



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**  
**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**DETERMINAZIONE, MEDIANTE SPETTROSCOPIA NMR, DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA  
NEL MIELE COME INDICATORE DI AUTENTICITA'**

**RELATRICE:** Prof.ssa Elisabetta Schievano

**CONTRORELATORE:** Prof. Marco Bortolus

**LAUREANDA:** Sorgente Martina

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# INDICE

RIASSUNTO .....	I
ABSTRACT .....	III
1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 IL MIELE .....	1
<b>1.1.1 Storia ed importanza economica</b> .....	2
<b>1.1.2 Produzione</b> .....	4
<b>1.1.3 Composizione chimica</b> .....	6
<b>1.1.4 Frodi alimentari relative al miele</b> .....	10
1.2 GLI ENZIMI .....	12
<b>1.2.1 Glucosio ossidasi</b> .....	12
<b>1.2.2 Invertasi</b> .....	12
<b>1.2.3 Diastasi</b> .....	14
<b>1.2.4 Importanza dell'attività enzimatica del miele</b> .....	14
1.3 METODI DI ANALISI DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA.....	17
<b>1.3.1 Determinazione dell'attività dell'invertasi</b> .....	17
<b>1.3.2 Determinazione dell'attività della Diastasi</b> .....	18
1.4 SCOPO DEL PROGETTO .....	22
2. SPETTROSCOPIA NMR .....	25
2.1 INTRODUZIONE ALLA TECNICA .....	25
<b>2.1.1 Chemical Shift</b> .....	27
<b>2.1.2 Accoppiamento scalare</b> .....	28
2.2 ESPERIMENTO FT-NMR .....	29
2.3 SEQUENZA $g_e$ -DPFGSE-VT-CSSF-TOCSY .....	31
<b>2.3.1 Impulsi selettivi</b> .....	31
<b>2.3.2 Impulsi di gradienti</b> .....	31
<b>2.3.3 Filtro CSSF</b> .....	32

3.PARTE SPERIMENTALE .....	35
3.1 CAMPIONI DI MIELE.....	35
3.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI UV-Vis .....	36
<b>3.2.1 Soluzioni UV-Vis per Invertasi</b> .....	36
<b>3.2.2 Soluzioni UV-Vis per Diastasi</b> .....	37
3.3 ANALISI NMR.....	38
<b>3.3.1 Preparazione delle soluzioni di miele</b> .....	38
<b>3.3.2 Temperature di lavoro</b> .....	38
<b>3.3.3 Parametri di acquisizione degli spettri</b> .....	38
3.4 CALCOLO DELL'INCERTEZZA.....	39
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	41
4.1 MESSA A PUNTO DEL METODO CON SPETTROSCOPIA NMR.....	41
<b>4.1.1 Inattivazione degli enzimi</b> .....	42
<b>4.1.2 Scelta dei tempi di reazione</b> .....	44
4.2 ACQUISIZIONE DEGLI SPETTRI 1D- <sup>1</sup> H-NMR DEL MIELE.....	45
<b>4.2.1 Problema dell'erlosio</b> .....	48
4.3 RISULTATI DELLE ANALISI CON SPETTROSCOPIA NMR .....	54
<b>4.3.1 Misure ripetute</b> .....	54
<b>4.3.2 Valori di attività enzimatica ottenuti con analisi NMR</b> .....	55
4.4 RISULTATI DELLE ANALISI UV-Vis PER L'INVERTASI.....	56
<b>4.4.1 Misure ripetute</b> .....	56
<b>4.4.2 Valori di attività dell'invertasi ottenuti con analisi UV-Vis</b> .....	57
4.5 RISULTATI DELLE ANALISI UV-Vis PER LA DIASTASI.....	58
<b>4.5.1 Misure ripetute</b> .....	58
<b>4.5.2 Valori di attività della diastasi con analisi UV-Vis</b> .....	59
4.6 CONFRONTO TRA DATI UV-Vis E LA LETTERATURA.....	60
<b>4.6.1 Mieli di Acacia</b> .....	60

4.6.2 Mieli di Agrumi .....	61
4.6.3 Mieli di Tarassaco .....	61
4.6.4 Mieli di Rododendro .....	62
4.6.5 Mieli di Tiglio.....	62
4.6.6 Mieli di Girasole .....	63
4.6.7 Mieli di Castagno.....	63
4.6.8 Mieli di Melata.....	64
4.7 CORRELAZIONI TRA I DATI UV-Vis ed NMR PER ORIGINE BOTANICA .....	65
4.8 CORRELAZIONI TRA I DATI UV-Vis e NMR CON TUTTI I CAMPIONI DI DIVERSA ORIGINE BOTANICA .....	69
4.8.1 Invertasi.....	69
4.8.2 Diastasi .....	72
4.9 ANALISI DI CAMPIONI DI MIELE SOSPETTI .....	73
4.9.1 Parametri determinati dall' analisi NMR dei mieli .....	75
4.9.2 Analisi di tre casi studio.....	76
5. CONCLUSIONI.....	87
6. BIBLIOGRAFIA.....	89

## RIASSUNTO

Nel mondo globalizzato e ricco di scambi commerciali in cui viviamo è diventato di fondamentale importanza il tema della sicurezza e qualità dei prodotti alimentari; infatti, i casi di frode sono numerosi e sempre più difficili da determinare grazie alla continua innovazione tecnologica. Il miele non si sottrae a problematiche di questo tipo, soprattutto perché i dati recenti mostrano che in Unione Europea la produzione interna non riesce a far fronte ai consumi della popolazione, e il tasso di importazione da Paesi come la Cina è in costante aumento negli anni.

Gli enzimi sono molto sensibili a trattamenti termici, cattiva conservazione, e anche alle più comuni fonti di adulterazione; quindi, rappresentano un parametro fondamentale nella determinazione della freschezza e qualità del miele. Ad oggi l'attività enzimatica viene determinata con metodi basati su spettrofotometria UV-Vis, che però richiedono tempi lunghi o l'utilizzo di reattivi costosi; lo scopo del lavoro di tesi è stato quindi quello di mettere a punto un nuovo protocollo per calcolare l'attività di diastasi e invertasi, che fosse basato sull'osservazione del calo di saccarosio e maltosio nel tempo attraverso l'utilizzo della spettroscopia NMR. Dal successivo confronto dei dati ottenuti dall'analisi di quaranta campioni di miele con entrambe le metodologie, è stata ottenuta una correlazione lineare che permette di esprimere l'attività enzimatica determinata con spettroscopia NMR nelle unità di misura previste dalle normative vigenti.

