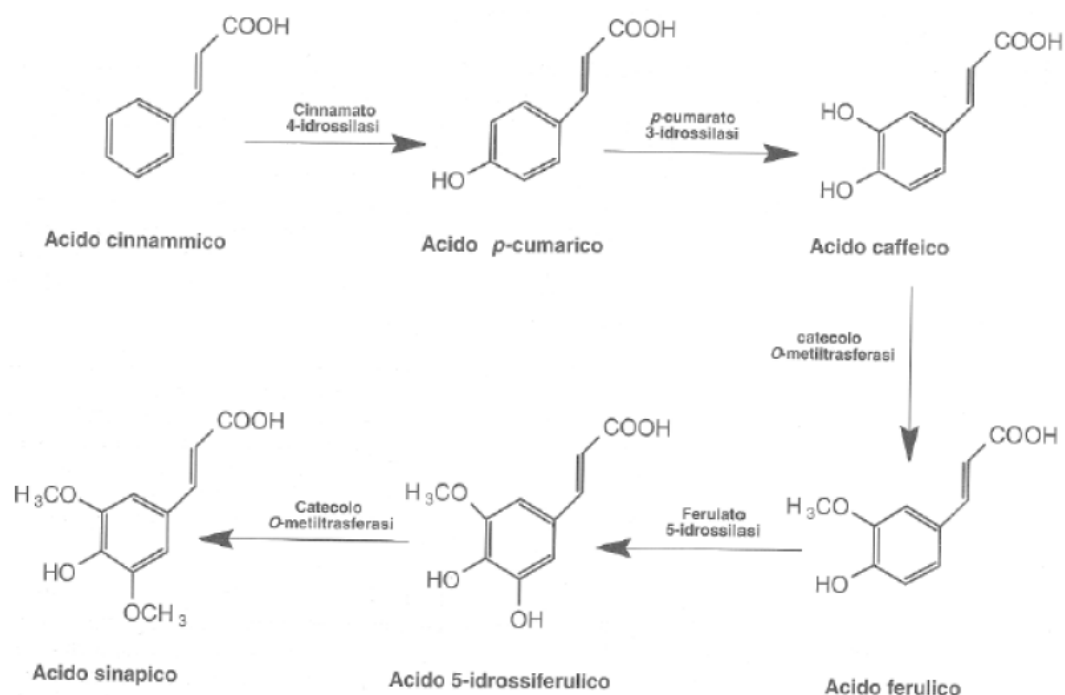


Figura 10: Sintesi dei principali acidi idrossicinnamici

I primi step della biosintesi dei flavonoidi, consistono nella condensazione di 3 molecole di malonil-CoA con una molecola di 4-cumaril-coA, mediante la calcone sintasi (CHS). Il malonil-CoA deriva dall'acetil-CoA mediante l'azione dell'enzima acetil-CoA carbossilasi.

Questi step sono mostrati nella figura 11.

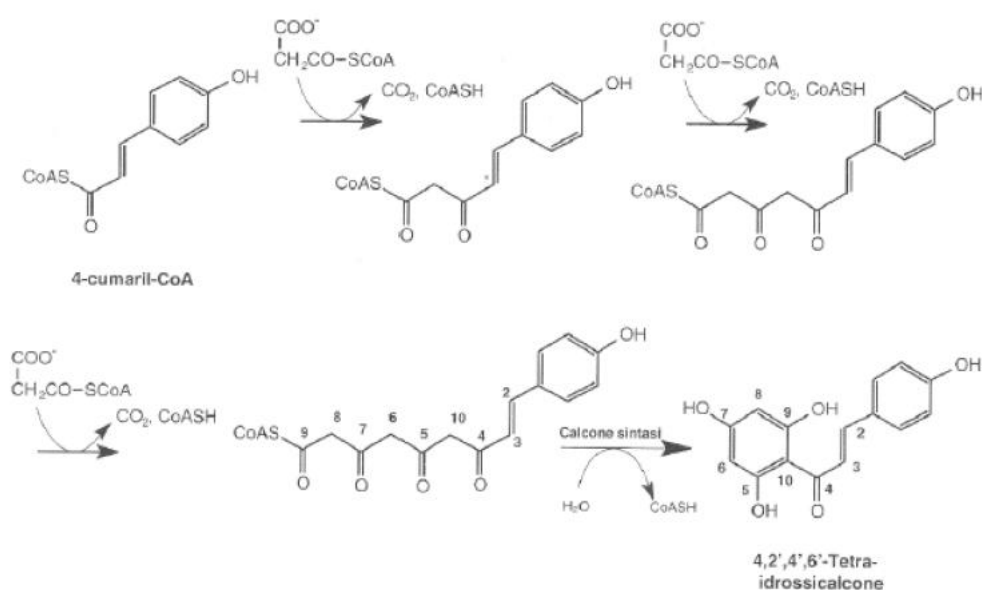


Figura 11: Step iniziali della biosintesi dei flavonoidi.

L'enzima CHI, calcione isomerasi, catalizza la chiusura dell'anello eterociclico centrale, soprattutto l'isomerizzazione del composto, che passa da avere un colore giallo 4,2',4',6'-tetraidrossicalcone nel composto incolore naringenina (Figura 12).

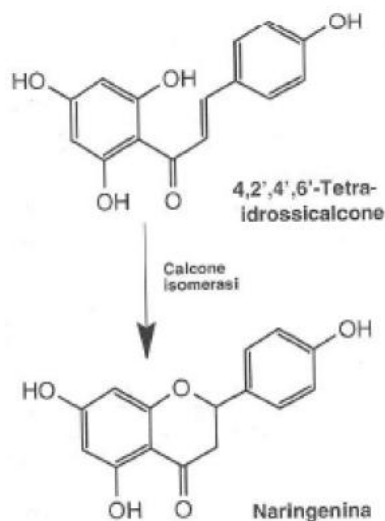


Figura 12: Sintesi della naringenina

L'enzima F3H, flavanone-3-idrossilasi, catalizza la conversione del flavanone naringenina in diidrocanferolo (DHK). Il DHK funziona da substrato per la sintesi dei flavonoli e delle antocianidine.

La flavonol sintasi, FLS, permette la sintesi del flavonolo canferolo; dalle ossidrilazioni catalizzate dalla flavonoide 3'-idrossilasi (F 3'H) e dalla flavonoide 3'-5'-idrossilasi (F 3'5'H), si sintetizzano, rispettivamente la diidroquercitina e la diidromiricetina che sono convertite rispettivamente in quercitina e miricetina dalla FLS (Figura 13).

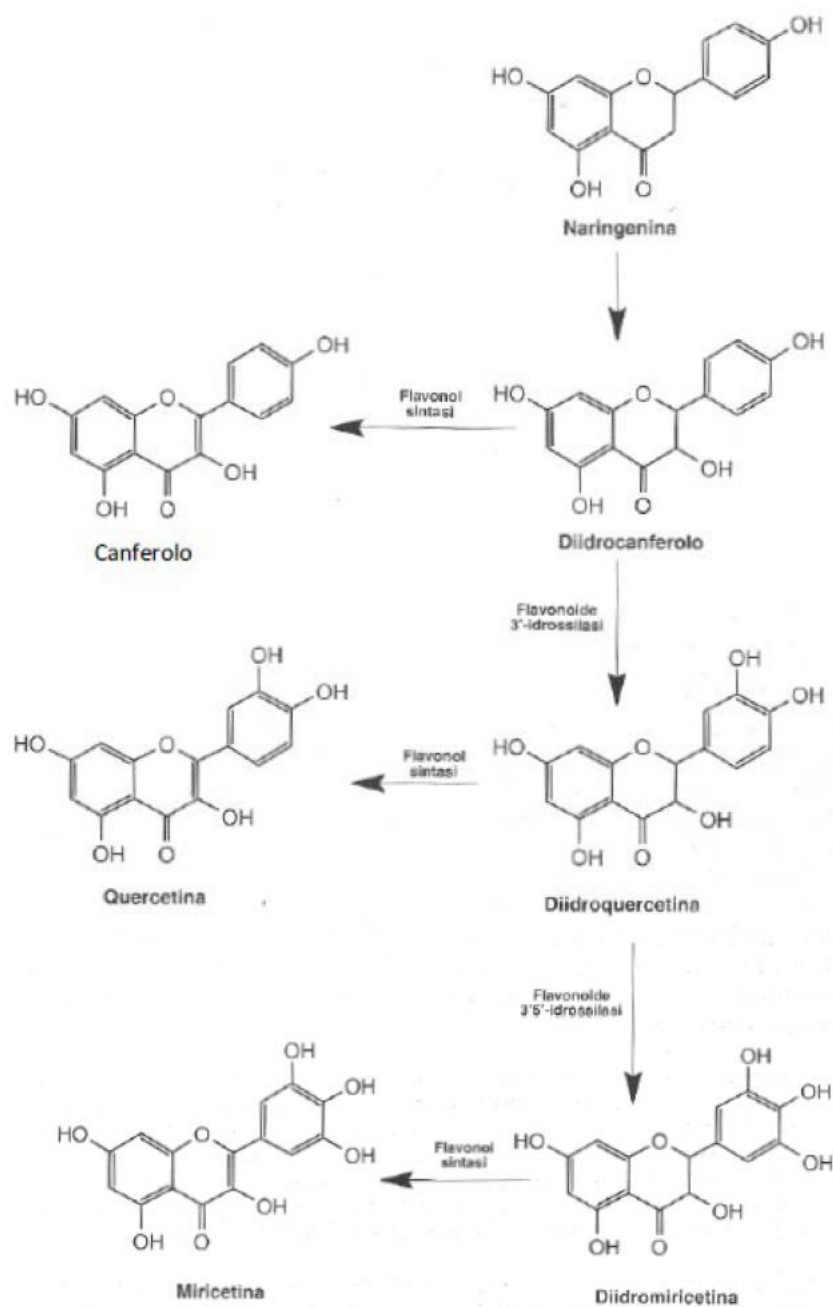


Figura 13. Sintesi del canferolo, della quercetina e della miricetina

I diidroflavonoli sono composti incolori, quindi per trasformare le antocianidine colorate sono necessari altri 3 enzimi: il primo enzima, DFR (la diidroflavonolo 4-reduttasi) catalizza la riduzione dei diidroflavonoli in leucoantocianidine;

L'antocianidina sintasi è responsabile di ulteriori processi di ossidazione, infine la glicosilazione delle leucoantocianidine avviene tramite l'enzima UDP glucosio:flavonoide 3-o-glucosiltransferasi (3GT), per produrre le antocianine colorate (Figura 14).

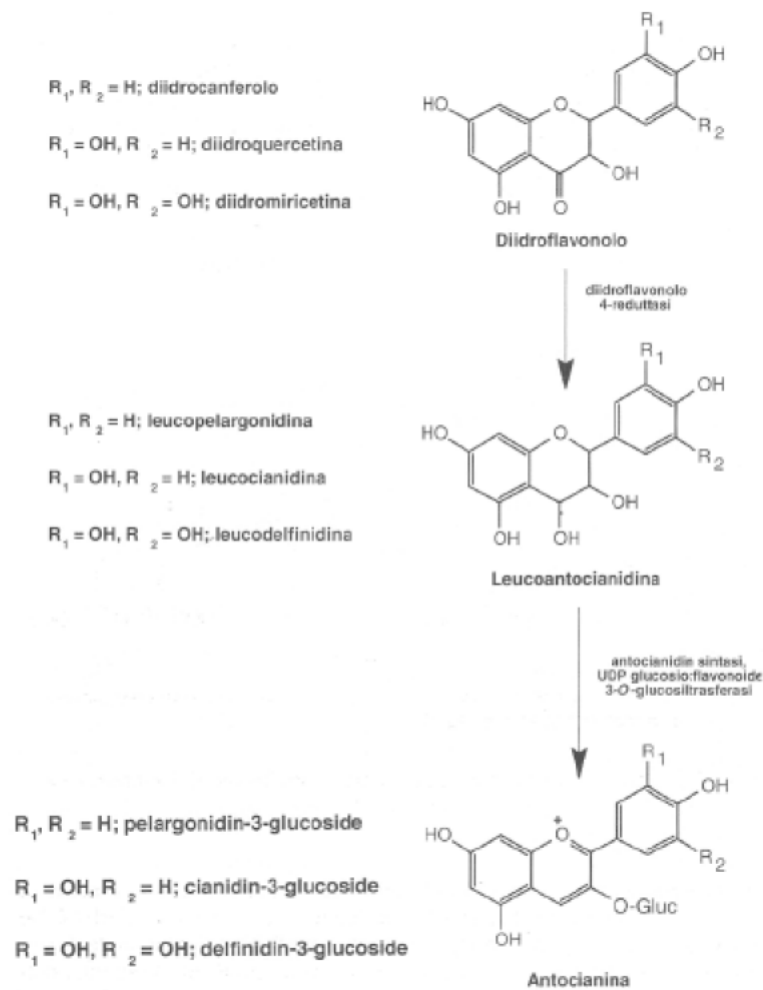


Figura 14. Sintesi delle antocianine

L'enzima flavonoide metiltrasferasi permette un'esterificazione e in seguito avvengono glucosilazioni e metilazioni delle strutture formate; si ottengono così ognuna delle 6 classi di flavonoidi.

1.9.4 Attività antiossidante dei composti fenolici

L'attività antiossidante dei polifenoli è dovuta all'elevato potenziale redox che permette loro di agire come agenti riducenti, ovvero donatori di idrogeno e quindi in grado di spegnere l'ossigeno singoletto tramite una reazione di trasferimento di energia. Questi possono agire anche come chelanti dei metalli e la loro attività antiossidante è considerata molto più elevata di quella delle vitamine (Wang et al., 1996). Ciò che rende i composti fenolici degli antiossidanti è la presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche (Figura 15). Una condizione fondamentale perché i composti fenolici svolgano un'attività antiossidante è la

formazione di radicali fenolici stabili, tramite la delocalizzazione elettronica sulle strutture aromatiche ed alifatiche.

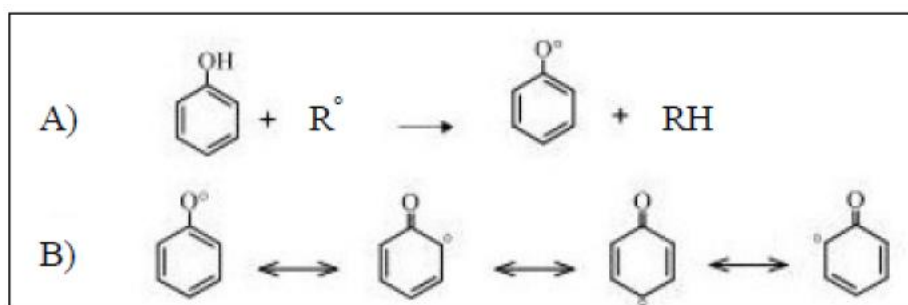


Figura 15. Reazione di un composto fenolico con un radicale libero (A); delocalizzazione dell'elettrone dell'ossigeno sull'anello aromatico contribuisce alla stabilizzazione della nuova specie radicalica formata (B).

L'attività antiossidante dei flavonoidi ed il loro metabolismo in vitro dipendono anche dalla posizione dei gruppi funzionali. La configurazione idrossilica dell'anello B è determinante per l'azione scavenger nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, poiché gli idrossili di questo anello cedono un idrogeno o un elettrone ai radicali idrossilici, perossilici e perossinitriti, stabilizzandoli e trasformandosi in un radicale flavonoide relativamente stabile.

Gli ossidrilici sull'anello A hanno un'attività antiossidante molto più leggera rispetto a quelli dell'anello B. Anche l'anello eterociclo contribuisce all'attività antiossidante con la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3, in quanto permette la coniugazione tra i due anelli aromatici A e B.

La capacità chelante dei flavonoidi e dei tannini contribuisce all'attività antiossidante, rimuovendo e neutralizzando gli ioni ferro negli epatociti. La chelazione dello ione bivalente non neutralizza necessariamente il flavonoide, che può mantenere la propria funzione di scavenger nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno. I composti fenolici, contrastano i radicali liberi ma svolgono anche molte attività biologiche come proteggere i capillari sanguigni, avere azione antiinfiammatoria, antibatterica, immunostimolante, antivirale, antiallergica, anticancerogena ed estrogenica. Inoltre è stato possibile dimostrare la loro azione inibente nei confronti di alcuni enzimi, quali la fosfolipasi, la ciclossigenasi, la glutatione reduttasi e la xantina ossidasi.

I polifenoli svolgono un'attività anticancerogena poiché sono in grado di inibire gli enzimi coinvolti nella carcinogenesi e nello sviluppo di tumori (Petty e Scully,

2009). Questi composti sono in grado di influenzare la fase iniziale dello sviluppo del cancro, svolgono un'azione protettiva contro l'attacco diretto da carcinogeni nei confronti delle cellule; in vitro è stato anche osservato che questi composti svolgono un'azione protettiva contro l'attacco diretto da carcinogeni nei confronti delle cellule o alterando il loro meccanismo di attivazione.

Alla base dell'attività antiossidante dei flavonoidi ci potrebbe essere anche l'attività antinfiammatoria e antiplastrinica, dovuta sia grazie alla struttura dei flavonoidi, sia alla loro capacità di penetrare la membrana lipidica della cellula.

Studi condotti da Harvsteen (2002), hanno dimostrato che i polifenoli hanno attività antivirali nei confronti dell'HIV, dell'Herpes simplex, di vari virus influenzali e del Rhinovirus (Petty e Scully, 2009).

Per quanto riguarda gli animali sono stati condotti degli studi nutrendo i ratti con polline per un mese per analizzare lo stato degli eritrociti nel sistema redox. È stato notato che il contenuto del glutatione, il contenuto totale dei gruppi SH come l'attività del glutatione perossidasi e glutatione reduttasi, sono aumentati in confronto con il gruppo dei controlli. Allo stesso tempo c'è stata una diminuzione della malonildialde e dei dieni coniugati negli eritrociti. L'attività della catalasi e della superossido dismutasi è aumentata ma l'effetto non è significativo dal punto di vista statistico. In conclusione è stato possibile affermare che il sistema antiossidativo non è attivato in modo specifico, ma i processi ossidativi negli eritrociti sono bloccati (Dudov et al., 1994).

Alla luce di vari studi condotti è facile notare che i benefici apportati dai polifenoli, dimostrati tramite esperimenti condotti su animali o in vitro, non sono generalmente confermati da studi condotti sull'uomo. Questa diversità di risultati potrebbe essere spiegata dal fatto che il meccanismo d'azione dei polifenoli *in vivo* potrebbe essere differente dal meccanismo *in vitro*. È necessario effettuare quindi ulteriori studi per confermare tali attività.

Numerosi studi rivelano che una dieta ricca di flavonoidi diminuisce il rischio di malattie cardiovascolari di circa il 65%, generalmente diminuisce il rischio di ictus cerebrale (Petty e Scully, 2009). Il meccanismo di azione è la riduzione della coagulazione delle piastrine e delle LDL; altri meccanismi sono l'inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine, l'azione "radical scavenger" e la modulazione

del metabolismo degli eicosanoidi. I flavonoidi hanno un alto effetto protettivo nei confronti delle LDL, molto più degli acidi fenolici, dovuto all'azione diretta dei polifenoli come scavenger di radicali, sia in grado di rigenerare la vitamina E nelle LDL, a partire da un radicale α -chromanossi (Zhou et al., 2000).

1.9.5 Biodisponibilità e metabolismo dei composti fenolici

Per biodisponibilità si intende che una porzione del nutriente ingerito sia digerito, assorbito e metabolizzato attraverso un normale pathway.

I composti fenolici hanno un'importante variabilità strutturale, ne sono infatti stati isolati oltre 6000 ed è un numero sempre in costante aumento. Questa diversità nella struttura influenza fortemente la biodisponibilità, l'attività biologica e le interazioni con i recettori cellulari ed enzimatici, determinando un impatto sulla salute umana profondamente diversificato (Scalbert et al., 2000).

Generalmente gli agliconi come la quercitina, sono idrofilici e vengono assorbiti dall'intestino tenue, diffondendo in modo passivo attraverso le membrane biologiche; comunque, gran parte dei polifenoli presenti in natura sono forme esterificate, glicosilate o polimerizzate. Le forme acilate sembrano passare in tal modo attraverso le membrane e sono quindi assorbite senza deconiugazione o idrolisi. Ciò non avviene per le antocianine, che raggiungerebbero il plasma non modificate, per i flavonoidi glicosidici che prima dell'assorbimento vengono idrolizzati da glicosidasi endogene presenti nel tratto gastro intestinale e/o prodotte dalla microflora del colon. Seguono numerose modificazioni enzimatiche: a livello intestinale sono coniugati dell'acido glucuronico mentre poi, nel fegato, possono essere metilati e/o sulfonati.