Infine, il protocollo proposto è stato applicato a diversi campioni sospetti di frode, tra i quali sono stati scelti tre casi-studio per evidenziare come la determinazione dell'attività enzimatica, insieme ai dati estratti dagli spettri in cloroformio e in acqua, possa dare un'indicazione affidabile del tipo di illecito messo in atto.



# ABSTRACT

In the globalized and trade-rich world in which we live, the issue of food safety and quality has become of paramount importance; in fact, cases of fraud are numerous and increasingly difficult to determine due to continuous technological innovation. Honey does not escape such issues, especially since recent data show that in the European Union, domestic production cannot meet the population's consumption, and the rate of imports from countries such as China has been steadily increasing over the years.

Enzymes are very sensitive to heat treatment, poor storage, and even the most common sources of adulteration; therefore, they are a key parameter in determining the freshness and quality of honey. To date, enzyme activity is determined by methods based on UV-Vis spectrophotometry, but these are time-consuming or require the use of expensive reagents; therefore, the purpose of this thesis work was to develop a new protocol to calculate diastase and invertase activity, which was based on the observation of sucrose and maltose decline over time using NMR spectroscopy. From the subsequent comparison of the data obtained from the analysis of forty honey samples with both methodologies, a linear correlation was obtained that allows the enzyme activity determined by NMR spectroscopy to be expressed in the units of measurement required by current regulations.

Finally, the proposed protocol was applied to several samples suspected of fraud, from which three case studies were chosen to show how the determination of enzyme activity, together with spectra in chloroform and water, can give a reliable indication of the type of illicit activity being carried out.





# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL MIELE

Secondo la Direttiva 2001/110/CE dell'Unione Europea, il miele è “una sostanza dolce naturale che le api producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive delle piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare”.

Secondo la stessa normativa il miele ad uso alimentare può essere classificato in base all'origine o in base al metodo di produzione e/o estrazione; comunemente si utilizza la prima delle due, che prevede la distinzione tra miele di fiori (o di nettare), ovvero ottenuto dal nettare delle piante, e il miele di melata, che invece viene ottenuto da sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante. Invece, secondo il metodo di estrazione il miele può essere:

- Miele di favo, se è immagazzinato dalle api negli alveoli opercolati di favi da esse appena costruiti, non contenenti covata; esso viene venduto in favi anche interi;
- Miele con pezzi di favo o sezioni di favo del miele, il quale contiene uno o più parti di miele di favo;
- Miele scolato, ottenuto mediante scoltura dei favi disopercolati, non contenenti covata;
- Miele centrifugato, ottenuto mediante centrifugazione dei favi disopercolati;
- Miele torchiato, ottenuto mediante pressione dei favi non contenenti covata, senza riscaldamento o al massimo con riscaldamento moderato;
- Miele filtrato, ottenuto eliminando sostanze organiche e inorganiche estranee al fine di ottenere l'eliminazione dei pollini.

Per poter essere destinato al consumo umano al miele non può essere aggiunto alcun ingrediente, neppure additivi; inoltre, le sue caratteristiche di composizione devono rispettare parametri piuttosto rigidi, che riguardano soprattutto:

- Tenore di acqua
- Tenore di saccarosio
- Tenore di glucosio e fruttosio
- Tenore di sostanze insolubili in acqua
- Conduttività elettrica
- Acidi liberi
- Indice diastatico
- HMF (idrossimetilfurfurale)

Fa eccezione a tali restrizioni il miele ad uso industriale, il quale è adatto anche ad essere utilizzato come ingrediente per altri prodotti alimentari destinati a lavorazione, e, al contrario di quello ad uso alimentare, può avere anche sapore e odore anomali, avere iniziato un processo di fermentazione o può essere stato surriscaldato.

### **1.1.1 Storia ed importanza economica**

Il miele è stato usato come alimento e come medicamento fin dai tempi più antichi; infatti, ai tempi dell'*Homo Sapiens* esso rappresentava di fatto l'unico dolcificante naturale disponibile. Sumeri e Babilonesi iniziarono ad utilizzarlo anche come sostanza medicale e cosmetica sfruttando le proprietà fisiche del miele; in particolare esso veniva utilizzato per la cura di scottature e ferite, perché permetteva di creare una barriera che, pur mantenendo idratata la ferita, impediva la proliferazione batterica e quindi lo sviluppo di infezioni. Tale utilizzo è rimasto poi in numerose culture delle epoche successive, fino ad arrivare anche ai giorni nostri. Le prime fonti certe di allevamento di api per ottenere il miele si hanno già dall'Antico Egitto, dove gli alveari venivano spostati lungo il Nilo per seguire il naturale succedersi delle fioriture, mentre la larga diffusione in ambito culinario è arrivata con i Greci e i Romani, e si è propagata nei secoli successivi. Per moltissimo tempo il miele è stato l'unico dolcificante utilizzato, almeno fino all'avvento della lavorazione industriale della canna da zucchero nel 1800, ed ancora oggi gode di una importante rilevanza economica.[1][2] Secondo i dati sul mercato del miele, presentati ad aprile 2023 dall'Unione Europea, attualmente l'Europa rimane al secondo posto mondiale per produzione di tale alimento, e il consumo pro-capite medio annuo è di circa 600 g; l'Italia si trova poco

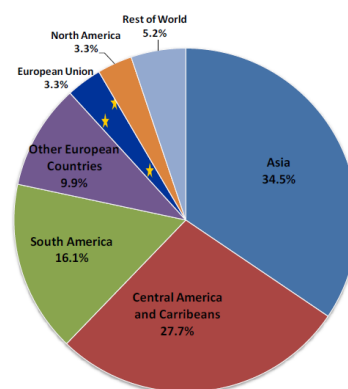
al di sotto con una media di 500 g l'anno, mentre il maggior consumo si ha in Germania, con 1.5 Kg pro-capite l'anno.

Nonostante gli incrementi nel numero di alveari, la produzione di miele in Europa non segue la stessa tendenza, soprattutto per effetto del cambiamento climatico che causa gelate in tarda primavera e siccità in autunno; come conseguenza l'autosufficienza europea arriva al 60%, e non basta quindi a coprire i consumi della popolazione. Queste circostanze, congiunte al fatto che i prezzi delle esportazioni sono maggiori di quelli delle importazioni, fa sì che queste ultime siano maggiori, e che l'Unione Europea si collochi al secondo posto per importazioni di miele, dietro agli Stati Uniti.

	2020	2021	Share of World Production
China	466	486	27%
European Union (27)	230	215	12%
Türkiye	104	96	5%
Iran (Islamic Republic of)	74	77	4%
Argentina	72	71	4%
Ukraine	68	69	4%
India	65	66	4%
Russian Federation	66	65	4%
Mexico	54	62	4%
United States of America	67	57	3%
Brazil	52	56	3%
Canada	38	41	2%
United Republic of Tanzania	31	32	2%
Republic of Korea	30	30	2%
Angola	23	23	1%
Viet Nam	21	22	1%
New Zealand	27	21	1%
Kenya	18	17	1%
Central African Republic	17	17	1%
Uzbekistan	13	14	1%
Ethiopia	13	13	1%
Uruguay	14	13	1%
Thailand	12	12	1%
Other	197	198	11%
	1 774	1 772	

Source : FAO

Figura 1 Dati sulla produzione di miele tra 2020 e 2021



Source : UN Comtrade

Figura 2 Grafico che riporta le percentuali di esportazione mondiale di miele (2021)

Il miele che giunge in Europa proviene principalmente dalla Cina, che è diventata il più grande esportatore mondiale, e ciò apre un tema molto importante, ovvero la qualità dei prodotti che vengono importati, che sono sempre più soggetti a contraffazioni e adulterazioni.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> [https://agriculture.ec.europa.eu/farming/animal-products/honey\\_en](https://agriculture.ec.europa.eu/farming/animal-products/honey_en)

### **1.1.2 Produzione** <sup>[3]</sup>

La produzione del miele comincia con il nettare, una soluzione acquosa di zuccheri, aminoacidi, proteine, lipidi, minerali e altri componenti che viene prodotto dalle cellule nettarine delle piante.

La sua esatta composizione dipende dalla specie botanica e dall'ambiente circostante, ed influenza il sapore e la qualità del miele che ne deriva, specialmente nel caso dei mieli uni-floreali, che sono caratterizzati spesso da un odore e un sapore caratteristico e ben riconoscibile.

I principali zuccheri presenti nel nettare sono saccarosio, glucosio e fruttosio in proporzione molto variabile; alcuni nettari contengono quasi solo saccarosio, mentre altri possono contenere i tre zuccheri in eguale percentuale.

Un'ape operaia può succhiare il nettare e immagazzinarne fino a 25 mg alla fine dell'esofago in una apposita "sacca"; durante questo processo il nettare viene mescolato alle secrezioni delle ghiandole salivare e ipofaringea, la quale grazie agli enzimi presenti permette l'immediato inizio della trasformazione chimica nel nettare.

All'interno dell'alveare poi, il nettare viene trasferito dall'ape operaia che l'ha raccolto alle api operaie più giovani, le quali ripetono più volte questo ciclo di trasferimento del nettare, introducendo così altri enzimi e completando il processo di trasformazione; alla fine il prodotto lavorato viene depositato in una cella, ad esso viene man mano aggiunto altro nettare lavorato fino a quando la cella non risulta piena, e a quel punto essa viene chiusa con la cera (opercolatura dei favi).

Il processo di conversione da nettare a miele richiede globalmente tra 1 e 3 giorni, e può essere visto di fatto come il risultato di due processi fondamentali:

1. La conversione del saccarosio in glucosio e fruttosio, soprattutto ad opera degli enzimi
2. L'evaporazione dell'eccesso di acqua, favorita dal costante flusso di aria prodotto dal moto delle ali delle api.

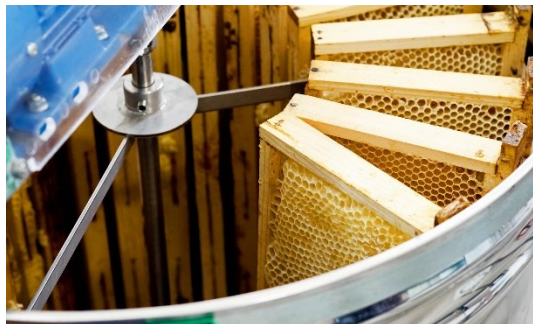
Una volta che il miele è maturo, gli apicoltori procedono con il processo di smielatura, che porta al miele normalmente commercializzato. Tale processo si compone di diverse fasi successive, che a seconda dei volumi di produzione possono essere effettuate con macchinari più o meno automatizzati.

1. Prelievo dei melari
2. Disopercolatura, ovvero la rimozione dello stato di cera che chiude le celle.



**Figura 3** Disopercolatura manuale dei melari

3. Smielatura: fatta con appositi smielatori che sfruttano la forza centrifuga per estrarre il miele dai favi. Questi macchinari permettono di lavorare a freddo, evitando alterazioni del prodotto causate da aumenti di temperatura.



**Figura 4** Macchinario per la smielatura con forza centrifuga

4. Filtraggio: effettuato con apposite reti metalliche a maglie molto fini per l'eliminazione di residui di cera e favo o altro materiale.



**Figura 5** Filtraggio del miele per l'eliminazione di residui

5. Decantazione e schiumatura: il miele viene fatto decantare per un periodo variabile tra i giorni e le settimane, in modo far affiorare le bolle di aria prodotte durante la smielatura, e per permettere ad eventuali altri residui presenti di depositarsi sul fondo o emergere; l'accorpamento dei residui leggeri in superficie produce una schiuma bianca che viene poi rimossa.



Figura 6 Recipienti per la decantazione del miele

6. Confezionamento in vasetti ermetici; tale chiusura è importante perché il miele è un prodotto piuttosto igroscopico, e tende quindi ad assorbire umidità dall'aria, portando al possibile sviluppo di batteri all'interno.