I tannini idrolizzabili come i gallotannini/ellagitannini possono essere idrolizzati anche se non è stato elucidato se questo avvenga grazie ad enzimi endogeni o per azione della microflora del colon.

La biodisponibilità ed il metabolismo dei tannini condensati (proantocianidine) non sono ancora chiari. Alcuni oligomeri come per esempio la procianidina B1 possono essere assorbiti dall'organismo in un modo molto simile a quello delle loro forme monomeriche. Studi evidenziano che la permeabilità cellulare dei tannini condensati sia funzione inversa del grado di polimerizzazione; dati

indicano che mentre dimeri, trimeri ed oligomeri verrebbero assorbiti più o meno facilmente, molecole più grandi (oltre 1000 Da) non riescono ad entrare nel sistema cardiocircolatorio tramite la barriera intestinale. Queste molecole sopravvivono tuttavia alla digestione gastrointestinale e vengono poi metabolizzate dalla microflora del colon; ciò è stato dimostrato incubando in vitro proantocianidine con la microflora presente nel colon umano (Deprez et al., 2000).

1.10 Gli amminoacidi

All'inizio del diciannovesimo secolo, quando gli scienziati rivolsero per la prima volta la loro attenzione alla nutrizione, in breve tempo scoprirono che i prodotti naturali contenenti azoto erano essenziali per la sopravvivenza degli animali. Il chimico olandese G.J. Mulder chiamò questa classe di composti **proteine** (dal greco protéios “primo”); i chimici che si occupavano di fisiologia non realizzarono che le proteine erano in realtà formate da costituenti più piccoli, gli amminoacidi. Per molti anni si continuò a pensare che le sostanze di origine vegetale, incluse le molecole proteiche, fossero incorporate intere nei tessuti animali. Quando venne dimostrato che le proteine ingerite vengono frammentate in composti molto più piccoli contenenti amminoacidi, gli scienziati si concentrarono sulle qualità nutrizionali di tali sostanze. I moderni studi sulle proteine e gli amminoacidi devono molto agli esperimenti durante il diciannovesimo secolo. Grazie a quegli studi oggi sappiamo che gli amminoacidi contenenti azoto sono essenziali per la vita e che sono le unità costitutive delle proteine.

1.10.1 Struttura e proprietà generali

Le analisi di un'ampia serie di molecole proteiche provenienti da quasi tutte le fonti disponibili hanno dimostrato che tutte le proteine sono composte da 20 amminoacidi standard, ma non tutte le proteine contengono tutti i 20 tipi di amminoacidi, anche se la maggioranza ne contiene molti, se non tutti.

Gli amminoacidi comuni sono noti come **α -amminoacidi**, poiché possiedono un gruppo amminico primario (-NH₂) in qualità di sostituente dell'atomo di carbonio in α , cioè quello adiacente al gruppo carbossilico acido (-COOH). L'unica

eccezione è rappresentata dalla prolina, che presenta un gruppo amminico secondario (-NH-), anche se per ragioni di uniformità verrà considerato un α -amminoacido. I 20 amminoacidi convenzionali differiscono per quanto concerne la struttura della catena laterale (gruppo R).

I gruppi amminici e carbossilici degli amminoacidi possono andare incontro a ionizzazione. I valori di pK dei gruppi carbossilici acidi sono raggruppati in un breve intervallo intorno a 2,2, mentre i valori di pK dei gruppi α -amminici (pK₂) sono prossimi a 9,4. A pH fisiologico (circa 7,4), i gruppi amminici sono protonati e quelli carbossilici acidi sono nella loro forma di base coniugata (carbossilato). Perciò un amminoacido si può comportare sia da acido che da base. Le molecole come gli amminoacidi che portano gruppi carichi di polarità opposta, si chiamano **zwitteroni** o ioni dipolari. Gli amminoacidi, al pari di altri composti ionici, mostrano una solubilità maggiore nei solventi polari rispetto a quelli non polari. Le proprietà ioniche delle catene laterali influenzano le caratteristiche chimiche e fisiche degli amminoacidi liberi e di quelli contenuti nelle proteine.

1.10.2 Il legame peptidico

Gli amminoacidi possono polimerizzare per dare origine a catene laterali; questo processo avviene tramite reazioni di condensazione (la formazione di un legame con l'eliminazione di una molecola d'acqua). Il risultante legame CO-NH è detto legame peptidico ed è un legame amidico.

I polimeri composti da più unità amminoacidiche sono chiamati polipeptidi, queste sostanze per comodità sono chiamate più semplicemente "peptidi". Dopo essere stati incorporati in un peptide, i singoli amminoacidi (le unità monomeriche) sono denominati **residui amminoacidici**.

I polipeptidi sono polimeri lineari e quindi non presentano rammificazioni. In questa struttura ogni residuo amminoacidico partecipa a due legami peptidici ed è unito ai residui ad esso adiacenti tramite un orientamento testa-coda. Ciascun residuo presente alle due estremità del polipeptide partecipa a un solo legame peptidico; il residuo con il gruppo α -amminoacidico libero è definito **ammino-terminale** o **N-terminale**, mentre quello con il gruppo α -carbossilico libero

(posto all'estremità destra) è chiamato **carbossi –terminale** o **C-terminale** (Figura 16).

Le proteine sono molecole contenenti una o più catene polipeptidiche e le variazioni nella lunghezza e nella sequenza amminoacidica dei polipeptidi contribuiscono alla diversità di forma e di funzione biologica delle molecole proteiche.

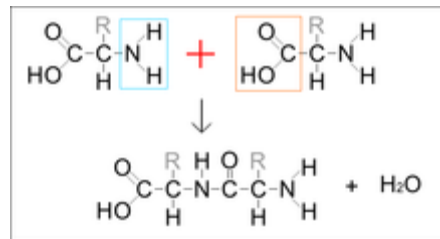


Figura 16: Legame peptidico tra le estremità N-terminale e C-terminale

1.10.3 Classificazione e caratteristiche degli amminoacidi

Per classificare i 20 amminoacidi standard nel modo più semplice, si utilizza la polarità delle loro catene laterali. In base a questa classificazione ci sono tre tipi principali di amminoacidi, che presentano:

1. gruppi R non polari
2. gruppi R polari non carichi
3. gruppi R polari carichi

Per quanto riguarda gli amminoacidi che hanno catene terminali non polari (1), gli amminoacidi classificati in questo gruppo sono nove (Figura 17). La **glicina** è l'amminoacido con la catena laterale più corta, in quanto costituita da un atomo di H, mentre l'**alanina**, la **valina**, la **leucina** e l'**isoleucina** presentano catene laterali composte

da idrocarburi alifatici di dimensioni che possono variare da un gruppo metilico nel caso dell'alanina, a gruppi butilici isomerici per quanto riguarda la leucina e l'isoleucina. La **metionina** possiede nella catena laterale un gruppo tioetere che ricorda un radicale n-butilico. La **prolina** ha una catena laterale pirrolidinica cilindrica, mentre la **fenilalanina** ha una porzione fenilica; il **triptofano** invece ha un gruppo indolico. Questi due ultimi amminoacidi hanno gruppi laterali aromatici caratteristici per il loro volume e la mancanza di polarità.

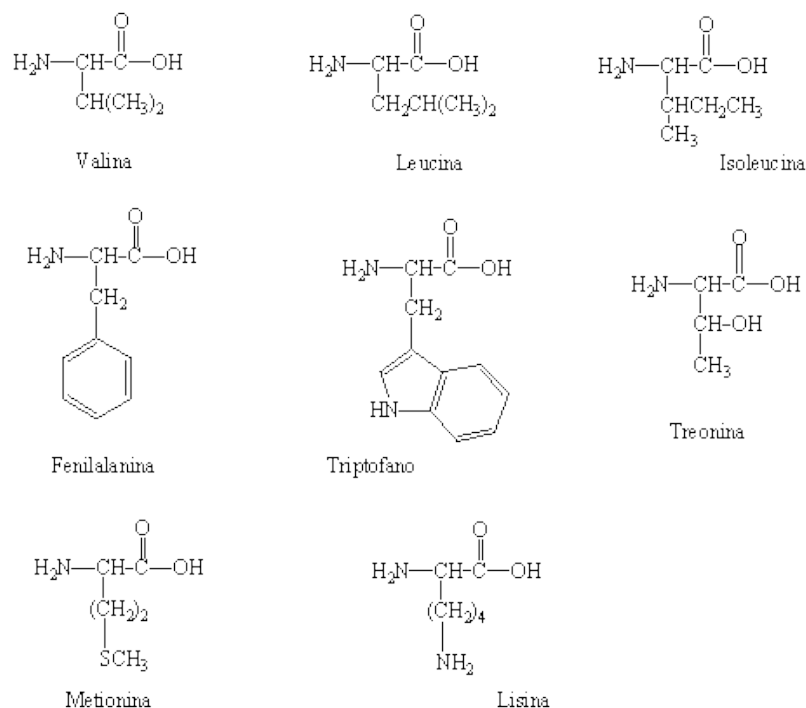


Figura 17: Strutture di alcuni amminoacidi con catene laterali non polari

Gli amminoacidi che presentano gruppi R non polari (gruppo 2) sono 6. La **serina** e la **treonina** hanno catene laterali di grandezza differente con gruppi ossidrilici (Figura 18); l'**asparagina** e la **glutammina** hanno catene laterali amidiche di varie dimensioni, la **tirosina** presenta un gruppo fenolico, mentre la **cistina** è l'unico tra 20 amminoacidi ad avere un gruppo tiolico capace di formare un legame (ponte) disolfuro con un'altra cisteina mediante ossidazione dei gruppi tiolici.

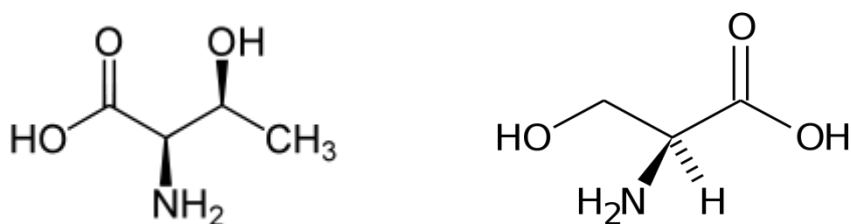


Figura 18: struttura della treonina(sinistra) e della serina (destra)

Infine ci sono i cinque amminoacidi che possiedono catene laterali cariche (gruppo 3). A valori fisiologici di pH le catene laterali degli amminoacidi basici sono cariche positivamente. La **lisina** presenta una catena laterale costituita da butilammina, mentre l'**arginina** ha un gruppo guanidinico. L'**istidina** contiene un

gruppo imidazolico. Solo l'istidina si ionizza a un pH vicino al pH fisiologico, di conseguenza nelle proteine questo residuo può essere sia nella forma neutra sia nella forma cationica. La protonazione-deprotonazione delle catene laterali dell'istidina è una caratteristica comune a molti meccanismi di reazioni enzimatiche.

Le catene laterali degli amminoacidi acidi, **acido aspartico** e **acido glutammico** sono cariche negativamente a un pH superiore a 3. Quando sono presenti come ioni, questi amminoacidi sono spesso chiamati aspartato e glutammato. L'asparagina e la glutammina sono, rispettivamente, le ammidi dell'acido aspartico e dell'acido glutammico. La suddivisione dei 20 amminoacidi nei tre diversi gruppi è arbitraria, infatti la glicina e l'alanina, i due amminoacidi più piccoli e il triptofano col suo anello eterociclico, potrebbero essere classificati come amminoacidi polari non carichi; allo stesso modo la tirosina e la cisteina, con le catene laterali ionizzabili, potrebbero essere considerati amminoacidi polari carichi, soprattutto a pH elevati. Infatti, la catena laterale deprotonata della cistina è presente in molti enzimi e partecipa in modo attivo al meccanismo di reazione.

L'inserimento di un particolare amminoacido in un gruppo o in un altro rispecchia non soltanto le proprietà dell'amminoacido isolato, ma anche il suo comportamento quando entra a far parte di un polipeptide. La struttura della maggior parte dei polipeptidi dipende da una tendenza delle catene laterali polari e ioniche all'idratazione e di quelle non polari ad associarsi l'una con l'altra piuttosto che con l'acqua; questa proprietà è dovuta all'effetto idrofobico. Le proprietà chimiche e fisiche delle catene laterali degli amminoacidi determinano anche la reattività chimica del polipeptide. Le diverse strutture degli amminoacidi standard permettono di capire in che modo cambiano le caratteristiche dei polipeptidi come la polarità, l'acidità, l'aromaticità, dimensioni, flessibilità conformazionale, possibilità di formare legami crociati o legami a idrogeno.

1.10.4 La prolina: caratteristiche e biosintesi

La prolina è un aminoacido apolare, è l'unico ad avere un gruppo amminico secondario, dato che il suo gruppo laterale si chiude sull'atomo di azoto formando una struttura ciclica (Figura 19).

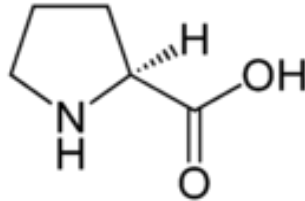


Figura 19: Struttura ciclica della prolina

Per questo motivo la prolina in realtà è un imminoacido e non un aminoacido. Negli esseri umani è un aminoacido non essenziale, cioè l'organismo umano è in grado di sintetizzarlo.

Nelle proteine, data la sua struttura unica, impedisce alla catena polipeptidica di formare delle eliche α e funge da punto di svolta nei foglietti β . Riesce a formare un legame peptidico con un altro aminoacido e quindi la prolina forma un'ammide terziaria, non ha quindi atomi di idrogeno per formare legami a idrogeno con le restanti parti del polipeptide. Più proline in sequenza si conformano a loro volta in una tipica struttura ad elica.

La prolina è un aminoacido proteinogenico che ha una particolare conformazione rigida ed è essenziale per il metabolismo primario. Molti studi confermano che il contenuto di prolina nelle piante superiori aumenta quando ci sono maggiori stress ambientali. L'accumulo di prolina si è verificato in situazioni come la siccità, alto contenuto salino, molta luce e quindi presenza di radiazioni UV, presenza di metalli pesanti, stress ossidativo e in risposta a stress biotici (Haudecoeur et al., 2009). È stata a lungo dimostrata una funzione osmoprotettiva della prolina, scoperta prima nei batteri, dove esiste una relazione casuale tra l'accumulo di prolina e la tolleranza del sale (Csonka et al., 1988). Questi dati possono suggerire che l'accumulo di prolina nelle piante stressate abbia una funzione protettiva.

Tuttavia, numerosi studi effettuati, utilizzando piante transgeniche o mutanti, hanno dimostrato che il metabolismo della prolina ha un effetto complesso sullo

sviluppo, sostanzialmente sulle risposte allo stress e che l'accumulo di prolina è importante per la tolleranza a particolari condizioni ambientali.

Nelle piante, la prolina è sintetizzata dal glutammato, che è ridotto grazie all'enzima glutammato-semialdeide (GSA) tramite l'enzima pirrolina-5-carbossilato sintetasi (P5CS) e spontaneamente convertito in pirrolina-5-carbossilato (P5C) (Figura 20). Inoltre la P5C reductasi (P5CR) riduce l'intermedio P5C in prolina (Szoke, A. et al., 1992). In molte specie di piante, l'enzima P5CS è codificato da due geni e la P5CR è codificata da uno. Il catabolismo della prolina si verifica nei mitocondri tramite una sequenza di azioni della prolina deidrogenasi e prolina ossidasi (PDH o POX) producendo P5C dalla prolina e P5C deidrogenasi (P5CDH), che converte P5C in glutammato. PDH è codificato da due geni, identificato in *Arabidopsis* come singolo gene P5CDH e in *Nicotiana tabacum* (tabacco) (Kiyosue, T. et al., 1996).

Come via alternativa, la prolina può essere sintetizzata dall'ornitina, che è transamminata prima dall'enzima ornitina-delta-aminotrasferasi (OAT) producendo GSA e P5C che viene poi convertito in prolina (Delauney, A.J. et al., 1993). I livelli intracellulari di prolina sono determinati dalla biosintesi, catabolismo e trasporto tra le cellule e differenti compartimenti cellulari.

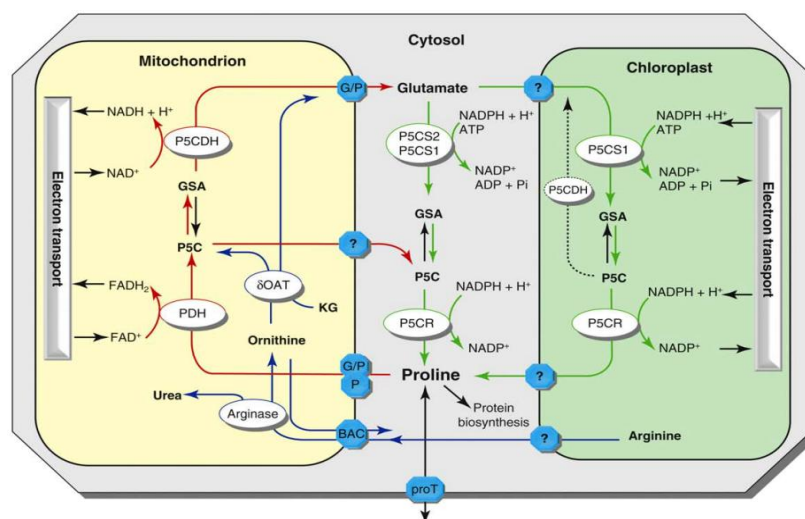


Figura 20: Modello del metabolismo della prolina. La via biosintetica è quella indicata con la linea verde, la via catabolica con la linea rossa, mentre quella della ornitina in blu.

2. SCOPO DELLA TESI

Le caratteristiche alimentari e funzionali del polline fresco raccolto direttamente dagli alveari sono ben note. Il polline infatti presenta un alto contenuto di amminoacidi, sostanze antiossidanti come polifenoli, vitamine, enzimi (amilasi, catalasi), minerali, lipidi e sostanze antibiotiche attive contro ceppi di stafilococchi e contro alcune salmonelle. Tutte queste caratteristiche rendono il polline fresco un potenziale integratore alimentare.

Non sono altrettanto noti gli effetti sul suo valore nutrizionale e nutraceutico dei trattamenti tecnologici di condizionamento, finalizzati a ridurre il contenuto idrico per permettere di prolungare la *shelf-life*, garantire un apporto nutrizionale e nutraceutico e una sicurezza per l'alimentazione umana.

Negli ultimi anni, si assiste, da parte di alcune aziende apistiche ad un crescente interesse per la messa a punto di metodiche di condizionamento in grado di minimizzare le perdite di valore biologico del prodotto commercializzato.

Attualmente, il polline presente in commercio, viene raccolto giornalmente, in genere essiccato a temperatura moderata (essicatoi ad aria calda), cernito e confezionato in recipienti ermetici, eventualmente sottovuoto. La conservazione rappresenta il principale punto critico di controllo del processo: il possibile assorbimento di umidità dall'ambiente può portare a un ammuffimento, nonché all'attacco di parassiti.

Dato che pochi dati sono riportati in letteratura in riferimento al valore biologico del polline sottoposto a diversi trattamenti tecnologici di *drying*, lo scopo di questa tesi è quello di caratterizzare lo stato di conservazione di polline di salice e di castagno sottoposto appunto a tecniche di conservazione quali la liofilizzazione e il trattamento a microonde.

Per quanto riguarda il valore nutrizionale di questi pollini dopo i trattamenti, è stato valutato il contenuto in rutina, fenoli e flavonoidi, relativamente alle sostanze antiossidanti. Per quanto riguarda il contenuto proteico è stata valutata la quantità di amminoacidi liberi e il rapporto prolina e amminoacidi liberi.

Questi sono parametri indicativi di corretta gestione dei processi di *drying*, quindi indici di elevato valore biologico del prodotto finale.

3.MATERIALI E METODI

Il materiale oggetto di studio è stato polline raccolto dalle api proveniente dal salice e dal castagno.

3.1 Campioni analizzati

Polline di castagno 2014 liofilizzato

Il primo polline analizzato è di castagno e proviene dall'azienda Metalori.

Il polo tecnologico Magona ha campionato il polline il giorno 20/3/2015 e lo ha mantenuto in freezer a -20°C fino al momento della liofilizzazione. Il polline in precedenza non era stato trattato termicamente né ripulito dalle impurità.