### 1.1.3 Composizione chimica<sup>[4]</sup>

L'esatta composizione chimica del miele dipende dall'origine botanica, dalla regione di produzione e dai metodi di lavorazione, ma esso può essenzialmente essere considerato come una soluzione satura di zuccheri, che arrivano a costituire fino al 80% del totale. Il tenore di acqua invece si attesta normalmente al di sotto del 20%, rendendo il miele scarsamente suscettibile allo sviluppo di batteri se adeguatamente conservato.

Oltre ad una articolata miscela di carboidrati, il miele contiene acidi (sia amminoacidi che acidi organici) enzimi, minerali, vitamine, sostanze aromatiche, pigmenti, e altri composti minori.

#### *Carboidrati*

Dal punto di vista dei carboidrati il miele è un alimento estremamente complesso, con un profilo molto specifico.

In generale, gli zuccheri maggiormente presenti sono glucosio e fruttosio, che insieme rappresentano attorno al 75% del totale presente. Essi sono estremamente importanti

per la definizione di alcune proprietà del miele, tra cui potere dolcificante e consistenza; infatti, il fruttosio tende a rendere il prodotto finale più dolce e più liquido data la sua elevata solubilità in acqua, mentre il glucosio ha un minor potere dolcificante e una maggior tendenza alla cristallizzazione, che avviene sia per effetto dello scorrere del tempo sia per le temperature di conservazione.

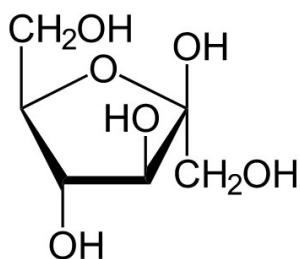


Figura 7 Struttura del fruttosio

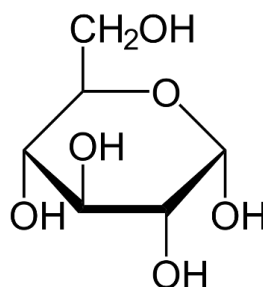


Figura 8 Struttura del glucosio

Oltre ai monosaccaridi citati sono sempre presenti anche disaccaridi come maltosio e saccarosio, ai quali si aggiungono poi tri- e oligo-saccaridi minori, i quali non vanno ad influire sulle proprietà organolettiche del miele, ma sono importanti per aiutare la determinazione della sua origine botanica. Infatti, alcuni di essi, come turanosio, isomaltosio, palatinosio, kojibiosio, nigerosio e maltulosio sono presenti in concentrazioni abbastanza costanti nelle diverse origini botaniche, mentre altri sono caratteristici di particolari tipologie di miele; tra questi si può ad esempio citare l'erlosio, più abbondante in mieli di acacia, rododendro e melata, il melezzitosio, un trisaccaride tipico esclusivamente dei mieli di melata ed il gentiobiosio, esclusivo del miele di tiglio.

### *Acidi organici*

Il principale acido presente nel miele è l'acido gluconico, che viene prodotto per effetto dell'enzima glucosio ossidasi secreto dalle ghiandole delle api; tale acido, oltre che avere un ruolo nell'aroma del miele è anche il maggior responsabile del suo pH, che si attesta mediamente attorno a 3,9.



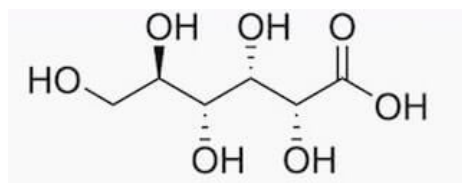


Figura 9 Struttura dell'acido gluconico

L'acidità del miele dipende molto dal tempo che trascorre tra la raccolta del nettare da parte delle api e l'immagazzinamento finale nelle celle dell'alveare, ed è un fattore molto importante da tenere controllato, perché contribuisce alla stabilità del prodotto finale verso i microrganismi.

Infine, gli altri acidi presenti sono il butirrico, acetico, succinico, lattico, maleico, ossalico, malico e formico.

### *Sostanze minerali e vitamine*

Il miele si può definire come un alimento scarsamente fonte di minerali e vitamine, presenti in percentuali molto minoritarie rispetto a tutti gli altri.

I minerali principalmente riscontrabili sono K, Na, Ca, Mg, Cl, S, P, Si, Fe, Mn, e Cu, e le loro quantità sono molto variabili in relazione soprattutto alla regione geografica del miele, in quanto derivano fondamentalmente dall'assorbimento, attraverso la linfa, dei minerali presenti nel terreno.

Per quanto riguarda le vitamine invece, le quantità vengono espresse solitamente in ppm, derivano principalmente dal nettare, e sono appartenenti soprattutto al gruppo delle idrosolubili.

### *Amminoacidi e proteine*

Il miele può in generale essere considerato come un alimento povero di proteine e amminoacidi. Questi ultimi sembrano derivare soprattutto dalle api e le loro secrezioni, e arrivano a costituire l'1% in peso dei componenti del miele; la proporzione dei diversi amminoacidi dipende dall'origine botanica, ma in generale è la prolina quello presente in maggiori quantità.

Per quanto riguarda le proteine, il miele prodotto da *Apis Mellifera* ne contiene generalmente tra lo 0.2 e 1.6%, ma la loro quantità varia anche a seconda del tipo di ape.

## *Aroma e colore*<sup>2</sup>

Una particolare caratteristica del miele è certamente il suo colore, il quale può variare notevolmente con la stagione, la fonte di nettare, e la lavorazione. In generale il colore del miele può essere assimilato come quello di una soluzione di caramello più o meno diluita, ovvero una tonalità ambrata che spazia dal quasi trasparente fino ad un tono molto scuro.

Quello che di solito si nota è che il colore cambia drasticamente da chiaro a scuro passando dai mieli di fioritura primaverile, a quelli estivi, fino alle fioriture più vicine all'autunno. Alcuni esempi sono riportati nella figura 10, dove si può vedere come mieli di acacia, agrumi e tiglio siano molto chiari (primaverili), girasole e tarassaco siano colorati di un giallo crema molto vivo, e invece castagno e melata siano mediamente o molto scuri (autunnali).