Per effettuare la liofilizzazione, i palloni di liofilizzazione sono stati mantenuti in freezer prima del processo e montati alla temperatura di -20°C. Una volta raggiunta la temperatura di -115°C all'interno della camera di raccolta del liofilizzatore sono stati montati i palloni sulla struttura per effettuare l'operazione di liofilizzazione.

È stato pesato il campione all'inizio e alla fine del trattamento, ed è stata utilizzata una bilancia termogravimetrica.

Sono stati prodotti quattro campioni al variare dei tempi di liofilizzazione e del peso del campione caricato. I quattro campioni sono stati sottoposti a 9, 7 e 4,5 ore di trattamento.

In tabella 2 sono riportati i dati raccolti in fase di esecuzione del test e le analisi del TGA effettuate sui campioni al termine della prova.

| ID | Metodo | Durata (h:min) | Quantità polline umido (g) | Perdite in peso durante la liofilizzazione | Umidità residua (TGA 120°) | Perdite in peso durante la liof (calcolato da TGA) |
|----|-----------------|----------------|----------------------------|--|----------------------------|--|
| | inizio | 0 | | | 25,50% | |
| 1 | Liofilizzazione | 9:00 | 87,05 | 21,56% | 7,05% | 18,45% |
| 2 | Liofilizzazione | 7:00 | 83,45 | 20,04% | 8,93% | 16,57% |
| 3 | Liofilizzazione | 4:30 | 47,93 | 18,28% | 10,38% | 15,12% |
| 4 | Liofilizzazione | 4:30 | 82,95 | 18,20% | 12,56% | 12,94% |

Tabella 2: Caratteristiche del metodo di trattamento per ottenere campioni con la minore umidità residua.

Dopo avvenuta liofilizzazione i campioni sono stati chiusi con rubinetto, messi sotto vuoto e riempiti con azoto. I palloni sono stati mantenuti in frigo a 4°C fino al giorno 17/04/ 2015, quando sono stati campionati per analisi TGA e trasferiti in barattoli in aria.

Qualche giorno dopo i campioni sono stati consegnati al Dipartimento di Scienze Agrarie, alimentari e agro ambientali, analizzati e conservati in frigorifero a 4°C. Su questi campioni, sia sul controllo non trattato che sui liofilizzati, è stato analizzato il contenuto di prolina libera, totale (dopo idrolisi completa delle proteine) e di amminoacidi liberi e totali (dopo idrolisi completa delle proteine). Questi valori sono stati espressi sia sulla sostanza secca effettuata con TGA che su base di sostanza fresca o liofilizzata con residuo d'acqua. È stata valutata anche la variazione del contenuto di rutina al variare del tempo del trattamento di liofilizzazione effettuato. Queste prove sono state prove preliminari per individuare il trattamento più efficace nel preservare le proprietà qualitative del polline.

Polline di castagno 2014 trattato al microonde

Il polo tecnologico Magona ha compiuto alcune prove preliminari di messa a punto del trattamento sul campione di polline di castagno del 20/3/2015 per valutare parametri di potenza e tempo che permettessero di eliminare l'acqua all'interno del campione attraverso le microonde, senza comportare un aumento della temperatura eccessivo e tempi troppo lunghi.

A partire da queste considerazioni è stato studiato un sistema di trattamento che prevede, anziché l'uso di un flusso di aria ad alta portata un sistema di vuoto non troppo spinto (circa 50 mbar) che permetta di eliminare l'acqua senza bisogno di raggiungere temperature eccessivamente alte sul campione

Il polline prima di essere trattato era posto in congelatore a -20°C.

I campioni prodotti sono stati denominati in base al tipo di trattamento (MW), l'indicazione della potenza utilizzata (150-200W) e del tipo di reattore sotto vuoto (v), infine è stato indicato il tempo di esposizione (10, 20, 30 min) (Tabella 3).

| ID campione | Trattamento | Tempo | Riduzione di peso % | Acqua residua da TGA (120°C) | Sostanza secca |
|-------------|-------------|-------|---------------------|------------------------------|----------------|
| 1 | MW 100 | 5 min | 11,43 | 19,04% | 80,96 % |
| 2 | MW 200 | 5 min | 11,83 | 18,99% | 81,01 % |
| 3 | MW 300 | 5 min | 11,08 | 17,45 % | 82,55 % |
| 4 | MW 500 | 5 min | 10,48 | 16,70 % | 83,3 % |
| 5 | MW 700 | 5 min | 10,89 | 15,85% | 84,15% |

Tabella 3: riportati i nomi dei campioni, il tipo di trattamento, la riduzione in peso dopo trattamento, la sostanza secca e l'acqua residua rimasta

Polline di salice 2015

I campioni di polline di salice provengono anche questi dall'azienda Metalori.

Il controllo è costituito da salice fresco tal quale che non ha subito trattamenti mantenuto in congelatore alla temperatura di -20°C (campione 1).

È stato analizzato un campione fresco commerciale avente un'umidità residua del 16,8 % e quindi sostanza secca dell'83,2 % (campione 2).

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove di liofilizzazione preliminari del castagno è stato scelto di trattare il salice mediante liofilizzazione per 9 ore (campione 3). Il campione 4 è stato anche questo liofilizzato per 9 ore, ma le analisi sono state effettuate dopo 1 mese di conservazione, condizionato a temperatura di circa 20-23 °C, al fine di valutare la shelf life del polline

Questo salice ha subito anche un trattamento al microonde alla potenza di 220 W per un tempo di 20 minuti (campione 5). Infine è stato analizzato salice secco, a partire dal campione fresco è stato utilizzato calore alla temperatura di 40-45°C per 60 minuti, al fine di ottenere un'umidità finale di 5,69 % circa (Tabella 4).

| ID | Nome | % sostanza secca | Umidità residua (TGA 120°) |
|----|--------------------|------------------|----------------------------|
| 1 | Controllo | 77,08% | 22,92% |
| 2 | Fresco commerciale | 83,02 % | 16,8% |
| 3 | Liofilizzato t0 | 93,75% | 6,25% |
| 4 | Liofilizzato t1 | 93,75% | 6,25% |
| 5 | Mw 220 W | 92,23 % | 7,77% |
| 6 | Secco | 94,31% | 5,69% % |

Tabella 4: sono riportati i valori di umidità residua, perdita in peso durante la liofilizzazione (anche mediante tga) del salice di controllo, fresco commerciale, liofilizzato t0 e t1, mw e secco.

3.2 Estrazione dei composti fenolici totali

Per effettuare l'estrazione sono stati pesati 0,25 g di campione e sono stati trasferiti in un mortaio, in seguito sono stati addizionati 5 ml di una soluzione di metanolo 80% (v/v). I campioni sono stati pestati fino a che non sono diventati una miscela omogenea. Questi sono stati trasferiti in provette Falcon e posti nel sonicatore per 30 minuti. Passato questo tempo alle provette è stato aggiunto un magnete e sono state poste in un contenitore contenente acqua e ghiaccio; sono state posizionate su un agitatore per 30 minuti.

In seguito il campione sono stati messi a centrifugare (6000 rpm). Avvenuto questo passaggio il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta Falcon e

posto in frigorifero. Al pellet rimasto sono stati aggiunti 5 ml di metanolo 80% (v/v), le provette sono state posizionate sul vortex per qualche secondo e sono state posizionate nuovamente in un contenitore contenente acqua e ghiaccio per 15 minuti. Dopo le provette sono state messe in centrifuga questa volta per 15 minuti. Recuperato il surnatante, a questo è stato aggiunto di nuovo 5 ml di metanolo 80% (v/v), le provette poste ad agitare con ghiaccio per 15 minuti e infine a centrifugare per 15 minuti. Tutto il surnatante è stato trasferito nella Falcon iniziale ed è stato misurato il volume finale raggiunto.

Il surnatante è stato filtrato con filtri da 0,45 µm al fine di effettuare il dosaggio dei fenoli, flavonoidi e iniettare una piccola quantità in HPLC.

3.3 Dosaggio dei fenoli totali

Al fine di misurare quantitativamente i composti fenolici presenti all'interno dell'estratto è stato utilizzato il metodo di Folin-Ciocalteu, adattato ai campioni in esame, secondo la procedura utilizzata da Barbolan et al., 2003.

È stato utilizzato il reattivo Folin-Ciocalteu che ha una colorazione gialla e contiene al suo interno acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMO_{12}O_{40}$); questo è in grado di ossidare i fenoli e riuscire a provocare una variazione colorimetrica quantificabile spettrofotometricamente.

Visto che i composti fenolici sono agenti antiossidanti si verifica una riduzione dell'acido fosfotungstico e dell'acido fosfomolibdico rispettivamente ad ossidi di tungsteno (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}), questo comporta un viraggio dal colore giallo del composto di partenza al colore azzurro del prodotto finale, che viene letto alla lunghezza d'onda di 750 nm.

In una cuvetta VIS sono stati aggiunti:

- 25 µl di campione;
- 1,25 ml di acqua MilliQ;
- 125 µl di reagente Folin-Ciocalteu.

Questa miscela è stata incubata per 8 minuti, per far sì che si realizzasse l'ossidazione. In seguito sono stati aggiunti:

- 600 µl di acqua MilliQ
- 500 µl di una soluzione di sodio carbonato (Na_2CO_3) al 20%.

Dopo 30 minuti di incubazione è stata misurata l'assorbanza della miscela a 750 nm contro un bianco preparato utilizzando 25 µl di metanolo all'80% in sostituzione al posto del campione. Per ogni campione sono state effettuate tre repliche.

Il contenuto in fenoli totali è espresso come µg equivalenti di acido gallico su g di peso secco, tramite una retta di taratura ottenuta utilizzando lo standard di acido gallico a concentrazione nota.

Per costruire la retta di taratura è stata preparata una soluzione madre di acido gallico a concentrazione nota.

Per costruire la retta di taratura è stata preparata una soluzione madre di acido gallico alla concentrazione di 1000 ppm: sono stati pesati 0,010 g di acido gallico puro e sono stati disciolti in 10 ml di metanolo all'80%. Da questa soluzione sono state preparate altre diluizioni seriali dalla concentrazione di 500 ppm fino alla diluizione a 31,25 ppm di acido gallico. Sono state effettuate tre repliche per ogni diluizione.

La concentrazione dei fenoli presenti nei campioni è stata calcolata in base alla retta di taratura $y=0,0012x$, con R^2 pari a 0,9984 (Figura 21).

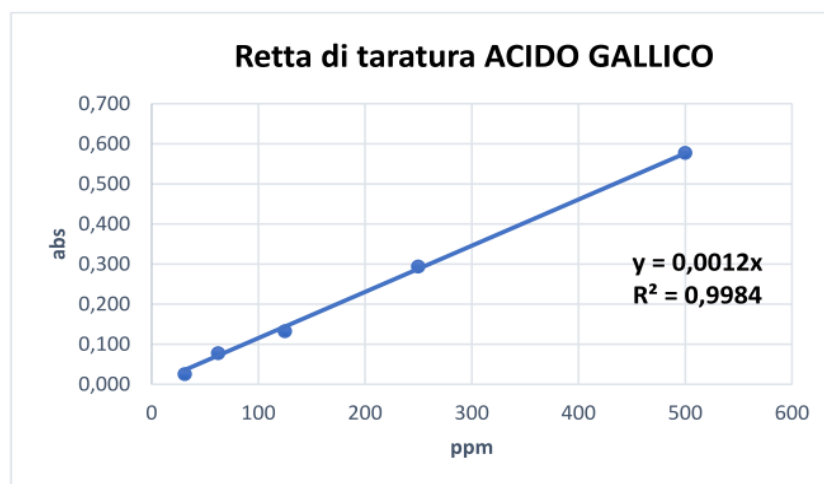


Figura 21: Retta di taratura dello standard (acido gallico) per determinare i fenoli totali.

3.4 Dosaggio dei flavonoidi

La quantificazione dei flavonoidi totali è avvenuta col metodo di Kim et al., 2003.

In una cuvetta VIS sono stati aggiunti:

- 100 µl di campione
- 60 µl di NaNO₂ al 5% (p/v).

La miscela è stata incubata per 5 minuti. Successivamente, sono stati aggiunti:

- 40 µl di AlCl₃ al 10% (p/v).

La miscela ottenuta è stata nuovamente incubata per 5 minuti.

Sono stati, in seguito, aggiunti:

- 400 µl di NaOH 1M;
- 200 µl di acqua MilliQ.

Il contenuto dei flavonoidi è stato misurato mediante lettura dell'assorbanza a 510 nm contro un bianco preparato utilizzando 100 µl di metanolo all'80% al posto del campione. Per ogni campione sono state effettuate tre repliche.

Il contenuto di flavonoidi totali è espresso come µg equivalenti di catechina g di peso secco, attraverso una retta di taratura ottenuta utilizzando lo standard di catechina a concentrazione nota.

Per costruire la retta di taratura è stata preparata una soluzione madre di catechina alla concentrazione di 1000 ppm: sono stati pesati 0,010 g di catechina e sono stati disciolti in 10 ml di metanolo all'80%. A partire da tale soluzione sono state preparate delle diluizioni seriali dalla concentrazione di 250 ppm fino alla diluizione a 15,64 ppm di catechina. Sono state effettuate tre repliche per ogni diluizione.

La concentrazione dei flavonoidi presenti nei campioni è stata calcolata in base alla retta di taratura $y = 0,0051x$ con R^2 pari a 0,997 (Figura 22).

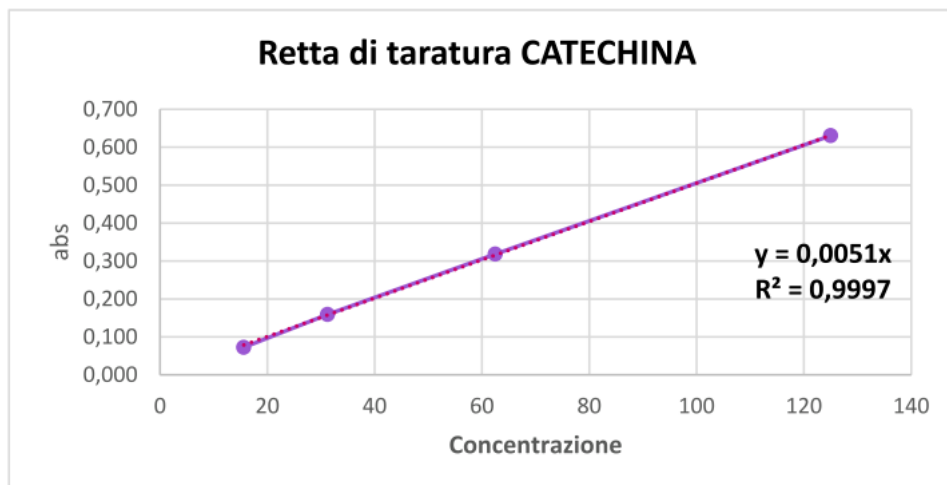


Figura 22: Retta di taratura dello standard (catechina) per la determinazione dei flavonoidi.

3.5 Dosaggio del contenuto di rutina mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Dopo avvenuta estrazione dei composti fenolici, (paragrafo 4.2) è stato preso un volume arbitrario dell'estratto, filtrato mediante filtri da 0,45 µm ed iniettato in HPLC (Spectra SYSTEM P4000). Le estrazioni sono state effettuate in doppio.

La separazione dei composti fenoli è stata condotta ad un flusso di 0,5 ml/min utilizzando due fasi mobili: acido formico al 5% (HCOOH) in acqua (fase A) e acido formico al 5% (HCOOH) in metanolo (CH₃OH) (fase B) secondo il gradiente riportato in tabella 5.

Le quantificazioni della rutina sono state effettuate mediante rette di taratura con standard commerciali a concentrazione nota. I dati sono stati elaborati tramite il software ChromQuest.

| Tempo (min) | Fase A | Fase B |
|-------------|--------|--------|
| 0 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 20 | 70 | 30 |
| 28 | 10 | 90 |
| 35 | 90 | 10 |

Tabella 5: Gradiente delle fasi mobili.

3.6 Estrazione aminoacidi liberi

Il metodo per estrarre gli aminoacidi liberi è stato riadattato a quello degli autori González Paramás et al., (2006).

Per effettuare l'estrazione degli aminoacidi liberi sono stati pesati 0,1 g di polline fresco per ogni campione. Sono stati trasferiti in un mortaio a cui sono stati aggiunti 5 ml di etanolo all'80%, sono stati pestati e la miscela trasferita in provette grandi di plastica da centrifuga.

Le provette sono state poste nel sonicatore per 5 minuti e dopo a centrifugare (11000 rpm) per 15 minuti. È stato prelevato il surnatante e trasferito in un pallone da 50 ml. Al pellet rimasto nel fondo della provetta è stato aggiunto 5 ml di etanolo, anche queste poste a sonicare per 5' e dopo a centrifugare (11000 rpm) per 15 minuti; è stato recuperato il surnatante e aggiunto a quello estratto in precedenza. Il volume di surnatante totale è stato portato a secco tramite rotavapor alla temperatura del bagnetto di 35°C per circa 5'.

Quando tutto l'estratto è stato portato a secco, al momento della determinazione è stato risospeso in 1,5 ml di H₂O. L'estrazione è stata effettuata in doppio.

3.7 Estrazione aminoacidi totali

Il metodo per estrarre gli aminoacidi liberi è stato riadattato a quello degli autori González Paramás et al., (2006).

Sono stati pesati 0,1 g di polline. Questi sono stati trasferiti nelle pyrex e sono stati aggiunti 5 ml di HCl 6N, in seguito posti 24 ore in stufa a 110°C.

Le pyrex sono poi lasciate a raffreddare e il contenuto viene filtrato con filtri da 0,45 µm per aminoacidi. Il contenuto trasferito in falcon.

Dal filtrato totale si prendono 500 µl di campione, si portano a secco con rotavapor alla temperatura del bagnetto di 55°C, l'operazione richiede circa 5 minuti.

Al momento della determinazione è necessario risospendere con 1 ml di H₂O il filtrato secco.

3.8 Determinazione della prolina (Magnè)

Per determinare il contenuto di prolina è stato utilizzato il metodo di Magnè et al., 1992. Viene preparata una soluzione costituita da ninidrina 1% in acido acetico al 60%. In tubi di vetro lunghi viene pipettato un volume totale di 500 µl, costituito

nel nostro caso da 40 μl di estratto di prolina totale oppure libera (a seconda della determinazione) più 460 μl di H_2O milliQ.

In seguito sono aggiunti 2 ml di soluzione costituita da ninidrina, si agitano i tubi con il vortex e si mettono a bollire a 100°C per 1 h in un bagno ad acqua maria bollente.

In seguito i tubi sono lasciati a raffreddare e si aggiungono 5 ml di toluene, si tengono sul vortex per 15 secondi e si lascia separare il surnatante dal toluene. In seguito si preleva il surnatante con una Pasteur andandolo a trasferire in provette di plastica.

Il surnatante viene trasferito in cuvette uv-vis e fatta la lettura mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 520 nm.

3.9 Determinazione degli aminoacidi

Anche per determinare il contenuto di prolina è stato utilizzato il metodo di Magnè et al., 1992.

Si prepara una soluzione 1 costituita da 4,2016g di acido citrico e 40 ml di NaOH 1 N (per prepararli si mettono in un becher sull'agitatore a temperatura di 150°C) e si aggiunge poi 0,16 g di SnCl_2 , il tutto va portato a volume in un matraccio da 100 ml con di H_2O milliQ.

In seguito si prepara una soluzione 2 costituita da 1 g di ninidrina più 25 ml di etilen-glicol, anche in questo caso si utilizza un becher e si fa sciogliere a temperatura $150\text{-}200^\circ\text{C}$ posizionandolo sull'agitatore col magnete.

In seguito si prepara una soluzione 3 costituita da isopropanolo:acqua 1:1.

Al momento della determinazione si preparano tubi di vetro lunghi, al cui interno si pipetta il campione più H_2O per avere un volume finale di 100 μl . Nella nostra determinazione è stato pipettato un volume di 40 μl più 60 μl di H_2O .

Ai tubi si aggiungono 1 ml di soluzione 1, in seguito 1ml di soluzione 2, si agita bene mediante vortex e si posizionano i tubi di vetro coperti da biglie in un bagno ad acqua maria bollente a 100°C per 20 minuti. Si fanno raffreddare, si aggiungono 5 ml di isopropanolo:acqua 1:1 e si aspetta 15 minuti.