**Figura 10** Presentazione dell'aspetto di otto tipologie di miele diversi, da sinistra a destra: acacia, agrumi, tiglio, girasole, castagno, melata, tarassaco, rododendro

Naturalmente è piuttosto difficile identificare con assoluta certezza una tipologia di miele dal suo colore, in quanto esso è influenzato anche dalla presenza e dalla dimensione di eventuali cristalli di glucosio: essi, essendo bianchi, possono riflettere la luce e modificare così il colore rispetto ad un miele più liquido.

Da quali composti chimici derivi esattamente il colore del miele non è perfettamente chiaro; le ipotesi più accreditate riguardano la presenza di composti fenolici e prodotti di reazioni di imbrunimento non enzimatico tra gli amminoacidi e gli zuccheri. Quello che si può dire è che in generale si riscontra che più intenso è il colore e più intenso tende ad essere anche il sapore del prodotto.

---

<sup>2</sup> [https://www.pianaricerca.it/wp-content/uploads/2020/05/brochure-kit\\_2020.pdf](https://www.pianaricerca.it/wp-content/uploads/2020/05/brochure-kit_2020.pdf)

Proprio l'aroma è un altro elemento caratteristico del miele; esso, insieme al sapore è attribuito a composti volatili che comprendono esteri di acidi alifatici e aromatici, aldeidi, chetoni e alcoli. Tra i composti che più sembrano avere odore e sapore di miele c'è la fenilacetaleide, poi però ci sono diversi composti che sono tipici delle particolari origini botaniche.

Le famiglie di odori e aromi usati per descrivere il miele sono sette (vegetale, animale, floreale, fruttato, caldo, aromatico e chimico), e si dividono poi in numerose sottofamiglie; esso può quindi essere descritto da un punto di vista aromatico attraverso una o più di tali famiglie, ad esempio il miele di agrumi è tipicamente floreale, quello di tiglio è aromatico, mentre il castagno è chimico, caldo e animale.

#### **1.1.4 Frodi alimentari relative al miele**

Con il termine “frode alimentare” si indica la produzione, detenzione, commercio, vendita e somministrazione di alimenti non conformi alle leggi vigenti; essa può essere di tipo sanitario, se costituisce una minaccia per la salute del consumatore, oppure commerciale, se lo danneggia economicamente senza arrecare per forza danni alla sua salute. Inoltre, si possono distinguere frodi che alterano la qualità intrinseca dei prodotti (alterazioni, adulterazioni, sofisticazioni) o frodi che riguardano la commercializzazione degli stessi (contraffazione, falsificazione).

Nel caso del miele, ci sono diversi modi con cui tali pratiche illegali vengono messe in atto, soprattutto al fine di abbassare i costi del prodotto e aumentare la produttività degli alveari.

Gli illeciti che si riscontrano più comunemente sono:

- Adulterazione, ovvero la vendita di generi alimentari con caratteristiche diverse da quelle dichiarate;
- Contraffazione, definita come la presentazione di un alimento in modo diverso da come è nella sua costituzione naturale, oppure la creazione di un prodotto ex novo che sia in apparenza analogo a quello originale.

Una prima fonte di adulterazione è rappresentata dall'aggiunta di sciroppi, dalla composizione zuccherina più o meno simile a quella del miele genuino, al fine di diluirlo e renderlo quindi più economico[5]; alcuni possibili esempi di sciroppi utilizzati sono a base di zucchero invertito o ad alto contenuto di fruttosio (HFCS), ma

molti altri se ne potrebbero citare. Un'altra comune pratica è quella di aumentare la produttività degli alveari attraverso il nutrimento forzato delle api, che può anche in questo caso derivare da sciroppi, zucchero invertito e paste di zucchero. Esso è consentito nei mesi invernali per garantire la sopravvivenza degli insetti, tuttavia, la pratica deve essere sospesa prima dell'inizio della produzione del miele, altrimenti diventa un'adulterazione.

Se si parla invece di contraffazioni, la più diffusa è la produzione di miele artificiale, ovvero una crema costituita prevalentemente da zucchero invertito e acqua, a cui vengono aggiunte destrine, saccarosio, HMF e altri composti che simulano bene aroma e colore del miele naturale.[4] Infine, sempre più spesso si ha a che fare con commercializzazione di mieli di origine botanica diversa da quella dichiarata e la vendita di mieli extracomunitari per mieli comunitari.

A seguito di trattamenti come quelli descritti il miele subisce delle modifiche, che però sono sempre più difficili da dimostrare, specie se i controlli eseguiti si fermano a dettagli marginali o se le tecniche utilizzate non vengono ammodernate per stare al passo di quelle utilizzate per modificare il prodotto.

## 1.2 GLI ENZIMI

Gli enzimi comunemente presenti nel miele sono invertasi (o  $\alpha$ -glucosidasi), diastasi ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilasi), glucosio ossidasi, catalasi e fosfatasi acida. Per molto tempo si sono effettuati studi per determinarne la provenienza, e quello a cui si è giunti è che gli enzimi derivano soprattutto dalle secrezioni ghiandolari delle api, piuttosto che dal nettare; essi, infatti, si trovano anche nel miele prodotto da api nutrite solo con zuccheri, senza possibilità di raccogliere nettare. Solo per catalasi e fosfatasi acida si sono trovate evidenze che possano essere presenti nel polline.

Gli enzimi svolgono un ruolo di fondamentale importanza, in quanto contribuiscono alla trasformazione chimica del miele nella sua forma finale, e a tale scopo la rilevanza maggiore è attribuita a invertasi, diastasi e glucosio ossidasi.

### 1.2.1 Glucosio ossidasi

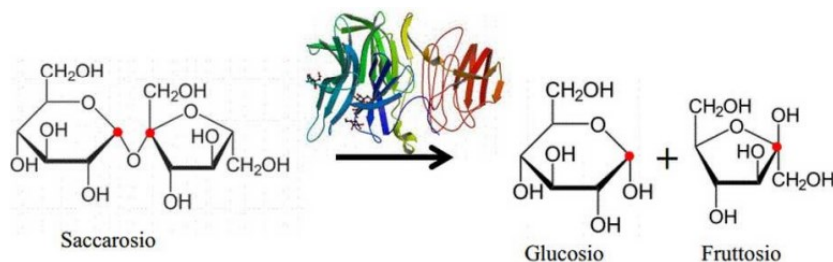
La glucosio ossidasi è un enzima che deriva dalle secrezioni delle ghiandole ipofaringee delle api, e ha la funzione di ossidare il glucosio ad acido gluconico, il maggior responsabile del pH acido del miele. Inoltre, durante tale trasformazione il principale sottoprodotto che si forma è il perossido di idrogeno, che nel miele non trattato termicamente è in parte responsabile dell'azione batteriostatica.

Il meccanismo di ossidazione è di trasferimento diretto di idrogeno all'ossigeno molecolare, e risulta molto selettivo al glucosio, con preferenza per la forma di  $\beta$ -D-glucosio.

L'optimum della sua attività si raggiunge a pH 6.1 e temperatura di 40°C, soprattutto in presenza di ioni  $Na^+$ ; al contrario, viene completamente inattivato a 60°C e in presenza di NaCN e semicarbazide.[6]

### 1.2.2 Invertasi

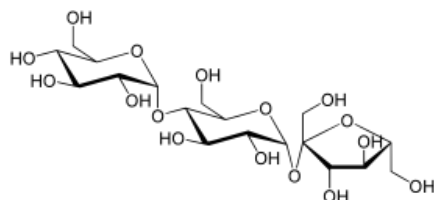
L'invertasi, o  $\alpha$ -glucosidasi, è un enzima idrolitico che ha come attività fondamentale quella di scindere le molecole di saccarosio in glucosio e fruttosio, andando a rompere il legame  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) glicosidico.



**Figura 11** Reazione di idrolisi del saccarosio ad opera dell'invertasi

Tale enzima è particolarmente attivo in un range di pH compreso tra 5.8 e 6.5, mentre viene denaturato a pH minori di 4 e maggiori di 8. Inoltre, esso è stabile a temperature inferiori ai 45°C, con picco di attività attorno ai 40°C; oltre tale valore inizia la sua rapida denaturazione, che arriva ad essere completa a 65-70°C.[7]

Un aspetto molto importante da considerare è che l'enzima che si trova nel miele, che deriva dalle secrezioni ghiandolari delle api, ha un comportamento diverso da quello ottenuto da altri organismi. Ciò che si osserva in tutti i casi è che l'invertasi ha non solo proprietà idrolitiche, ma anche trasferolitiche, ovvero il saccarosio tende ad essere sia substrato che accettore dell'enzima, e quindi viene catalizzata la formazione di trisaccaridi. Tuttavia, è interessante notare come generalmente tali proprietà si esprimono con il trasferimento di unità di fruttosio al saccarosio (transfructosidasi), mentre nel caso del miele si osserva un'azione che coinvolge il trasferimento di molecole di glucosio (transglucosidasi); ciò porta alla formazione soprattutto di erlosio, un trisaccaride generato dalla formazione di un legame tra una unità di glucosio e il glucosio appartenente al saccarosio. L'erlosio è il principale oligosaccaride formato, ma studi evidenziano la formazione di almeno altri 5 oligosaccaridi, anche se in percentuale molto piccola[8].



**Figura 12** Struttura dell'erlosio

Da alcune osservazioni cinetiche è stato visto che la quantità di trisaccaride formata è maggiore all'aumentare della concentrazione di saccarosio, quindi ci si può aspettare che mieli che tendono ad avere tenore di saccarosio più alto rispetto alla media, come

ad esempio quelli di acacia, saranno soggetti alla presenza di una maggior quantità di erlosio.

### **1.2.3 Diastasi**

Con la parola diastasi si intende un gruppo di enzimi amilolitici presenti nel miele che contiene sia  $\alpha$ - che  $\beta$ -amilasi; le prime sono responsabili della rottura casuale di legami 1,4 glicosidici, andando così a produrre destrine, mentre le  $\beta$ -amilasi provocano il distacco di unità di maltosio dalle catene di amido partendo dall'estremità non riducente. In generale quando si parla di diastasi, gli studi sul miele si riferiscono soprattutto alla prima classe di amilasi, che ha la tendenza ad essere meno influenzata dalla presenza degli altri enzimi.

Le condizioni di optimum della diastasi ( $\alpha$ -amilasi) sono leggermente diverse da quelle precedentemente viste per l'invertasi; infatti, il range di pH migliore in questo caso è compreso tra 5.0 e 5.3, mentre per quel che riguarda la temperatura, la diastasi è tendenzialmente più resistente, e prima di inattivarla irreversibilmente è necessario raggiungere valori superiori agli 80°C.

La presenza di tali enzimi nel miele è sempre dovuta alle secrezioni delle ghiandole ipofaringee delle api, anche se ancora alcuni dubbi rimangono su quella che è l'esatta funzione degli enzimi amilolitici, dato che nel nettare non sono generalmente presenti amido e destrine.

### **1.2.4 Importanza dell'attività enzimatica del miele**

Il contenuto di enzimi nel miele dipende da diversi fattori, tra cui l'età delle api, il periodo dell'anno in cui viene raccolto il nettare, la sua consistenza e anche la quantità di zuccheri in esso presente; in generale ciò che si osserva è che i mieli prodotti da fioriture primaverili tendono ad avere attività enzimatica relativamente bassa, specie rispetto a fioriture più tardive.[9]

L'importanza degli enzimi è soprattutto legata alla grande sensibilità che essi hanno nei confronti della temperatura, delle condizioni di conservazione, e dei trattamenti che il miele può subire. Infatti, quello che numerosi studi dimostrano, è che l'attività enzimatica del miele diminuisce per effetto:

- Del tempo, anche con una corretta conservazione al buio e temperatura ambiente (15-25°C), con effetti che sono visibili sulla scala dei mesi[10]

- Della temperatura, soprattutto nel caso in cui il miele subisca trattamenti termici volti ad aumentarne l'omogeneità e migliorare l'aspetto con cui si presenta al consumatore[11] [12]

Un altro aspetto importante da considerare, soprattutto in relazione ai dati economici presentati all'inizio di questo elaborato, è che frequentemente si va incontro a problematiche legate alla qualità del miele che viene importato dai paesi extra-UE, sempre più spesso soggetto ad adulterazioni e contraffazioni. Anche in questo caso l'attività enzimatica del miele può essere un parametro di grande ausilio, dato che una diminuzione della stessa viene osservata in caso di:

- Diluizione del miele con sciroppi, talvolta accompagnata anche dall'aggiunta di amilasi per mascherare l'adulterazione. [13]
- Nutrimento artificiale delle api; questa pratica può alterare la qualità del prodotto finale, e ha effetto sia sugli zuccheri presenti che sull'attività enzimatica. Infatti, se le api sono nutrite con sciroppi, questi vengono lavorati più velocemente rispetto al nettare e vengono arricchiti meno di enzimi.[14]
- Produzione di miele artificiale.