Si trasferisce la soluzione dai tubi di vetro alle cuvette UV-Vis e si fa la lettura allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 570 nm. È importante fare la lettura entro 1 ora dalla preparazione del campione.

3.10 Analisi statistica

Le differenze tra i diversi campioni di polline di castagno e di salice fresco e trattati sono state determinate mediante analisi statistica della varianza (ANOVA) a una via.

Le differenze statistiche sono state determinate tramite il Turkey-Kramer Multiple-Comparison Test, al livello di significatività dei dati $P < 0,05$, utilizzando il software NCSS.

4. RISULTATI

4.1 Contenuto di prolina libera totale, aminoacidi liberi e totali e loro rapporti.

Polline di castagno 2014 liofilizzato

Queste analisi sono state effettuate per individuare quale fosse il trattamento di liofilizzazione in grado di permettere una minore riduzione del valore biologico del polline. È stato quindi necessario individuare i tempi e le temperature da applicare al fine di ottenere il miglior risultato. Per questi campioni non è stata effettuata un'analisi statistica poiché sono state prove preliminari.

Le analisi sono state effettuate sia sulla sostanza fresca che secca, ma è interessante considerare i valori della sostanza secca.

Per quanto riguarda la sostanza secca in tabella 6 sono riportati i risultati.

| ID | Trattamento | Prolina libera (mg/g ss) | Prolina totale (mg/g ss) | Prolina libera/ totale (%) |
|----------|-------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| C | Fresco | 16,31 | 44,58 | 37,2 |
| L9 | LIOF 9 h | 26,16 | 51,00 | 51,3 |
| L7 | LIOF 7 h | 27,55 | 47,42 | 58,1 |
| L4,5 | LIOF 4h 30 | 25,75 | 40,28 | 63,9 |
| L4,5-bis | LIOF 4h 30 | 22,44 | 36,74 | 61,1 |

Tabella 6: Quantità di prolina libera e totale e rapporto tra prolina libera e totale dei campioni di castagno liofilizzati. Il campione L4,5 aveva un peso iniziale prima del trattamento di 47,93g mentre il campione L4,5 bis di 82,85 g.

La prolina è l'aminoacido predominante nei pollini che hanno subito idonei processi di *drying* ed è quindi un indicatore di freschezza del polline (Serra Bonvehì et al., 1986).

È possibile notare che la prolina totale, nel campione L9 ha una quantità più alta di tutti ovvero 51 mg/g su sostanza secca. La prolina libera risulta invece leggermente più alta nel campione L7 liofilizzato per 7 ore, raggiungendo una quantità di 27,55 mg/g su sostanza secca; questo valore non si discosta comunque molto dal campione L9 che ha un contenuto di prolina libera di 26,16 mg/g di sostanza secca.

Il rapporto prolina libera su prolina totale è molto alto nei campioni L4,5 ed L4,5 bis, risulta invece molto più basso nel controllo.

Contenuto di aminoacidi liberi e totali

Per quanto riguarda il contenuto in aminoacidi liberi, si nota che il campione L7 ha il valore più elevato di tutti, valore che comunque rimane molto vicino al campione L9; mentre i campioni L4,5 ed L4,5-bis che hanno subito lo stesso trattamento hanno valori simili tra loro.

Per quanto riguarda il contenuto in aminoacidi totali, anche in questo caso il campione L7 raggiunge il valore più alto, i campioni L4,5 ed L4,5 bis hanno in questo caso valori più lontani rispetto al rapporto tra gli aminoacidi liberi (Tabella 7).

| ID | Trattamento | AA liberi (mg/g ss) | AA totali (mg/g ss) | AA liberi/ AA totali (%) |
|--------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| C | Fresco | 24,67 | 145,87 | 8,41 |
| L9 | LIOF 9 h | 41,50 | 299,23 | 13,9 |
| L7 | LIOF 7 h | 43,22 | 317,12 | 13,6 |
| L4,5 | LIOF 4h 30 | 36,62 | 294,14 | 12,4 |
| L4,5- bis | LIOF 4h 30 | 34,48 | 255,80 | 13,5 |

Tabella 7: Quantità di aminoacidi liberi e totali e rapporto tra aminoacidi liberi e totali per i campioni di polline di castagno fresco, liofilizzato 9,7,4 e 4,5 ore

Gli aminoacidi liberi sui totali sono quasi uguali per i campioni, mentre per il campione L4,5 questo valore resta leggermente più basso.

Rapporto tra prolina e aminoacidi liberi

Il rapporto tra prolina e aminoacidi liberi è un indicatore di freschezza del polline, anche questo parametro indica che è stato effettuato un corretto processo di *drying* e quindi il prodotto trattato ha un elevato valore biologico (Tabella 8). Il rapporto più basso è mantenuto dal campione L9, seguito dall' L7 e dall' L4,5bis. Il campione L4,5 ha un valore molto superiore rispetto agli altri.

| ID | Trattamento | Prolina/aa liberi (mg/g ss) |
|-----------|-------------|-----------------------------|
| C | Fresco | 0,66 % |
| L9 | LIOF 9 h | 0,63 % |
| L7 | LIOF 7 h | 0,64 % |
| L 4,5 | LIOF 4h30 | 0,70 % |
| L 4,5-bis | LIOF 4h30 | 0,65 % |

Tabella 8: Rapporto tra prolina e aminoacidi liberi per i campioni di polline fresco, liofilizzato 9,7,4 e 4,5 ore.

Dopo un'attenta valutazione del contenuto di prolina, aminoacidi liberi e rapporto tra prolina e aminoacidi liberi, è stato scelto come migliore il trattamento a 9 ore, perché in grado di preservare meglio le caratteristiche qualitative e nutrizionali del polline; questo trattamento di liofilizzazione è stato applicato anche sul campione di salice.

Polline di salice 2015 controllo, fresco commerciale, trattato al microonde, liofilizzato e secco

Contenuto di prolina libera e totale

Per quanto riguarda il polline di salice sono stati confrontati tra loro i campioni quali il controllo (C), il fresco commerciale (Ccom), il trattato microonde a 220 W (Mw) , il secco (S) e il liofilizzato (L0). In tabella 9 sono stati riportati i valori della prolina libera, totale e il rapporto tra libera e totale.

| ID | Trattamento | Prolina libera (mg/g ss) | Prolina totale (mg/g ss) | Prolina libera/ totale (%) |
|------|-----------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| C | Fresco | 10,30 c | 27,76 c | 37,055% |
| Ccom | Commerciale | 12,296 b | 29,543 b | 41,62% |
| Mw | Mw 220 W | 7,58 c | 26,80 c | 28,30% |
| S | Secco | 17,58 a | 73,09 a | 14,00% |
| L0 | Liofilizzato t0 | 10,421 c | 23,53 c | 23,53 % |

Tabella 9: Contenuto di prolina libera, totale e loro rapporto per polline di salice fresco, commerciale, trattato microonde, secco e liofilizzato. Il valore è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori significativamente uguali in seguito ad ANOVA a una via (P<0,05).

Dalle analisi effettuate si nota che il contenuto di prolina libera è più alto nel polline secco, valore molto più alto rispetto al controllo. Il valore leggermente inferiore lo troviamo nel polline fresco commerciale sottoposto ad essiccamento alla temperatura di 40-45°C per 60 minuti. Questi due valori sono significativamente diversi rispetto al campione di controllo. Per quanto riguarda il campione trattato al microonde (Mw) e quello liofilizzato (L0) la quantità di prolina libera è più bassa rispetto agli altri due trattamenti sopra citati; i campioni Mw e L0 sono significativamente uguali al campione fresco (C).

Quindi i campioni di polline secco e commerciale hanno subito un processo di *drying* abbastanza forte poichè si verifica un aumento del contenuto di prolina, in particolare nel campione secco.

Per quanto riguarda la prolina totale, anche in questo caso, il valore più alto è stato riscontrato nel campione secco, che non è significativamente uguale al controllo ma neanche al campione commerciale. Il contenuto di prolina totale nei campioni Mw e L0 ha valori sempre molto bassi, significativamente uguali al controllo.

Contenuto di aminoacidi liberi e totali

Anche per questi parametri è stato analizzato il campione di salice fresco, fresco commerciale, trattato al microonde, essiccato e liofilizzato. (Tabella 10).

| ID | Trattamento | AA liberi (mg/g ss) | AA totali (mg/g ss) | AA liberi/ totali (%) |
|-----------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| C | Fresco | 29,357 b | 253,886 b | 11,5603 % |
| Ccom | Commerciale | 35,962 a | 226,41 b | 15,883% |
| Mw | Mw 220 W | 17,88 c | 254,66 b | 7,02% |
| S | Secco | 29,31 b | 271,69 a | 10,79% |
| L0 | Liofilizzato t0 | 27,81 b | 216,001 c | 12,879 % |

Tabella 10: Valori del contenuto di aminoacidi liberi, totali e loro rapporto, sia per polline di salice di controllo, commerciale, trattato microonde e secco. Il valore è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori significativamente uguali in seguito ad ANOVA a una via (P<0,05).

Come si può notare il contenuto di aminoacidi liberi è molto alto nel campione commerciale; i valori dei contenuti del campione secco, fresco e liofilizzato sono significativamente uguali.

Il campione Mw ha un contenuto di aminoacidi liberi significativamente diverso da tutti gli altri campioni, valore molto basso.

Per quanto riguarda gli aminoacidi totali il valore del campione secco è più alto e significativamente diverso da tutti gli altri campioni mentre quelli dei campioni fresco, commerciale e mw risultano invece uguali, il liofilizzato ha una quantità di aminoacidi totale più bassa di tutti e significativamente diversa dagli altri campioni.

Rapporto tra prolina e aminoacidi liberi

Il valore del rapporto tra prolina e aminoacidi liberi è indicatore di freschezza e di elevato valore biologico del polline. I rapporti più bassi si trovano nei campioni fresco, commerciale e liofilizzato mentre il valore leggermente più alto si trova nel campione trattato al microonde. Il campione secco ha il valore più alto di tutti che si avvicina alla soglia minima richiesta (<65%) per considerare il polline un prodotto di qualità (Tabella 11).

| ID | Trattamento | Pro L/ AA L |
|------|-----------------|-------------|
| C | Fresco | 35,04% |
| Ccom | Commerciale | 34,19% |
| Mw | Mw 220 W | 42,42% |
| S | Secco | 61,15% |
| L0 | Liofilizzato t0 | 37,4 % |

Tabella 11: Rapporto tra prolina e aminoacidi liberi sul campione di polline di salice fresco, commerciale, trattato al microonde secco e liofilizzato.

Polline di salice 2015 liofilizzato e liofilizzato con shelf life *Contenuto di prolina libera e totale*

Il polline liofilizzato t0 è polline che ha subito un processo di liofilizzazione e conservato in congelatore, mentre il liofilizzato t1 ha subito lo stesso processo ma poi è stato conservato per un mese alla temperatura di circa 20°C al fine di valutare lo stato di conservazione; dopo questo mese anche questo campione è stato posto in congelatore (Tabella 12).

| ID | Trattamento | Prolina libera (mg/g ss) | Prolina totale (mg/g ss) | Prolina libera/ totale (%) |
|----|-----------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| L0 | Liofilizzato t0 | 10,421 a | 23,53 b | 23,53 |
| L1 | Liofilizzato t1 | 7,56 b | 67,57 a | 11,00 |

Tabella 12: Valore del rapporto prolina libera e totale sul campione di polline di salice liofilizzato e liofilizzato con shel life 1 mese. Il valore è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere diverse corrispondono a valori significativamente diverse in seguito ad ANOVA a una via (P<0,05).

Come si vede dai risultati ottenuti il contenuto di prolina libera non è molto alto già nel campione liofilizzato, ha una quantità di 10,42 mg/g di sostanza secca; questo dato era già visibile confrontando i valori di prolina libera con gli altri campioni trattati di salice. Nel liofilizzato t1 che è stato conservato per 1 mese, il contenuto si abbassa ulteriormente fino a 7,56 mg/g di sostanza secca. Questi due valori sono significativamente diversi.

Contenuto di aminoacidi liberi e totali

Nei campioni liofilizzati L0, il contenuto di aminoacidi liberi supera i 2,5 g/100g. Dopo un mese dalla liofilizzazione, il contenuto di aminoacidi liberi diminuisce fino ad arrivare a 1,86 g/100g. Questi valori sono significativamente diversi (Tabella 13).

| ID | Trattamento | Aminoacidi liberi (mg/g ss) | Aminoacidi totali (mg/g ss) | AA liberi/ totali (%) |
|----|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| L0 | Liofilizzato t0 | 27,81 a | 216,001 b | 12,879 % |
| L1 | Liofilizzato t1 | 18,65 b | 326,50 a | 5,71% |

Tabella 13: Valore di aminoacidi liberi e totali ed il loro rapporto del campione di polline di salice liofilizzato e liofilizzato conservato un mese (t1) Il valore è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere diverse corrispondono a valori significativamente diverse in seguito ad ANOVA a una via (P<0,05).

Rapporto tra prolina e aminoacidi liberi

È stato analizzato il rapporto tra prolina e aminoacidi liberi per quanto riguarda sia il campione liofilizzato che quello liofilizzato e conservato per un mese.

Per entrambi i campioni il rapporto risulta sotto il 65%; per quanto riguarda il liofilizzato t0 questo ha un valore del 37,4 % e il liofilizzato t1 del 40,5 %. Si nota quindi che nel tempo si è avuto un leggero aumento di questo rapporto. (Tabella 14).

| ID | Trattamento | Pro L/AA L (mg/g ss) |
|----|-----------------|----------------------|
| L0 | Liofilizzato t0 | 37,4 % |
| L1 | Liofilizzato t1 | 40,5 % |

Tabella 14: Valore del rapporto prolina libera/aminoacidi liberi per il campione liofilizzato (t0) e liofilizzato e conservato 1 mese (t1).

Polline di castagno trattato con microonde

Contenuto di prolina libera e totale

Per quanto riguarda il castagno, il campione fresco analizzato è stato lo stesso delle prove preliminari, dopo essere rimasto nel congelatore alla temperatura di -20°C. Gli altri campioni sono stati trattati al microonde e poi conservati in congelatore. In Tabella 15 sono indicati i valori ottenuti dopo analisi della prolina libera e totale e del rapporto libera su totale effettuati sia sul controllo che sui campioni trattati.

| ID | Metodo | Prolina libera (mg/g ss) | | Prolina totale (mg/g ss) | | Prolina libera/ totale (%) |
|----|-----------|-----------------------------|---|-----------------------------|---|-------------------------------|
| | fresco | 16.31 | a | 44.58 | a | 36.58 |
| 1 | MW 150/30 | 18.11 | a | 47.2 | a | 38.37 |
| 2 | MW 200/10 | 16.17 | a | 39.03 | b | 41.42 |
| 3 | MW 200/20 | 14.96 | a | 34.20 | c | 43.74 |
| 4 | MW 200/30 | 17.74 | a | 39.47 | b | 44.26 |

Tabella 15: Quantità di prolina libera e totale e rapporto tra prolina libera e totale per il controllo di polline di castagno non trattato e dei campioni trattati al microonde per diverse potenze e tempi. Per la prolina totale il valore è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori significativamente uguali in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

I dati della prolina libera non sono significativamente diversi, infatti è possibile vedere che i valori variano molto poco tra un trattamento e un altro.

Comunque il trattamento condotto al microonde alla potenza di 150 W per 30 minuti è in grado di dare un contenuto in prolina libera leggermente maggiore, mentre il trattamento a 200 W per 20 minuti è quello che ha valore più basso.

Invece per il contenuto di prolina totale i dati statistici indicano che il campione 1 ha lo stesso valore del fresco e presenta un alto contenuto di prolina totale. Il campione 2 e 4 sono significativamente uguali.

Il rapporto prolina libera su totale è più alto di tutti nel campione 4.

Contenuto di aminoacidi liberi e totali

Dopo un'analisi dei quattro campioni trattati al microonde e del controllo fresco, si nota che i dati sono significativamente uguali per il contenuto in aminoacidi liberi per tutti i campioni trattati. Il campione 1 è quello che comunque mostra una maggiore quantità rispetto agli altri campioni.

(Tabella 16).

| ID | Metodo | Aminoacidi liberi (mg/g ss) | Aminoacidi totali (mg/g ss) | Aminoacidi liberi/ totali (%) |
|----|-----------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | fresco | 24,67 a | 145,87 c | 12,9 |
| 1 | MW 150/30 | 27,28 a | 256,656 a | 10,4 |
| 2 | MW 200/10 | 23,51 a | 247,87 a | 9,5 |
| 3 | MW 200/20 | 23,42 a | 209,35 b | 11,1 |
| 4 | MW 200/30 | 26,24 a | 257,55 a | 10,2 |

Tabella 16. Valore del contenuto di aminoacidi liberi e totali e il loro rapporto per il campione di polline di castagno fresco e dei trattati mediante mw. Per gli aminoacidi liberi il valore è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori significativamente uguali in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Per quanto riguarda gli aminoacidi totali, il valore più alto è riscontrabile sempre nel campione 1, nel 2 e nel 4 e dall'analisi statistica si nota che questi valori sono significativamente uguali.

Il valore del rapporto tra aminoacidi liberi e totali è più alto nel campione fresco e nel campione 3.

Rapporto tra prolina e aminoacidi liberi

È stata effettuata un'ulteriore analisi per valutare il rapporto tra prolina e aminoacidi liberi. Questo rapporto resta abbastanza basso nel campione 3 mw 200/20, nel campione 2 il valore va un po' oltre la soglia del 65%. Questi dati sono indicati in tabella 17.

| ID | Metodo | Prolina L/AA L |
|----|-----------|----------------|
| | fresco | 65 % |
| 1 | MW 150/30 | 66 % |
| 2 | MW 200/10 | 69 % |
| 3 | MW 200/20 | 64 % |
| 4 | MW 200/30 | 67 % |

Tabella 17: Rapporto tra prolina libera e aminoacidi liberi di campioni di polline di castagno di controllo e di campioni trattati.

4.2 Contenuto di rutina

Tramite analisi in HPLC e, mediante l'utilizzo di standard di rutina è stato identificato questo flavonoide e successivamente quantificato. Come già accennato la rutina è il composto appartenente alla classe dei flavonoidi agliconi più abbondante nel polline.

La rutina rappresenta il composto maggiormente soggetto a variazioni quantitative come risultato dei processi di condizionamento a cui è sottoposto il polline fresco.

Polline di castagno 2014 liofilizzato

Per quanto riguarda i pollini di castagno liofilizzati e del controllo non è stata effettuata un'analisi statistica poiché queste erano prove preliminari per capire l'andamento della rutina al variare del trattamento. Una volta trovata l'area della rutina è stato possibile calcolare la quantità di rutina (mg/g) su peso secco e fresco (Tabella 18).

| ID | Tratt | Rutina (mg/g p.f) | SS % | Rutina (mg/g ps) | Perdita sul C (ps) | SS da TGA % | Rutina (mg/g p.s) | Perdita sul C (ps) |
|----------|-----------|-------------------|-------|------------------|--------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| C | Fresco | 259,30 | 66,18 | 391,83 | /////// | 74,50 | 348,06 | //////// |
| L9 | LIOF 9h | 315,79 | 84,87 | 372,08 | -5,04 | 92,95 | 339,74 | -2,39 |
| L7 | LIOF 7h | 233,04 | 83,31 | 279,75 | -28,60 | 91,07 | 255,89 | -26,48 |
| L4,5 | LIOF 4h30 | 122,59 | 81,81 | 149,85 | -61,75 | 89,62 | 136,79 | -60,70 |
| L4,5-bis | LIOF 4h30 | 83,83 | 79,73 | 105,15 | -73,16 | 87,44 | 95,88 | -72,45 |

Tabella 18: Analisi del contenuto di rutina (mg su peso secco e fresco) su campioni di polline di castagno di controllo e liofilizzati. È riportata inoltre la perdita di rutina sul campione di controllo.

È stata valutata la concentrazione di rutina sia quantificando la sostanza secca calcolata in stufa che mediante bilancia termo gravimetrica.

Per quanto riguarda il controllo, la quantità di rutina su peso secco è presente in maggiore quantità, i trattamenti di liofilizzazione riducono la quantità di rutina, questo accade sia calcolando la ss con stufa che mediante tga. In particolare il trattamento di liofilizzazione a 4,5 ore (campione L4,5-bis) è quello che provoca una maggiore riduzione del contenuto di rutina.

Si può notare che la perdita di rutina sul controllo è quasi uguale sia se si considera la sostanza secca calcolata mediante tga che con la stufa.

Le analisi sono state condotte nuovamente sui campioni L9, che aveva minore perdita di rutina e L 4,5 bis che aveva maggiore contenuto di umidità residua a distanza da una settimana dal primo test.

I risultati confermano che anche a distanza di tempo, si ha una riduzione del contenuto di rutina (Tabella 19).

Infatti nel campione L9 si ha un calo del 22,16% rispetto al controllo, mentre nel campione L4,5-bis il calo è del 95,58 %.

| ID | Tratt | Rutina (mg/g p.f) | SS % | Rutina (mg/g ps) | Perdita sul C (ps) | SS da TGA % | Rutina (mg/g p.s) | Perdita sul C (ps) |
|-----------|-----------|-------------------|-------|------------------|--------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| C | Fresco | 259,30 | 66,18 | 391,83 | /////// | 74,50 | 348,06 | /////// |
| L9 | LIOF 9h | 258,86 | 84,87 | 305,00 | -22,16 | 92,95 | 278,49 | -19,99 |
| L4,5 -bis | LIOF 4h30 | 13,81 | 79,73 | 17,32 | -95,58 | 87,44 | 15,79 | -95,46 |

Tabella 19: Analisi della rutina su campioni di polline di castagno liofilizzati utilizzati per test preliminari dopo una settimana.

Polline di castagno 2014 trattato al microonde

Dall'analisi del contenuto di rutina su peso secco dei campioni trattati a microonde, si nota che i campioni trattati non sono significativamente diversi dal controllo (Figura 23).

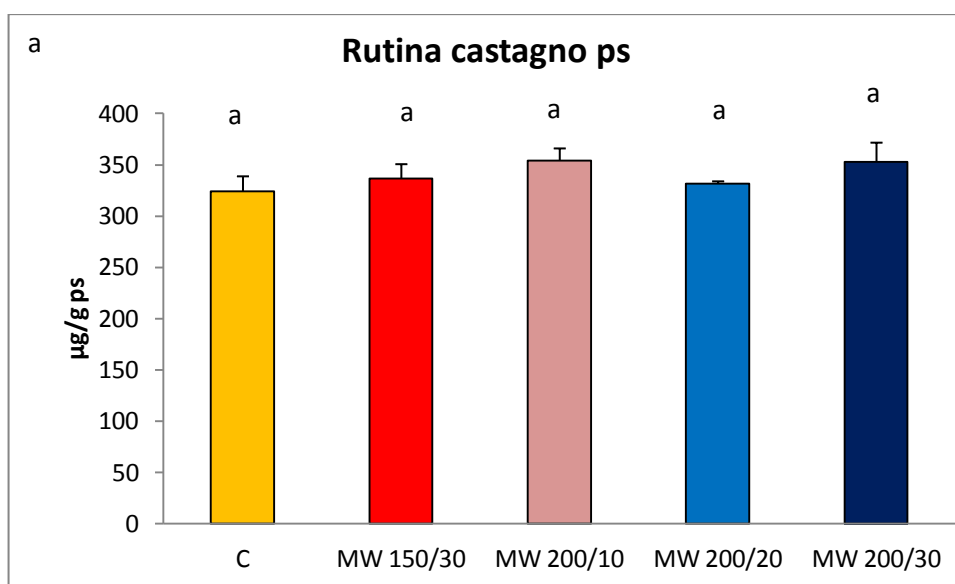


Figura 23: Valori medi del contenuto di rutina di polline di castagno di controllo e dei campioni trattati con microonde, espressi come µg/gps, ± E.S. Il valore della rutina ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

La rutina non subisce quindi sostanziali modifiche se il campione viene trattato al microonde. Il contenuto di rutina del controllo è 32,4 mg su 100 g. Nel campione MW150/30 si nota un leggero aumento a 33,6 mg su 100 g, come per il campione MW200/10 che ha un contenuto di 35,4 mg su 100 g. Il campione MW200/20 ha

un contenuto di fenoli di 33,1 mg su 100 g, infine il campione MW 200/30 di 35,20 mg su 100 g.

Per quanto riguarda il peso fresco si ha qualche maggiore variazione del contenuto di rutina, dovuto evidentemente alla presenza di acqua che incide con i valori finali (Figura 24).

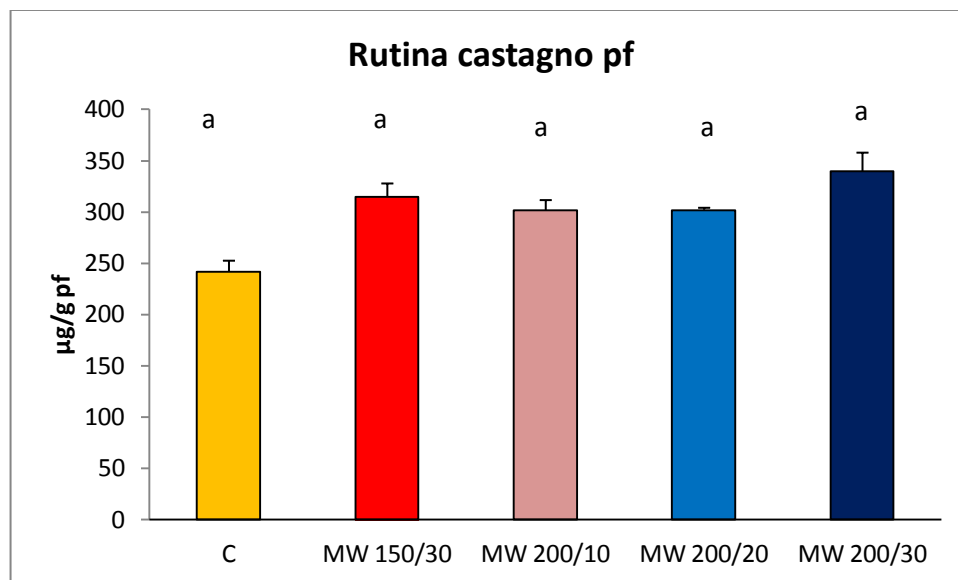


Figura 24: Valori medi del contenuto di rutina di polline di castagno di controllo e dei campioni trattati con microonde, espressi come µg/gpf, ± E.S. Indicata la media del contenuto di rutina del controllo e dei campioni trattati con microonde, la media è stata fatta su tre estrazioni. Lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Il contenuto di rutina nel controllo è 24,15 mg su 100 g su pf. Nel campione MW150/30 si nota un leggero aumento rispetto al controllo, il valore è di 31,4 mg su 100 g su pf, questo avviene anche il campione MW200/10 che ha un contenuto di 30,1 mg su 100 g su pf. Il campione MW200/20 ha un contenuto di fenoli praticamente uguale al precedente di 30,1 mg su 100 g su pf; infine il campione MW 200/30 contiene di 33,9 mg su 100 g su of di rutina. Comunque anche in questo caso, secondo l'analisi statistica, i valori non sono significativamente diversi.

Polline di salice fresco, commerciale, liofilizzato, trattato al microonde e secco

Dall'analisi degli estratti di salice tal quale, commerciale, liofilizzato, trattato al microonde e secco è possibile notare che il campione secco ha un contenuto di rutina molto più alto rispetto agli altri campioni (Figura 25). Il contenuto in rutina

nel salice tal quale è 6,4 mg su 100g ps, nel campione commerciale il contenuto si riduce a 4,3 mg su 100g ps e nel campione trattato a 3,7 mg su 100 g ps. Il campione liofilizzato (T0) mostra un leggero aumento del contenuto di rutina rispetto agli altri trattati (6,6 mg su 100 g). Tuttavia queste differenze di concentrazione, non sono significative dal punto di vista statistico.

Invece, il campione secco ha il valore significativamente diverso rispetto agli altri e raggiunge un contenuto di rutina pari a 13,13 mg su 100 g.

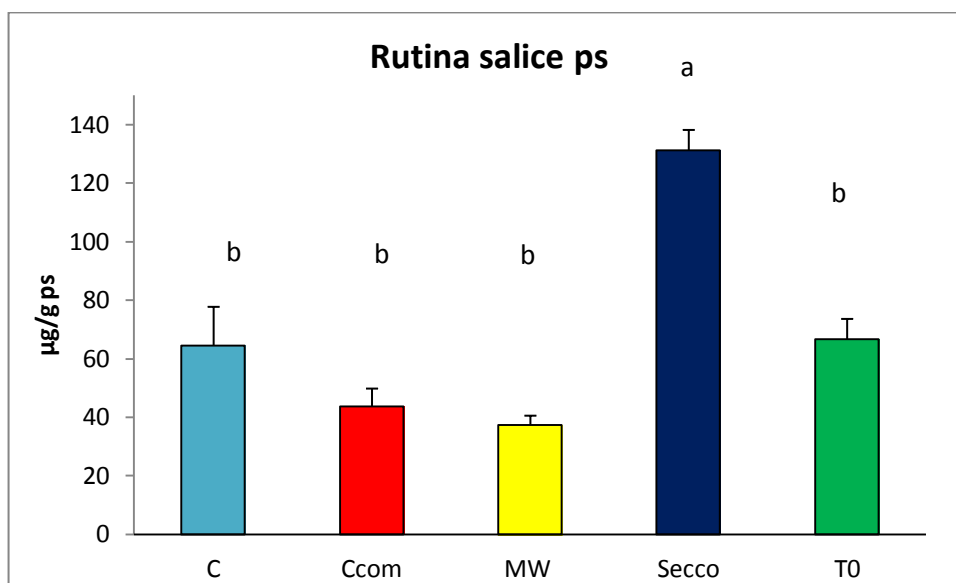


Figura 25: Valori medi del contenuto di rutina del polline di salice di controllo, del campione commerciale, liofilizzato, secco e trattato con microonde, espressi come $\mu\text{g/gps} \pm \text{E.S.}$ Per ogni campione lettere diverse corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Analizzando la concentrazione di rutina su base di sostanza fresca, si osserva che anche in questo caso il campione di polline secco ha il contenuto di rutina molto più elevato (Figura 26).

Il campione di controllo mostra un contenuto di 4,9 mg su 100 g pf, quello commerciale di 3,6 mg su 100 g pf, il campione trattato al microonde di 3,4 mg su 100 g pf e il liofilizzato di 6,2 mg su 100g pf. Questi valori sono in linea con i dati ottenuti su base di sostanza secca.

Le differenze tra questi campioni non sono, anche in questo caso, significative a livello statistico. Il campione secco, invece, raggiunge un contenuto di rutina molto più elevato (12,3 mg su 100g pf).

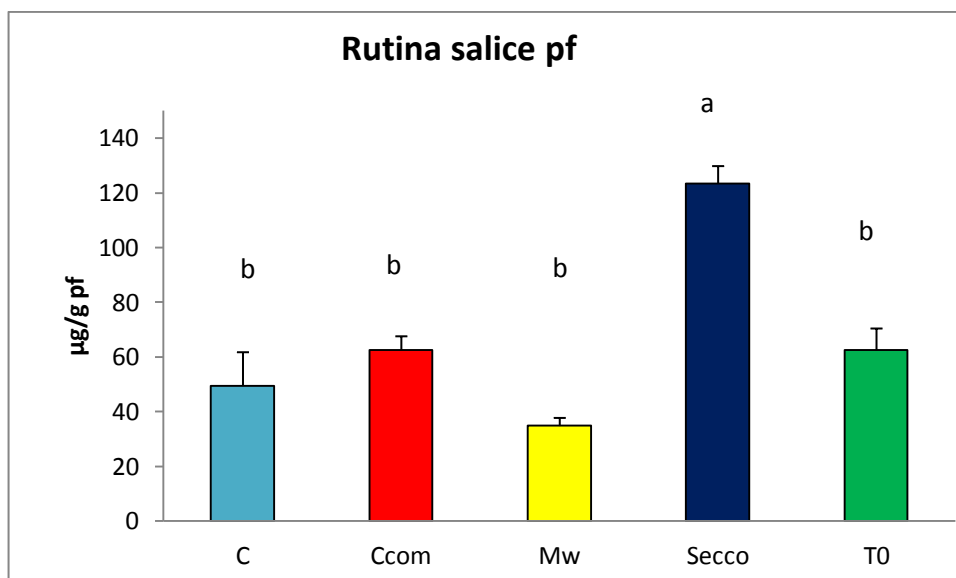


Figura 26: Valori medi del contenuto di rutina del polline di salice di controllo, del campione commerciale, liofilizzato, secco e trattato con microonde, espressi come $\mu\text{g/gpf} \pm \text{E.S.}$ Per ogni campione lettere diverse corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Polline di salice 2015 liofilizzato e liofilizzato con shelf life

Il contenuto di rutina nel polline di salice liofilizzato conservato per un mese (T1) subisce una significativa riduzione, rispetto al campione liofilizzato ma che non è stato conservato (T0). Infatti nel campione T0 la concentrazione di rutina è di $66,670 \mu\text{g/g ps}$ mentre, nel campione T1 è di $27,36 \mu\text{g/g ps}$ (Figura 27).

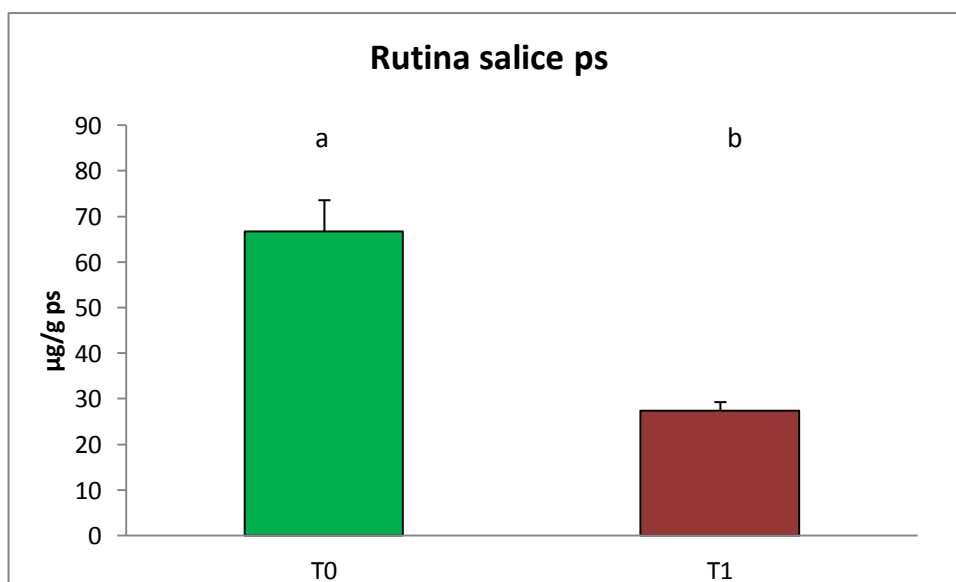


Figura 27: Valori medi del contenuto di rutina del polline di salice liofilizzato (T0) e del campione liofilizzato con shelf-life di 1 mese (T1), espressi come $\mu\text{g/gps} \pm \text{E.S.}$ Per ogni campione lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Analoghi risultati sono evidenti per la concentrazione di rutina, calcolata su base di sostanza fresca. Infatti il campione T0 mostra una concentrazione di rutina di 62,5 $\mu\text{g/g pf}$ che nel campione T1 si riduce a 25,65 $\mu\text{g/g pf}$ (Figura 28).



Figura 28: Valori medi del contenuto di rutina del polline di salice liofilizzato (T0) e del campione liofilizzato con shelf-life di 1 mese (T1), espressi come $\mu\text{g/gpf} \pm \text{E.S.}$ Per ogni campione lettere diverse corrispondono a valori significativamente diversi in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

4.3 Contenuto di composti fenolici

Polline di castagno 2014 trattato al microonde

Dall'analisi del contenuto di fenoli si nota che la disidratazione al microonde non determina una sostanziale variazione nella loro concentrazione. Esprimendo i risultati su base di sostanza secca il controllo mostra una concentrazione di fenoli di 23,8 mg/g, il campione MW150/30 di 24,23 mg/g, il campione MW200/10 di 25,69 mg/g, il campione MW200/20 di 24,15 mg/g, infine il campione MW 200/30 di 25,20 mg/g (Figura 29). L'analisi statistica, non mostra differenze significative.

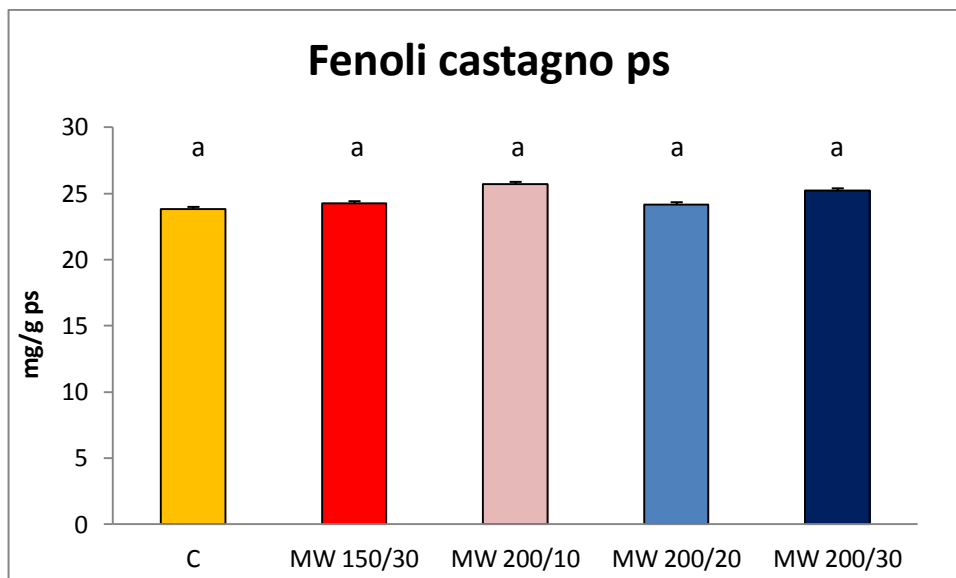


Figura 29: Valori medi del contenuto di fenoli di polline di castagno di controllo e dei campioni trattati con microonde, espressi come $\mu\text{g/gps}$, \pm E.S. Indicata la media del contenuto di fenoli del controllo e dei campioni trattati con microonde, la media è stata fatta su tre estrazioni. Lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Calcolando il contenuto di fenoli nel polline di castagno su base di sostanza fresca, anche in questo caso non compaiono differenze significative fra i trattamenti (Figura 30).

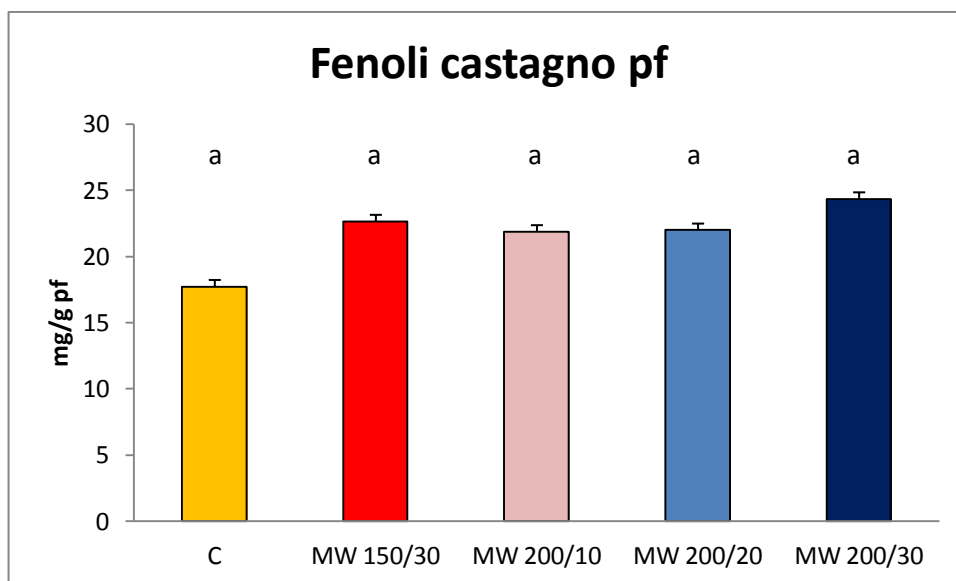


Figura 31: Valori medi del contenuto di fenoli di polline di castagno di controllo e dei campioni trattati con microonde, espressi come $\mu\text{g/gpf}$, \pm E.S. Indicata la media del contenuto di fenoli del controllo e dei campioni trattati con microonde, la media è stata fatta su tre estrazioni. Lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Il controllo ha un contenuto di fenoli di 17,78 mg/g. Nel campione MW150/30 si ha un aumento fino a raggiungere un valore di 22,65 mg/g, come per il campione

MW200/10, il contenuto raggiunge la quantità di 21,8 mg/g. Il campione MW200/20 mostra un contenuto praticamente identico al precedente di 21,9 mg/g e il campione MW 200/30 mostra un contenuto in rutina di 24,35 mg/g. Questi valori non sono significativamente differenti.