Proprio per gli aspetti sopra citati l'attività enzimatica è entrata come parametro del Codex Alimentarius<sup>3</sup> e delle normative europee per la determinazione degli standard di qualità del miele. Secondo la direttiva 110/20017/CE l'attività diastatica deve essere superiore a 8 DN, valore abbassato ad un minimo di 3 DN per i mieli naturalmente a bassa attività enzimatica (acacia, agrumi ad esempio).

Per quanto riguarda l'invertasi, non vi è un limite minimo stabilito in modo chiaro, data la grande variabilità che questo enzima presenta anche in una stessa origine botanica, unita alla maggiore sensibilità ai trattamenti termici[15]; in alcuni testi è espresso un limite minimo di 5, mentre altri imporrebbero  $IN \geq 10$  [16].

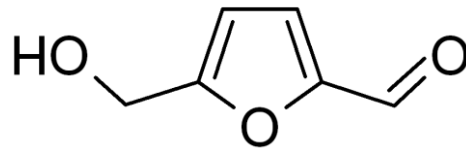
La determinazione dell'attività enzimatica del miele viene spesso accompagnata dalla determinazione dell'idrossimetilfurfurale (HMF), un composto che si forma come intermedio della reazione di Maillard quando il miele viene scaldato, oppure dalla diretta disidratazione degli zuccheri in condizioni acide [9]. Tale parametro è quindi utile come indicatore della freschezza del miele, in quanto la sua quantità tende ad

---

<sup>3</sup> CODEX STANDARD FOR HONEY- CODEX STAN 12-19811



aumentare, oltre che per effetto di trattamenti termici, anche a seguito di una lunga conservazione.



**Figura 13** Struttura dell'idrossimetilfurfurale (HMF)

L'HMF può quindi essere considerato come un parametro complementare agli enzimi per avere informazioni sulla qualità del miele; infatti, secondo le normative vigenti, se si riscontra bassa attività enzimatica il miele può ancora essere considerato accettabile solo se l'idrossimetilfurfurale è al di sotto del limite massimo di 15 mg/Kg. In genere, il limite consentito è di 40 mg/kg, per il miele di origine dichiarata da regioni con clima tropicale e miscele di tali tipi di miele non più di 80 mg/kg.

### 1.3 METODI DI ANALISI DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA

I metodi di determinazione dell'attività enzimatica nel miele sono stabiliti dalla International Honey Commission (IHC), e sia per l'invertasi che per la diastasi si basano su un'analisi di tipo colorimetrico.[17]

#### 1.3.1 Determinazione dell'attività dell'invertasi

La determinazione dell'attività dell'invertasi viene fatta utilizzando come substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranoside (abbreviato p-NPG), una molecola composta da para-nitrofenolo e glucosio legati in modo analogo a fruttosio e glucosio nel saccarosio. Il principio di funzionamento del metodo è schematizzato nella figura sottostante:

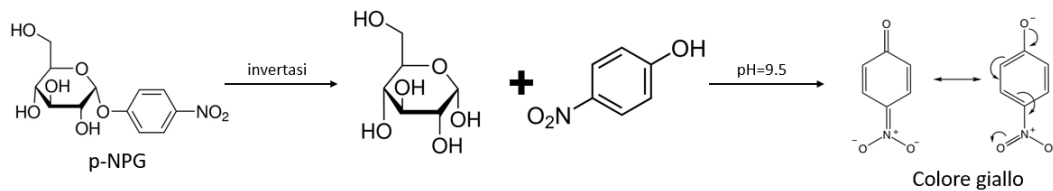


Figura 14 Schema della reazione di idrolisi del p-NPG

Il p-NPG a contatto con l'invertasi del miele viene scisso in para-nitrofenolo e glucosio; successivamente, alzando il pH a 9.5, il para-nitrofenolo viene deprotonato e la soluzione assume una colorazione gialla, la cui assorbanza viene misurata a 400nm attraverso spettrofotometria UV-Vis.

Il metodo prevede innanzitutto la preparazione di una soluzione di p-NPG 0.02 M in tampone fosfato 0.1M e pH 6.0, preparato a sua volta con  $KH_2PO_4$  e  $Na_2HPO_4$ . Il substrato è poco solubile in acqua, quindi esso viene sciolto scaldando il tampone non oltre i  $60^\circ C$ ; inoltre, non è particolarmente stabile, quindi una volta pronta, la soluzione deve essere conservata in frigo in una bottiglia scura e consumata entro un mese scarso. Il pH 9.5 che serve per "quenchar" la reazione tra substrato e invertasi si ottiene invece con una soluzione 3M di Tris tamponata.

Infine, per ogni campione di miele si deve preparare una soluzione con 25 mL di tampone e 5.0 g di miele.

Il procedimento da seguire per la determinazione dell'attività enzimatica prevede di scaldare per 5 minuti 5 mL di soluzione di p-NPG a  $40^\circ C$ , e poi di aggiungere 0.5 mL di soluzione di miele; a quel punto si lasciano reagire a  $40^\circ C$  (temperatura di optimum

dell'enzima in esame) per 20 min. Alla fine si aggiungono 0.5 mL di tampone a pH 9.5 e, dopo aver agitato per bene, si misura l'assorbanza a 400nm dopo circa 15 min. Per ogni miele analizzato si deve preparare anche un bianco, in modo da poter poi sottrarre la sua assorbanza a quella del campione. Quest'ultimo si ottiene scaldando la soluzione di p-NPG a 40°C per 5 min come nel caso precedente, ma poi ad essa si aggiunge prima il tampone a pH 9.5, e solo dopo aver agitato per bene si aggiunge la soluzione di miele.