Il contenuto di flavonoidi, calcolati su base di sostanza secca, non mostrano differenze significative fra i vari trattamenti (Figura 32).

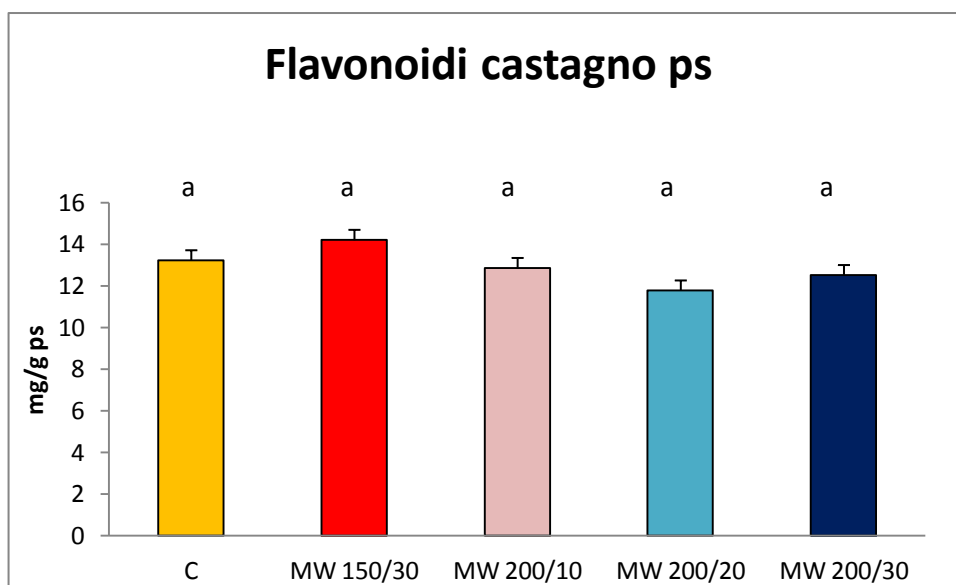


Figura 32: Valori medi del contenuto di flavonoidi di polline di castagno di controllo e dei campioni trattati con microonde, espressi come $\mu\text{g/gps}$, \pm E.S. Indicata la media del contenuto di flavonoidi del controllo e dei campioni trattati con microonde, la media è stata fatta su tre estrazioni. Lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Il controllo, i campioni MW200/10, MW 200/30, MW200/20 e MW150/30 mostrano un contenuto di flavonoidi rispettivamente di 13,2 mg/g ps, 12,5 mg/g ps, di 14,19 mg/g e di 11,76 mg/g. Questi valori risultano non statisticamente significativamente differenti. Il contenuto di flavonoidi espressi su base di peso fresco, nei vari trattamenti non risulta statisticamente differente (Figura 33).

Il controllo mostra una quantità di flavonoidi pari a 9,76 mg/g pf, mentre i campioni MW150/30 e MW200/30 un contenuto leggermente superiore rispetto al controllo pari a 12,4 mg/g. I campioni MW200/10 e MW200/20 hanno invece un contenuto di flavonoidi leggermente inferiore (11 mg/g).

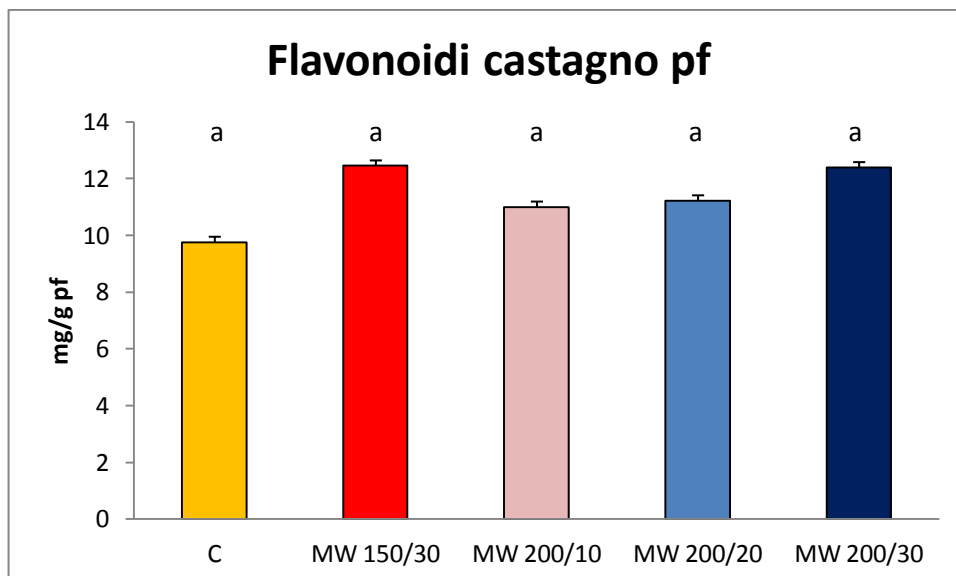


Figura 33: Valore della media del contenuto di flavonoidi del controllo e dei campioni trattati con microonde, peso fresco, con l'errore standard sul peso fresco. Il valore dei fenoli ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Polline di salice fresco, commerciale, liofilizzato, trattato al microonde e secco

L'analisi del contenuto fenolico dei campioni di salice fresco, commerciale, liofilizzato, trattato al microonde e secco, ha dimostrato che tra i vari trattamenti c'è molta variabilità (Figura 34).

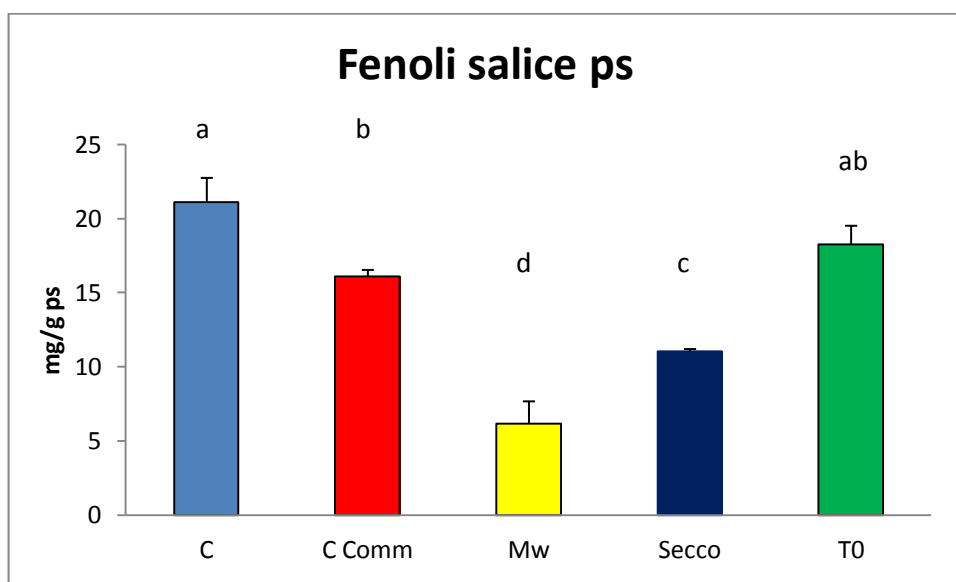


Figura 34: Valori medi del contenuto di fenoli di polline di salice di controllo, commerciale, liofilizzato e dei campioni trattati con microonde, espressi come $\mu\text{g/gps}$, \pm E.S. Il valore dei fenoli ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Il controllo mostra un contenuto di fenoli di 21,20 mg/g ss mentre, il campione commerciale e il liofilizzato presentano un contenuto di 16,09 mg/g e di 18,26 mg/g. Il campione di controllo e il commerciale differiscono tra, mentre il campione liofilizzato non differisce né dal controllo né dal commerciale.

Sia il polline secco che il campione trattato al microonde mostrano un contenuto molto più basso e statisticamente differente da tutti gli altri campioni (11,04 mg/g e 6,18 mg/g ss rispettivamente).

Per quanto riguarda il contenuto in fenoli calcolato su base di sostanza fresca, il controllo (16,27 mg/gpf), il commerciale (13,38 mg/gpf), il liofilizzato (17,12 mg/gpf) e il trattato a microonde (10,12 mg/gpf) differiscono statisticamente tra loro, mentre il liofilizzato non differisce né dal controllo né dal commerciale (Figura 35).

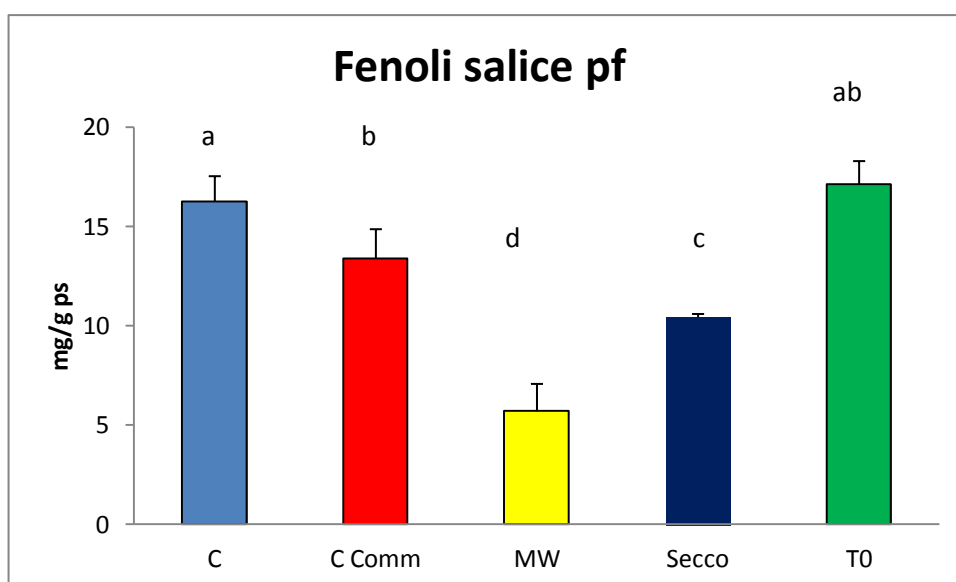


Figura 35: Valori medi del contenuto di fenoli di polline di salice di controllo, commerciale, liofilizzato e dei campioni trattati con microonde, espressi come $\mu\text{g/gpf}$, \pm E.S. Il valore dei fenoli ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Polline di salice liofilizzato e liofilizzato con shelf life

È stato valutato come varia il contenuto dei fenoli nel campione liofilizzato a distanza di un mese di tempo (Figura 36). Dall'analisi statistica, il valore dei due campioni, riportati in base alla sostanza secca, è significativamente differente.

Il campione liofilizzato ha un contenuto di fenoli di 18,2 mg/g ss, mentre quello che è stato sottoposto a shelf-life per un periodo di un mese mostra un contenuto di 6,61 mg/g ss.

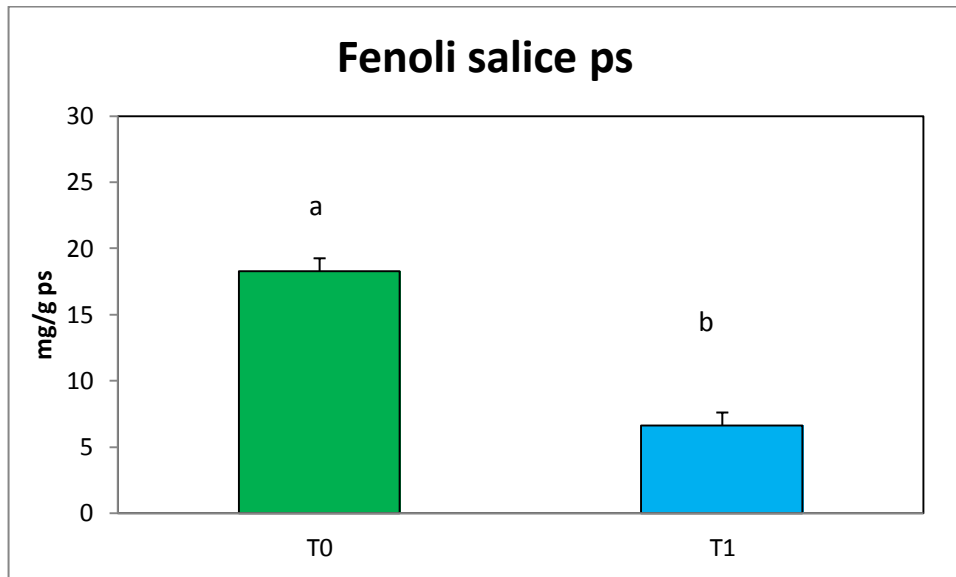


Figura 36: Valori medi del contenuto di fenoli di polline di salice liofilizzato (T0) e liofilizzato con shelf-life (T1), espressi come $\mu\text{g/gps}$, \pm E.S. Il valore dei fenoli ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Analizzando il contenuto dei fenoli su base di sostanza fresca, si evidenzia che i valori sono significativamente differenti tra il campione T0 e T1 (Figura 37) mostrando rispettivamente un contenuto di 17,12 mg/g e 6,20 mg/g.

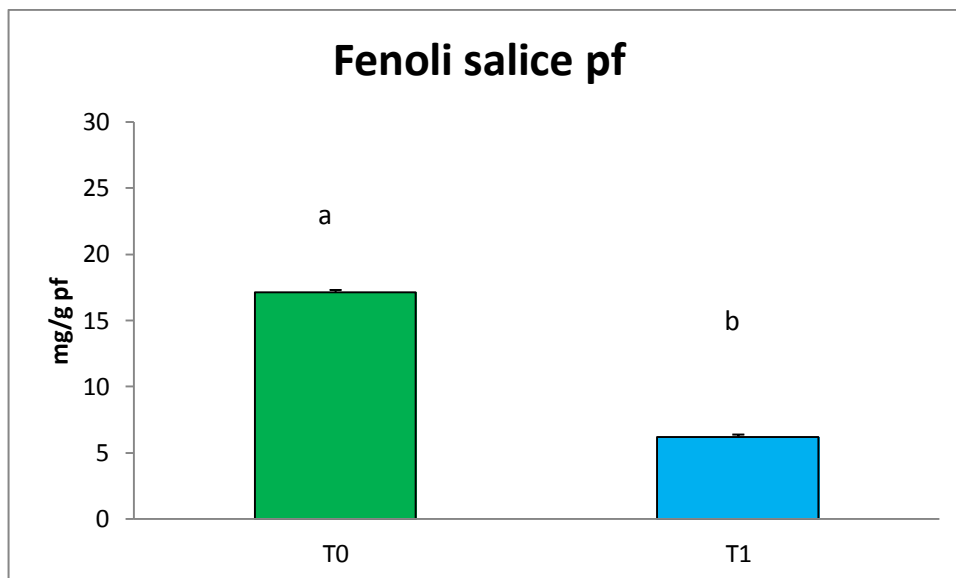


Figura 37: Valori medi del contenuto di fenoli di polline di salice liofilizzato(T0) e liofilizzato con shelf- life di 1 mese (T1) espressi come $\mu\text{g/gpf}$, \pm E.S. Il valore dei fenoli ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Per quanto riguarda il contenuto di flavonoidi, sono stati confrontati tra loro solo i valori del campione di salice di controllo, del campione commerciale e del campione liofilizzato.

Il controllo ha un contenuto maggiore (8,31 mg/g ps) di flavonoidi, questo valore si riduce nel commerciale (6,26 mg/g ps) e nel campione liofilizzato T0 (7,22 mg/g ps). Tuttavia queste differenze di concentrazione tra il controllo e i campioni trattati non sono statisticamente significative (Figura 38).

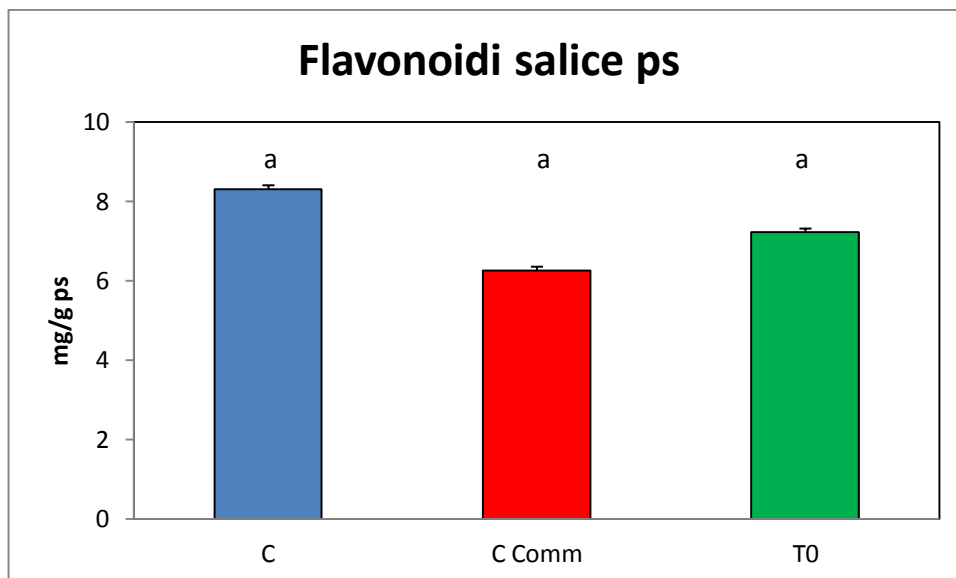


Figura 38: Valori medi del contenuto di flavonoidi di polline di salice di controllo, commerciale, liofilizzato, espressi come $\mu\text{g/gps}$, \pm E.S. Il valore dei flavonoidi ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

Il contenuto di flavonoidi calcolati sulla sostanza fresca è di 8,31 mg/g per quanto riguarda il controllo, che si riduce a 6,26 mg/g nel campione commerciale e a 7,22 mg/g nel liofilizzato. Le differenze di concentrazione che ci sono tra questi campioni non sono comunque significative (Figura 39). Quindi nei campioni trattati non si ha una riduzione del contenuto dei flavonoidi.

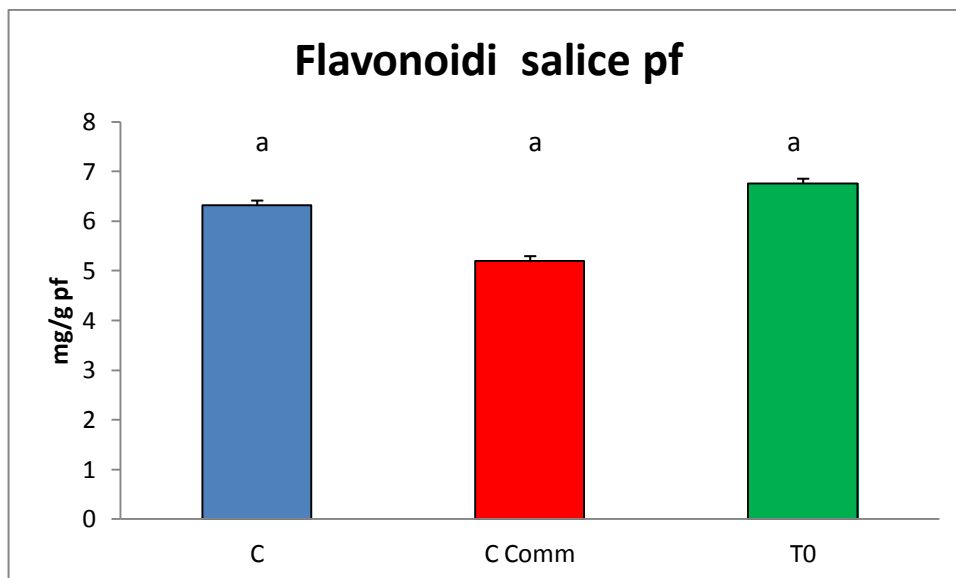


Figura 39: Valori medi del contenuto di flavonoidi di polline di salice di controllo, commerciale, liofilizzato, espressi come $\mu\text{g/gpf}$, \pm E.S. Il valore dei flavonoidi ai diversi trattamenti è il risultato di una media di 3 estrazioni, lettere uguali corrispondono a valori non significativamente differenti in seguito ad ANOVA a una via ($P < 0,05$).

5.DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni è cresciuto l'interesse pubblico verso i prodotti vegetali che possono essere fonte di numerose sostanze nutritive poiché studi epidemiologici e biochimici hanno individuato numerosi composti in grado di apportare benefici per la salute umana.

Attualmente i consumatori sono sempre più consapevoli dello stretto legame esistente tra dieta alimentare e salute, con particolare riferimento al ruolo fondamentale che l'alimentazione corretta gioca nel combattere l'invecchiamento precoce, ma soprattutto malattie cardiache e cancro.

Si è assistito a una crescente produzione di integratori alimentari contenenti sostanze di origine vegetale, volti a favorire l'assunzione di determinate sostanze nutritive, non presenti in una dieta sbilanciata o non corretta.

Il polline è stato a lungo studiato per essere considerato un alimento completo, le api lo prendono dai fiori e in seguito lo mescolano con nettare e secrezioni salivari per questo è ricco di zuccheri, proteine, lipidi e flavonoidi (Tomas-Lorente, F. et al., 1992).

Esso da fresco ha un alto contenuto di proteine, la quantità è di circa 12,6-18 g su 100 g su sostanza secca e sono presenti diciotto aminoacidi, il più abbondante la prolina. La prolina non è un aminoacido essenziale, cioè l'organismo è in grado di sintetizzarlo e non è necessario assumerlo tramite la dieta; Nel polline il contenuto di prolina è di circa 19,7 mg/g su sostanza fresca il contenuto di prolina è del 63,1 % del contenuto totale di aminoacidi liberi.

Il polline possiede però anche una buona percentuale di aminoacidi essenziali come istidina, arginina e lisina che costituiscono tra il 5,74 e il 19,76 % del totale degli aminoacidi (Serra Bonvehí et al., 1997).

Questi dati sono interessanti per considerare il polline una fonte di aminoacidi liberi, facilmente digeribili e assimilabili, e quindi poter essere inserito nella dieta umana come *functional food*.

Per poter essere commercializzato come integratore il polline deve essere conservato e di conseguenza avere un ridotto contenuto idrico, in grado di

prolungare la shelf life, ma nello stesso tempo mantenere un buon livello di composti nutrizionali.

Gli autori Serra Bonvehí et al., (1997) hanno analizzato il polline sottoposto a trattamenti termici ed hanno trovato che la prolina è l'aminoacido libero predominante nel polline che è stato ben essiccato e conservato, invece l'acido glutammico è quello predominante nel polline fresco. Il livello di prolina formato dall'acido glutammico durante il processo di drying è influenzato dalla presenza e dall'attività della glutammato deidrogenasi (Britikov E. A., et al. 1986).

Quando la temperatura è troppo alta e i processi di essiccamento sono svolti per periodi troppo lunghi, il contenuto di aminoacidi liberi decresce ($< 2 \text{ g}/100 \text{ g}$) e di conseguenza il contenuto di prolina rispetto agli aminoacidi liberi totali aumenta ($> 80\%$).

Quando invece viene effettuato un corretto processo di drying e si ottiene un contenuto finale di acqua di 4-8 % il contenuto di aminoacidi liberi resta alto ($> 2,5 \%$) ed il contenuto di prolina rispetto gli aminoacidi liberi è meno del 65% (Serra Bonvehí et al., 1997).

Una quantità minima di 2% di aminoacidi liberi è suggerita per standardizzare la vendita commerciale del polline nel mercato europeo.

Il rapporto prolina/aminoacidi liberi totali può essere usato come indicatore dell'età del polline.

Ogni polline ha specifiche caratteristiche legate alle specie florali o alle cultivar, ma la qualità del prodotto finale dipende anche dal lavaggio, dall'essiccamento e dai processi di packaging applicati al fine di conservare il prodotto a lungo periodo.

Il polline contiene inoltre una buona percentuale di composti fenolici quali i flavonoidi, molecole in grado di ridurre l'incidenza di malattie degenerative come cancro e arteriosclerosi. Infatti è riportato che i flavonoidi sono in grado di inibire la DNA topoisomerasi I e II (topo I e topo II) e quindi sono stati considerati buoni candidati come composti anticancerogeni (Cantero, G., et al., 2006).

Questi composti hanno raggiunto particolare interesse negli ultimi anni nel campo della nutrizione e della salute, soprattutto per la capacità di agire come antiossidanti.

Nel polline i flavonoidi sono presenti soprattutto come glicosidi, infatti la presenza di rutina è considerata un buon indicatore della qualità del polline.

La rutina (quercitina-3-ramnosil glucoside) venne scoperta per la prima volta nel grano saraceno nel 19esimo secolo, il quale tuttoggi è considerato la maggiore fonte dietetica di questo glucoside.

La rutina è stata ampiamente utilizzata nel trattamento di malattie, soprattutto per le sue numerose attività farmacologiche tra cui quelle antiallergiche (Rosane, W. I. et al., 2006), anti-infiammatorie, vasoattive, antitumorali, antibatteriche, antivirali. Inoltre, gli autori Webster et al., (1996) hanno individuato proprietà citoprotettive, anticarcinogeniche e antispasmodiche di questo flavonoide.

È stata individuata la capacità di prevenire ulcere alla mucosa gastrica in modelli animali (Barnaulow et al., 1983). Inoltre la rutina è un tipo di flavonoide glucosidico conosciuto come vitamina P, che sembra avere proprietà antiaggreganti, antivirali e anti ipertensive, nonché la capacità di rafforzare i capillari dei vasi sanguigni, che sono i risultati della sua alta capacità di agire come “scavenger” e antiossidante (Guo et al., 2007). Queste proprietà sono potenzialmente benefiche nel prevenire malattie e proteggere la stabilità del genoma.

Inoltre altri studi mostrano sia un effetto dose-risposta, relativamente alla sua capacità di inibire le lipoproteine a bassa densità (LDL) (Jiang et al., 2007) e sia avere un’alta attività antiossidante nella reazione di Fenton.

Numerosi studi e ricerche effettuate sui polifenoli hanno assegnato a questi composti una elevata attività nella prevenzione di malattie, di conseguenza questi principi chimici stanno sempre più interessando il mercato degli integratori alimentari.

Bassi valori di rutina nel polline indicano lunghi periodi di conservazione o eccessivo calore applicato durante il processo di drying. Lo studio di Serra Bonvehí et al., (2001) indica che il contenuto di rutina nel polline è alto, la sua concentrazione può variare tra 18,35 e 44,5 mg su 100 g su sostanza secca.

Gli studi effettuati da questi autori indicando che la qualità del polline dipende essenzialmente dalla sua conservazione, dunque suggeriscono una quantità minima di 20 mg su 100 g di rutina nel polline destinato al mercato europeo.

Infatti, il polline se non ben conservato può subire variazioni delle proprietà biologiche e nutrizionali.

5.1 Contenuto di prolina libera e totale, aminoacidi liberi e totali e loro rapporti

Attraverso prove preliminari è stato analizzata la procedura di liofilizzazione su il polline di castagno del 2014, allo scopo di identificare il migliore trattamento da effettuare successivamente nei campioni di salice. Visto che i trattamenti sono stati condotti a tempi e temperature diverse, è stato interessante capire ad ogni trattamento come variava il contenuto di prolina libera, di aminoacidi liberi e il rapporto tra prolina libera e aminoacidi, che sono i parametri standard per considerare il polline un prodotto correttamente disidratato e commercializzabile.

Dall'analisi dei risultati si nota che tutti i campioni liofilizzati, quindi L9 (liofilizzato 9 ore), L7 (liofilizzato 7 ore), L4,5 (liofilizzato 4 ore e mezzo ma con una massa iniziale di 47,93 g) , L4,5bis (liofilizzato 4 ore e mezzo ma con una massa iniziale di 82,85 g) hanno un contenuto di prolina maggiore del campione fresco, questo risultato è indice di processi di *drying* avvenuti correttamente. Per quanto riguarda la prolina totale si ha un incremento in tutti i campioni trattati, tranne che nel campione L4,5- bis. Questo dato è anomalo, ma anche il contenuto di prolina libera mostra un valore molto basso rispetto agli altri campioni.

Tutti i campioni analizzati hanno mostrato un contenuto di aminoacidi liberi maggiore di 2,5 g su 100 g su ps che appunto è indice di un corretto processo di drying. Il campione L9 è quello che rispetto a tutti gli altri mostra un contenuto maggiore di aminoacidi liberi, raggiungendo il valore di 41,50 mg/g di sostanza secca mentre, il campione L4,5 bis ha un contenuto più basso di 34,48 g di sostanza secca, comunque un valore sempre superiore alla soglia. Tutti i campioni trattati hanno quindi un contenuto minimo di 2 g su 100 g di aminoacidi liberi, valore che determina la qualità del polline commercializzato.

Per quanto riguarda gli aminoacidi totali, il campione L7 è quello che ha un valore di aminoacidi totali più alto di tutti, mentre il campione L9 ha un contenuto di aminoacidi totali leggermente più basso ma comunque abbastanza simile.

Il contenuto di aminoacidi totali non riveste comunque una così grande rilevanza ai fini di determinare la qualità del polline, che invece dipende dal contenuto degli aminoacidi liberi e tra tutti questi trattamenti il campione liofilizzato per 9 ore sembra avere caratteristiche qualitative migliori.

Infine analizzando il dato del rapporto tra prolina libera e aminoacidi liberi, il campione L9 mostra un valore del 63 % che rappresenta il valore più basso, quindi questo trattamento riesce a garantire un alto valore biologico al polline.

Alla luce di tutte queste analisi effettuate, il trattamento di liofilizzazione per 9 ore è stato scelto come trattamento migliore ed è stato utilizzato anche sui campioni di polline del salice che sono stati inoltre sottoposti a ulteriori trattamenti (microonde, essiccazione in stufa e disidratazione commerciale) per individuare quali fossero quelli in grado di preservare nel miglior modo possibile le caratteristiche qualitative e nutrizionali del polline.

Dalle analisi della prolina libera si nota che il campione di polline secco di salice (S) ha subito un trattamento di *drying* molto forte, come si evidenzia dal valore di prolina molto alto significativamente diverso da tutti gli altri campioni. Il polline fresco commerciale (Ccom) mostra un contenuto in prolina leggermente inferiore al campione S, ma comunque significativamente diverso. Al contrario il campione L0 (liofilizzato per 9 ore) si nota che non mostra un aumento della quantità di prolina libera rispetto al controllo.

Il polline di salice ha evidenziato una quantità di prolina libera e totale ridotta rispetto a quella del castagno. La composizione aminoacidica del polline è influenzata da fattori esterni ed interni, fra cui essenzialmente la tecnica di conservazione, e la composizione florale (Standifer et al., 1980).

Analizzando il contenuto di prolina totale, che comunque è meno interessante al fine di valutare la qualità del polline, si nota, anche in questo caso, come il campione secco S del salice abbia una quantità di prolina totale maggiore di tutti gli altri campioni indicando di aver subito un trattamento di drying più forte. Anche in questo caso il campione liofilizzato contiene una quantità di prolina totale molto bassa, praticamente uguale al controllo. Allo stesso modo il campione sottoposto a trattamento a microonde (Mw) non sembra subire un aumento del contenuto di prolina.

Analizzando il contenuto di aminoacidi totali, si vede come il campione fresco commerciale abbia il valore più alto che supera il 2,5 %. I campioni secco e liofilizzato hanno valori significativamente uguali che superano il range di 2,5 %. Il campione che non è accettabile, da un punto di vista commerciale, è quello che ha subito il trattamento al microonde, poiché è sotto la soglia dei 2 g su 100 g di sostanza secca di aminoacidi liberi.

La quantità di aminoacidi totali non rientra tra i parametri di qualità del polline, è comunque interessante notare come il loro contenuto sia molto alto nel campione secco e, si riduca nel commerciale e nel trattato con microonde, per poi raggiungere valori molto bassi nel campione liofilizzato. Comunque la quantità resta sempre dello stesso ordine di grandezza di circa 220/250 mg/g di sostanza secca.

Infine analizzando il rapporto tra prolina libera e aminoacidi liberi è interessante notare che tutti i campioni riescono a rimanere sotto la soglia del 65%; Dall'analisi di tutti questi parametri si evidenzia come il polline secco del salice, cioè che è stato disidratato per 60 minuti alla temperatura di 40-45°C, abbia risentito di più del processo di drying, poiché ha un contenuto di prolina libera e soprattutto totale molto superiore rispetto agli altri campioni.

Nonostante ciò risulta un prodotto commerciabile sia per la quantità di aminoacidi liberi che per il rapporto prolina libera/aminoacidi liberi.

Non risulta invece idoneo alla vendita il campione sottoposto a trattamento al microonde, poiché ha mostrato un contenuto troppo basso di aminoacidi liberi, probabilmente a causa di una loro degradazione.

È stata inoltre valutata la shelf-life di un mese del polline liofilizzato (L1), i dati indicano che la prolina libera tende a diminuire leggermente, evidentemente questo è dovuto a una degradazione della prolina nel tempo, che potrebbe aver interessato la catena laterale dell'amminoacido, costituita da un gruppo imminico. Per quanto riguarda la presenza degli aminoacidi liberi, nel campione L1 è evidente, anche in questo caso, una leggera riduzione del contenuto di aminoacidi liberi. Considerando che questo parametro era già piuttosto basso nel campione liofilizzato (L0), un mese di conservazione ha quindi determinato una riduzione

del contenuto di aminoacidi liberi sotto la soglia di 2 g su 100 g, quindi a livello commerciale non risulta un polline di qualità.

Nel campione L1 si nota che il valore del rapporto tra prolina libera su aminoacidi liberi è leggermente aumentato rispetto al campione L0. Comunque questo valore si mantiene sotto la soglia del 65%.

Analizzando tutti i parametri, il campione liofilizzato con shelf life (L1) risulta essere un polline non ottimale ai fini della commercializzazione perché ha un valore di aminoacidi liberi troppo basso rispetto agli standard di qualità richiesti.

Le analisi effettuate sul polline di castagno sottoposto a diversi trattamenti a microonde hanno dimostrato che il contenuto di prolina libera non cambiava statisticamente né fra di loro né rispetto al controllo. Questo significa che il trattamento a microonde è un trattamento di drying efficace, poiché questi campioni non manifestano un eccessivo contenuto di prolina derivante da una possibile conversione dall'acido glutamico. Questo dato è in accordo con quanto precedentemente riportato per i campioni di salice, sottoposti al trattamento a microonde.

La prolina totale, aumenta soltanto nel campione 1 trattato con 150 W per 30 minuti, mentre nei campioni 2 (200 W per 10 minuti) e 4 (200 W per 30 minuti) si osserva una diminuzione rispetto al controllo. Infine si nota un'ulteriore diminuzione del contenuto di prolina totale nel campione 3 (220 W per 20). Probabilmente questi trattamenti non influenzando l'attività dell'enzima glutammato-deidrogenasi, non inducono una conversione dall'acido glutammico in prolina.

Analizzando il contenuto di aminoacidi liberi, tutti i valori dei campioni trattati con le microonde sono significativamente uguali, quindi il trattamento a sembra preservare le caratteristiche del polline fresco, i campioni trattati con potenza 200 W per 10 minuti e 200 W per 20 minuti hanno però un contenuto di aminoacidi liberi leggermente sotto la soglia dei 2,5 g su 100 g. Inoltre il contenuto di aminoacidi totali si abbassa leggermente nel campione 200 W per 20 minuti, in accordo con la diminuzione anche degli aminoacidi liberi.

In ultima analisi è interessante notare il valore del rapporto tra prolina libera e aminoacidi liberi. È possibile constatare che la maggioranza dei campioni che

sono stati sottoposti al trattamento al microonde hanno un rapporto maggiore del 65%, tranne nei campioni trattati a 200 W per 20 minuti e a 150 W per 30 minuti, per i quali il rapporto è leggermente sotto la soglia.

Analizzando il campione di salice che era stato sottoposto al trattamento al microonde, alla potenza di 220 W, si nota come questo abbia un valore decisamente più basso ovvero del 42,42 % rispetto al controllo, contro una media leggermente al di sopra del 65%. Si nota quindi quanto sia importante l'origine florale del polline e non tanto il trattamento effettuato.

5.2 Contenuto di rutina

Numerosi studi indicano che la rutina è il composto più identificato tra i flavonoidi gliconici presenti negli estratti di polline.

Gli autori Serra Bonvehì et al., (2001) hanno individuato 13 composti fenolici in polline di api di provenienza spagnola. Tra questi, 7 erano acidi fenolici come acido 3,4-diidrossibenzoico, acido vanillico, acido siringico, acido *p*-cumarico, acido *o*-cumarico, etil estere di acido 4-idrossibenzoico, acido trans-cinnamico e flavonoidi come quercitina, miricetina, kamferolo, isoramnetina e infine rutina.

Altri studi, condotti dagli autori Tomàs-Barberà et al.(1989), mostrano che il polline di api selezionato dalla specie *jara* contiene soprattutto quercitina e isoramnetina-3-glucoside, oltre a una minore concentrazione di miricetina e kamferolo-3-glucoside.

Infine Maruyama et al. (2010) hanno individuato, nel polline di api proveniente dalla Spagna, flavonoidi come kamferolo 3-glucoside, quercitina-7-ramnoside, isoramnetina, kamferolo e rutina.

Il profilo fenolico è caratteristico di ogni specie di polline e si possono, inoltre, evidenziare differenze nella concentrazione. La rutina riveste però particolare importanza, sia perché è stata frequentemente identificata in molti campioni di polline di specie diverse, sia perché sono note le sue proprietà benefiche sull'uomo.

Per queste ragioni, un'alta quantità di rutina presente nel polline conferisce ad esso un elevato valore biologico. È dunque molto importante verificare che, una

volta trattato con idonei processi di *drying*, il polline conservi una quantità minima di rutina.

Infatti gli autori Serra Bonvehi et al., (2001) ritengono che un basso contenuto di rutina è indice di lunghi periodi di stoccaggio ed eccessivo calore applicato al polline durante il processo di *drying*. Questi autori hanno indicato che un polline di buona qualità deve avere un contenuto di rutina di 20 mg su 100g di sostanza secca.

Nel presente studio è stata effettuata un'analisi del contenuto di rutina nel polline di castagno liofilizzato per 9 ore, per 7 ore e per 4,5 ore.

Il campione liofilizzato per 9 ore (L9) è l'unico che mantiene un contenuto di rutina praticamente uguale al controllo, mentre il campione liofilizzato per 4 ore e mezzo (L4,5bis) è quello che presenta una maggiore perdita.

I dati mostrano come la perdita di rutina sia molto più accentuata quando l'umidità residua è superiore; infatti il campione liofilizzato per 9 ore, che ha un contenuto di sostanza secca (misurato mediante stufa) pari all' 84,87 % ha una lieve perdita di rutina sul controllo del 5,04%, mentre il campione liofilizzato per 4,5 ore (L4,5bis) che ha una percentuale di sostanza secca del 79,73 % ha una perdita rispetto al controllo del 73,16 %.

Nonostante siano presenti queste differenze rispetto al campione di controllo, il contenuto di rutina, in tutti i campioni liofilizzati, resta sopra lo standard minimo.

Le analisi sono state ripetute a distanza di una settimana sia per il campione liofilizzato 9 ore, cioè quello che aveva minore contenuto di umidità residua, sia per quello a 4,5 ore con maggiore contenuto di umidità residua. I dati hanno confermato che la presenza di un'alta percentuale di acqua sia sfavolevole alla conservazione della rutina, infatti nel campione L4,5 bis si ha una perdita della rutina di circa il 95 %, mentre per il campione L9 solo del 22 % circa. Entrambi i campioni hanno comunque mantenuto una concentrazione di rutina sopra il valore minimo di riferimento.

Successivamente sono stati analizzati i campioni di polline di castagno sottoposti al trattamento a microonde; il trattamento non ha condizionato il contenuto di rutina, infatti i campioni trattati mantengono la stessa concentrazione del polline di castagno di controllo.

In seguito a tali considerazioni, si può dedurre che il trattamento a microonde sia ottimale per preservare la qualità nutrizionale del polline di castagno.

In seguito sono state effettuate le analisi del contenuto di rutina nel polline di salice di controllo, secco, liofilizzato, commerciale e sottoposto a trattamento a microonde. I dati mostrano che per i campioni: trattato a microonde, commerciale, e liofilizzato, il contenuto di rutina resta uguale al controllo, invece per il campione secco si osserva un aumento del contenuto di rutina rispetto al controllo.

Molto probabilmente il campione secco possiede una bassa concentrazione di acqua che riesce a preservare il contenuto di rutina.

Il polline di salice tal quale risulta essere molto povero in rutina; solamente il campione secco contiene una maggiore quantità di rutina, il suo valore è di 0,13 mg/g ss, che si avvicina al valore di 0,2 mg/g ss indicato come valore di buona qualità del polline.

Per il polline di salice è stata valutata anche la variazione della concentrazione di rutina tra il campione liofilizzato e il campione liofilizzato conservato per un mese. Dall'analisi dei dati si nota che la conservazione del campione per un mese comporta un'ulteriore diminuzione del contenuto di rutina. Da questo risultato si può dedurre che il trattamento di liofilizzazione non riesce a preservare nel tempo un composto così importante, che rende il polline un prodotto ad alto valore nutrizionale.

5.3 Contenuto di fenoli e flavonoidi totali

Valutare il contenuto di fenoli e flavonoidi di polline sottoposto a trattamenti è di fondamentale importanza, poichè questi composti stanno assumendo nell'alimentazione umana un ruolo di sempre maggior rilievo. Recenti studi indicano che questi composti sono in grado di ridurre l'incidenza di malattie degenerative come cancro e arterosclerosi (Wei, H., et al., 1990).

Nello studio seguente è stato valutato se il polline di castagno, sottoposto a trattamenti a microonde per tempi e temperature diverse, subiva una diminuzione nel contenuto di fenoli rispetto al campione di controllo. I risultati hanno dimostrato che i trattamenti al microonde non inducono una riduzione del

contenuto di fenoli. Questo trattamento riesce dunque a preservare le caratteristiche nutraceutiche del polline.

Per quanto riguarda il contenuto di flavonoidi, si osserva che anche in questo caso i campioni trattati al microonde non subiscono una variazione della concentrazione di questi composti. Tra i vari trattamenti a microonde, quello condotto a 150 W per 30 minuti e quello a 200 W per 30 minuti, risultano i migliori a preservare le caratteristiche del polline, infatti questi campioni mostrano un maggiore contenuto sia in fenoli che flavonoidi. Invece il campione di polline trattato a 200W per 10 minuti, sebbene mostri elevati contenuti di fenoli, si impoverisce leggermente di flavonoidi.

Analizzando i campioni di polline di salice fresco, commerciale, liofilizzato, secco e trattato al microonde, si nota come il contenuto di fenoli subisca una variazione. Si nota che il campione commerciale e il liofilizzato non subiscono una diminuzione del contenuto di fenoli rispetto al controllo, mentre il campione secco, ma soprattutto quello trattato al microonde, subiscono una forte diminuzione del contenuto fenolico.

Il trattamento a microonde quindi, non sembra essere adeguato per polline di salice, poiché si osserva una forte diminuzione del contenuto di flavonoidi.

È stato inoltre confrontato il contenuto dei fenoli tra il campione di polline di salice liofilizzato e quello liofilizzato conservato per un mese. Si può notare che il contenuto dei composti fenolici diminuisce nel tempo. Questi composti subiscono probabilmente una degradazione, a causa del contenuto d'acqua ancora abbastanza alto nel campione liofilizzato.

Le analisi del contenuto di flavonoidi nel polline di salice, sono state condotte diversamente, rispetto alle analisi del contenuto di fenoli. È stato valutato il contenuto dei flavonoidi nel salice di controllo, nel campione commerciale e nel liofilizzato. Dai risultati emerge che il contenuto di flavonoidi non varia nei campioni trattati rispetto al controllo; quest'ultimo dato conferma che i trattamenti di liofilizzazione e di essiccazione condotta commercialmente non degradano i composti fenolici.

6. CONCLUSIONI

Le analisi effettuate nel corso di questo studio hanno avuto l'obiettivo di valutare se il polline di castagno e di salice, sottoposti a differenti trattamenti di conservazione, siano in grado di preservare le caratteristiche di qualità e mantenere, anche dopo il trattamento, quegli elementi bioattivi fondamentali per la nutrizione umana.

È interessante notare che la qualità nutrizionale del polline può essere valutata sotto due principali aspetti: quello del contenuto proteico, in grado di apportare all'organismo gli aminoacidi necessari per "la costruzione" dell'organismo e quello della presenza di sostanze antiossidanti.

Il primo aspetto è interessante sia dal punto di vista nutrizionale, poiché il polline è in grado di apportare una quantità giornaliera proteica pari ad altri alimenti ricchi in proteine, quali uova e carne, sia dal punto di vista nutraceutico. L'analisi del contenuto proteico ci permette di sapere se il polline è fresco o no, cioè da quanto tempo sia stato sottoposto a trattamenti e quanto sia commercializzabile.

Dall'altro lato, l'analisi del contenuto dei polifenoli ci indica se il polline trattato sia realmente una fonte di sostanze antiossidanti e quindi possa rientrare nella categoria di quegli alimenti funzionali che sono in grado di apportare composti bioattivi una volta ingeriti con la dieta.

L'insieme dei risultati ottenuti ha permesso di evidenziare che il polline, appartenente a specie di fiori diverse, ha caratteristiche differenti come era possibile immaginare.

Per il polline di castagno:

- la **liofilizzazione condotta a 9 ore** mantiene un contenuto di aminoacidi liberi abbastanza alto e sopra gli standard di qualità, inoltre esso conserva alto anche il rapporto di prolina sugli aminoacidi liberi. Questo trattamento risulta essere in grado di preservare il valore biologico del polline.
Inoltre, mediante questo trattamento, il contenuto di rutina si mantiene su un valore alto, superiore alla quantità minima necessaria per considerare il polline di qualità nutrizionale.
- il **trattamento al microonde** è un trattamento di *drying* non forte poiché non induce un aumento di prolina libera nei vari campioni; il contenuto di

aminoacidi liberi raggiunge valori accettabili in tutti i trattamenti. Il trattamento condotto a 200 W per 20 minuti risulta essere poco idoneo perché fornisce un contenuto di prolina libera su aminoacidi liberi troppo elevato.

Per questi campioni anche la quantità di rutina si mantiene abbastanza elevata, leggermente inferiore al controllo, ma comunque accettabile per la commercializzazione.

Anche i fenoli e flavonoidi non subiscono forti diminuzioni, i campioni trattati a 150 W per 30 minuti e a 200 W per 30 minuti sembrano quelli in grado di mantenere di più le caratteristiche nutrizionali del polline.

- dall'analisi di tutti questi parametri, i processi a microonde e la liofilizzazione a 9 ore risultano essere trattamenti in grado di preservare le caratteristiche qualitative del polline di castagno.

Il polline di salice è stato sottoposto a diversi trattamenti di conservazione, è comunque una matrice che ha un contenuto aminoacidico e di rutina inferiore rispetto al castagno, dalle analisi è stato evidenziato che:

- il campione essiccato è quello che ha subito il processo di drying più forte. Per quanto riguarda il contenuto di aminoacidi liberi, la maggioranza dei campioni supera quella soglia minima che rende il polline un prodotto di buona qualità, solo il campione sottoposto al trattamento a microonde non risulta accettabile.

L'analisi del rapporto tra prolina libera e aminoacidi liberi, ha indicato che tutti i campioni trattati hanno valori conformi per la commercializzazione.

- l'analisi della shelf life del polline di salice liofizzato per 1 mese ha indicato che nel tempo si ha una riduzione della prolina libera e degli aminoacidi liberi. Questo valore e quello del rapporto tra prolina libera e aminoacidi liberi sono accettabili.
- il contenuto di rutina nella maggioranza dei campioni di salice trattati non diminuisce rispetto al controllo, ma resta uguale. Solo nel campione secco si ha un aumento di rutina. Il polline di salice è molto povero in rutina e osservando questo parametro non può essere considerato un polline ad elevato valore biologico. Ha dato risultati poco soddisfacenti la

valutazione della shelf life, infatti in 1 mese il contenuto di rutina nel campione liofilizzato diminuisce.

- il contenuto di fenoli non è variato nei vari campioni trattati, mentre i flavonoidi nel campione secco e nel trattato a microonde sono diminuiti.

Considerando complessivamente questi risultati è interessante notare che, il trattamento **al microonde** sia un processo molto efficace per preservare le proprietà nutrizionale del polline di castagno, può influire negativamente su alcuni parametri di qualità del polline di salice quali il contenuto di flavonoidi e di aminoacidi liberi. È necessario quindi, individuare per ogni specie di polline i trattamenti più idonei in grado di preservare le caratteristiche biologiche e nutrizionali.

Ci sono numerose differenze tra i vari pollini nel contenuto aminoacidico e nel profilo fenolico, che dipendono principalmente dall'origine florale.

In questo studio è stato rilevato che il polline fresco di castagno, ha un contenuto di rutina e flavonoidi più alto rispetto al polline di salice, quindi in grado di apportare maggiore valore nutrizionale alla dieta.

Il polline di salice risulta essere molto suscettibile ai vari trattamenti di conservazione. Sarà necessario effettuare ulteriori analisi sul contenuto fenolico per individuare quei trattamenti in grado di ridurre al minimo la perdita di questi composti.

Al fine di commercializzare un prodotto di buona qualità ed alto valore biologico sarà necessario considerare quali siano le specie di polline più diffuse e più facilmente recuperabili, ed individuare per ognuna i trattamenti migliori, in grado di preservarne le caratteristiche nutrizionali e nutraceutiche.

7. BIBLIOGRAFIA

Abreu, M. (1992). El polen como alimento en la nutriciòn humana. *Alimentaria*, 235, 45-46.

Ames B. N., Shigenaga M. K. (1992). Oxidants are a major contributor to aging. *Ann. N.Y. Acad.*, 663: 85-96.

Balustraitė, V., Venskutonis, P. R., Ceksteryte, V. (2007a). Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S.-aureus* and *S.-epidermis*. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (2): 201-208.

Barbolan A., Zorro L., Guillen D., Barroso C. (2003). Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography library*, A. 1012, 31.

Barnaulov, O. D., Machineva O. A., Kamissarenko, N. F. (1983). Comparative evaluation of the effect of some flavonoids on change in the gastric wall of reserpine treated or immobilized mice. *Khimiko-Farmatserticheskii Zhurnal*, 17, 946-951.

Bell, R. R., Thornber, E. J., Seet, J. L. L., Groves, M. T., HO, N. P., Bell, D. T. (1983). Composition and protein quality of honey bee collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. *Journal of Nutrition*, 113 (12:): 2479-2484.

Britikov, E. A., Musatova, N. A. (1964). Accumulation of free proline in pollen. *Fiziol. Rast.*, 464-472.

Campos, M. G., Markham, K., Cunha, A. (1997). Bee-pollen: composition, properties and applications. In Mizrahi, A. (Ed) Bee products. *Plenum publishing Company*, London, UK. 93-100.

Campos, G. R., Frigerio C., Lopes J., Bogdanov, S. (2010). What is the future of Bee-Pollen. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science* 2 (4):131-144.

Campos, G. R., Bogdanov, S., Bicudo L., Szczesna T. (2008). Pollen Composition and standardization of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47(2): 156-163

Campos, M. G., Bogdanov, S., de Almeida – Muradian, L. B., *et al.* (2008). Pollen composition and standardization of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, vol. 47, no. 2, pp.154-161.

Cantero, G., Campanella, C., Mateos, S., Cortes, F., (2006). Topoisomerasi II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoide luteolin and quercitin. *Mutagenesi*, 21(5), 321-325.

Carpes, S. T., Begnini, R., De Alencar, S. M., Masson, M. L. (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciencia e Agrotecnologia* 31 (6): 1818- 1825.

Chauvin, R. (1968). Action physiologique et therapeutique des produits de la ruche Traite de biologie de l'abeille, Masson; 116-154.

Collin, S., Vanhavre, T., Odart, E., Bouseta, A. (1995). Heat treatment of pollens: impact on their volatile flavor constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 444 – 448.

Cometto, P. M., Faye, P. F., Di Paola Naranjo, R., Rubio, M. A., Aldao, M. A. J. (2003). Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian Religions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5079-5087.

Compos, M., Cunha, A.; MArkham, K. (1998). Inhibition of Virulence *Pseudomonas auruginosa* cultures, by flavonoids isolated from bee-pollen: possible structure-activity relationships. Polyphenol communications 98., XIXth International conference on polyphenols, Lille.

Couto, R. H. L., Couto, A., Apicultura: Manjo e Produtos, Funep, Jaboticabal, Brazil, 3rd edition, 2006. Cuvelier E. Molécules antioxydantes relations structure-activité. Publiée lors des 16^{èmes} Journées Internationales Huiles Essentielles de Digne les Bains, 201-211, (1997).

Csonka, L. N. *et al.* (1988). Nucleotide sequence of a mutation in the proB gene of *Escherichia* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene* 64, 199 – 205.

Delauney, A. J. *et al.* (1993). Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by transcomplementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *Journal of biological chemistry*, 268, 18673-18678.

Deprez S., Brezillon C., Rabot S., Philippe C., Mila I., Lapierre C., Scalbert A. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catalyzed in human colonic microflora into lowmolecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition*, 130: 2733-2736.

Dodov, I. A., Starodub, N. F., (1994). Antioxidant system of rat erythrocytes under conditions of prolonged intake honeybee flower pollen load. *Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal*, 66 (6): 94 – 96.

Franchi, G., Corti, P., Pompella, A. (1997). Microspectoscopic evaluation of digestibility of pollen grains. *Plant Foods for Human Nutrition* 50 (2): 115 – 126.

Gonzalez Paramás A.M., Bárez Gomez A. J., Marcos, C. C.; Garcia-Villanova R. J., Sanchez Sanchez J., (2006) HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry* 95 (2006) 148-156.

Grünfeld, E., Vincent, C., Bagnara, D. (1989). High-performance liquid chromatography analysis of nectar and pollen of strawberry flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 290-294.

Guo, R., Wei, P., Liu, W. (2007). Combined antioxidant effects of rutin and Vitamin C in Triton X-100 micellar solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1580-1586.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.

Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Science* 8: 950-988.

Haudecoeur, E. *et al.* (2009). Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106,14587 – 14592.

Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3): 67-202.

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Venema, (1992). D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in

vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 40, 1591 – 1598.

Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J. A., Briggs, C. J. (2007). Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 40, 356-364.

Muniategui, S., Sancho, M. T., Huidobro, J. F., Simal, J. (1991). Determinación de la frescura del polen apícola manufacturado. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31, 265-271.

Kedzia, B., Holderna –Kedzia, E. (2005). Biological properties and therapeutic action of bee pollen. *Postepy Fitoterapii*, vol.3-4, pp. 103 – 108.

Kiyosue, T. *et al.* (1996). A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration. *Arabidopsis, Plant Cell* 8,1323-1335.

Kim D., Chun O. K., Kim Y. J., Moon H-Y., Lee C. Y., (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6509.

Magnè C., Lahrer F., (1992) High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical biochemistry* **200**, 115-118 (1992).

Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H. (2010). Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus sp.* Of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 1-11.

Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Tanoue, Y., Kai, Nagashima T. (2007). Antihypertensive activities of enzymatic hydrolysates from honeybee-collected pollen of *Cistus ladaniferus*. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 5 (3-4): 86-89.

Negro, C., Miceli, A. (2011). Metaboliti secondari e proprietà nutraceutiche. Caratteristiche nutraceutiche di alcune specie vegetali salentine.

Pereira, F. M., Freitas, B. M., Vieira Neto, J. M., Lopes, M. T. R., Barbosa, A. L., de Camargo, R. C. R. (2006). Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 41, no. 1, pp. 1-7.

Peris, J. (1984). Produccion y comercio de los productos apícolas en Espana. El campo del banco de Bilbao. *Apicultura* 93.

Petty, S., Scully, C. (2009). Polyphenolo, oral healt and disease: A review. *Journal of dentistry*, 37: 413-423.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53 (10): 4290-4302.

Rimbler, R. (2003) Von Bienen gesammelte Blütenpollen: Eigenschaften und Verwendung. *Ärztzeitschrift für Naturheilverfahren*. 44 (3): 158 - 165.

Roulston, T. H., Cane, J. H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222 (1- 4): 187 – 209.

Rosane, W. I., Oliveira, Z. D., Fernandes, S.C. Vieira, I.C. (2006). Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 366-372.

Rutin and flavonois contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 40, 356-364.

Serra-Bonvehi, J., Escola Jorda, R. (1997). Nutrient composition and microbiological quality of honey bee collected pollen in Spain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* , 45:725-732.

Stanley, R.G., Linskens, H.F., 1974. Pollen. Berlin, Springer.

Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H., Chmielewski, W. (2002). Sugar composition of pollen loads harvested at different periods of the beekeeping season. *Journal of Apicultural Science*, 46(2):107-115.

Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H., Chmielewski, W. (1999). Effect of infestation of pollen loads with acarid mites on amino acid content and organoleptic characteristics of the product. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 43:235-245.

Stanley, R. G., Linsken, H. F. (1974). Pollen: biology, biochemistry, management. *Springer-Verlag*; Berlin, Heidelberg.

Solberg, Y., Remedios, G. (1980). Chemical composition of pure and bee collected pollen. *Scientific Reports Agricultural*, Univesity, Norway 58 (18): 2-12.

Szczesna, T. (2006). Long chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, vol.50, no.2, pp.65-79.

Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H. (1998). Some properties of honey bee collected pollen, In Polnisch-Deutsches Symposium Salus Apis Mellifera, new demands for honey bee breeding in the 21st century. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe* 42 (2): 79-80.

Solberg, Y., Remedios, G. (1980). Chemical composition of pure and bee – collected pollen. *Scientific Reports of Agricultural*, The University of Norway: Oslo, No.59.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary Intake Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2073S-2085S.

Schmidt, J. O., Schmidt, P. J. (1984). Pollen digestability and its potential nutritional value. *Gleanings in Bee Culture*, 320-322.

Slijepcevic, M., Nadzija, M., Blazi-Poljak, M. (1978). Impact of the pollen contained in food on the reproduction of mice IIIème Symposium international d'apithérapie, Apimondia; Bukarest; pp 251-253.

Stanley, R. G., Linskens, H. F. (1974). Pollen. *Biology Biochemistry Management*. Springer – Verlag, Berlin, 230 – 246.

Szoke, A. *et al.* (1992). Subcellular location of delta – pyrroline -5-carboxylate reductase in root/module and leaf of soybean. *Plant Physiol*, 99,1642-1649.

Tichy, J., Novak, J. (2000). Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridians streptococci. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 6 (5): 383-389.

Tomas-Lorente, F., Garciagrau, M.M., Nieto, J.L., Tomas-Barberan, F.A., (1992). Flavonoids from *Cistus-Ladanifer* bee pollen. *Phytochemistry* 31, 2027-2029.

Wang, J., Li, S. H., Wang, Q. F., XIN, B. Z., Wang, H. (2007). Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. *Journal of Medicinal Food*, 10 (2): 276-280.

Wang, H., Cao, R. L., Prior, J. (1996). Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 701-705.

Webster, R.P., Gawde, M. D., Bhattacharya, R. K. (1996). Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Letters*, 109, 185-191.

Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., Birt, D. F. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res.* **1990**, 50, 499-502.

Witherell, P. (1975). Other products of the hive. In *The hive and the honey bee* (pp.34-66). Hamilton, IL: Dadant & Sons Inc.

Xie, Y., Wan, B., Li, W. (1994). Effect of bee pollen on maternal nutritio and fetal growth. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Bao*, 25 (4): 434 437.

Zhou, J. F., Cai, D., Zhu, Y. G., Yang, J. L., Peng, C.H. (2000). A study on relationship of nitric oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole – cystitis. *World Journal of Gastroenterology*, 6 (4): 501-507.

Sitografia:

www.apitalia.it

www.mieliditalia.it

www.apas.com

Libri di testo:

Contessi Alberto- Le api- edizioni agricole

Maffei Massimo- Metabolismo e prodotti secondari delle piante- UTET libreria

Pasqua Gabriella, Giovanna Abbate, Cinzia Forni- Botanica generale e diversità vegetale II edizione -Piccin

Voet Donald e Judith Voet- Fondamenti di biochimica- Zanichelli

8. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la mia relatrice, la Professoressa Annamaria Ranieri e il correlatore il Dottor Angelo Canale.

I miei ringraziamenti vanno inoltre alla Dottoressa Antonella Castagna e alla Dottoressa Cristina Sgherri.

Ringrazio la mia famiglia che mi ha sempre sostenuto e incoraggiato in questo lungo percorso e i miei più cari amici sempre al mio fianco.