Considerando che la quantità di para-nitrofenolo prodotta corrisponde esattamente alla quantità di substrato utilizzato, l'attività dell'invertasi viene espressa in U/kg, che corrisponde alla quantità in  $\mu\text{mol}$  di substrato che viene idrolizzata in un minuto da 1Kg di miele nelle condizioni di analisi stabilite:

$$1 \frac{U}{kg} = \frac{1 \mu\text{mol pNPG}}{\text{minuto} \cdot \text{Kg miele}} = 158.94 \cdot \Delta A_{400} \quad (\text{Eq. 1})$$

Molto di frequente si trova però l'attività espressa in numero di invertasi (IN), il quale indica la quantità di saccarosio in g idrolizzata dagli enzimi contenuti in 100 g di miele in 1h, nelle condizioni di analisi stabilite.

$$IN = 21.64 \cdot \Delta A_{400} \quad (\text{Eq. 2})$$

Il fattore di conversione tra le due unità di misura è quindi pari a 7.345:

$$1U/Kg = \frac{158.94}{21.64} IN = 7.345 IN \quad (\text{Eq. 3})$$

### 1.3.2 Determinazione dell'attività della Diastasi

L'attività della distasi secondo la IHC può essere determinata con due diversi metodi: il metodo *Schade* e il metodo *Phadebas*.

#### 1.3.2.1 Metodo di Schade

Il metodo in esame si basa sulla preparazione di una soluzione standard di amido, che con lo iodio sia in grado di sviluppare una colorazione blu compresa in un dato range di intensità; tale soluzione, messa a contatto con il miele ridurrà l'intensità della sua

colorazione per effetto dell'azione della diastasi, e quella riduzione di assorbanza viene sfruttata per la determinazione dell'attività enzimatica del campione di miele.

Il protocollo prevede innanzitutto la preparazione di una soluzione standard di amido. Per fare ciò però è necessario prima pesare 0.1 g di amido da seccare a 130°C per 90 minuti, poi questo va lasciato raffreddare in un contenitore chiuso per 1h in un essiccatore, e dunque ripesato.

Tale passaggio è necessario perché la soluzione standard si deve preparare pesando l'equivalente di 2.000 g di amido anidro in un matraccio da 250 mL, a cui si aggiungono 90 mL di acqua; la soluzione va fatta bollire per 3 minuti e poi raffreddata a temperatura ambiente sotto acqua corrente; solo alla fine si può portare a volume il matraccio con altra acqua.

Una volta preparata la soluzione precedente bisogna preparare una soluzione stock di iodio, dalla quale poi se ne deve preparare una diluita.

A questo punto bisogna calibrare la soluzione di amido per determinare quanta acqua va aggiunta affinché la sua assorbanza a 660nm, una volta aggiunta la soluzione diluita di iodio, sia compresa tra 0.770 e 0.745. Le prove vanno effettuate con volumi di acqua tra 20 e 25 mL, e nel caso l'assorbanza con 20 mL sia minore di 0.745 o con 25 mL sia maggiore di 0.770, allora l'amido scelto non può essere utilizzato per le misure e va cambiato.

Completate tutte le procedure preliminari si possono preparare il tampone acetato a pH 5.3, utilizzando sodio acetato e acido acetico glaciale, e una soluzione di NaCl.

La determinazione dell'attività enzimatica si fa sciogliendo 10.0 g di miele in circa 15 mL di acqua e aggiungendo poi 5 mL di tampone; solo dopo aver agitato bene si possono aggiungere 3 mL di soluzione di NaCl e portare il tutto al volume di 50 mL con acqua.

10 mL di tale soluzione devono poi essere posti in un bagno a 40°C, così come anche 10 mL di soluzione di amido, e dopo 15 minuti si devono aggiungere alla soluzione di miele 5 mL di amido. Dopo 5 minuti esatti si devono prelevare 0.5 mL dalla soluzione, e a questa aggiungere la quantità di acqua determinata dalla calibrazione precedente e 5 mL di soluzione diluita di iodio; infine, si determina l'assorbanza a 660nm.

A seconda del valore riscontrato si effettuano altri prelievi ad intervalli di tempo regolare, applicando la stessa procedura del primo, fino a quando il valore di assorbanza non arriva a 0.235.

L'attività della diastasi viene espressa in unità di Gothe, o numero di diastasi (DN), che rappresenta la quantità di enzima che converte 0.01 g di amido fino al punto di fine stabilito, in 1h a 40°C, nelle condizioni di test. L'equazione da utilizzare è quindi:

$$DN = 300/t_x \quad (\text{Eq. 4})$$

Dove  $t_x$  è il tempo (in minuti) necessario a raggiungere l'assorbanza di 0.235.

### *1.3.2.2 Metodo di Phadebas*

Il metodo di Phadebas invece prevede come substrato l'utilizzo di pastiglie di amido funzionalizzato con un colorante blu insolubile; in questo caso l'azione della diastasi nel miele libera, per idrolisi, frammenti solubili blu, i quali vengono poi determinati fotometricamente a 620 nm.

La procedura da seguire in questo caso è quella di preparare una soluzione con 1g di miele in 100 mL di tampone acetato a pH 5.3 preparato come nel metodo descritto in precedenza; dopo di che se ne devono prelevare 5 mL e li si deve mettere a scaldare a 40°C.

Dopo qualche minuto, si deve aggiungere una pastiglia di Phadebas e la si fa disintegrare in pochi secondi per agitazione; appena la pastiglia viene aggiunta si deve far partire un timer di 15 minuti, durante i quali la soluzione viene mantenuta a 40°C. Trascorso il tempo previsto, per bloccare la reazione si utilizza 1mL di una soluzione di NaOH 0.5M, e dopo aver filtrato su carta la soluzione si effettua la misura di assorbanza a 620 nm.

Anche nel metodo in esame, come nel caso dell'invertasi, il calcolo dell'attività enzimatica prevede la misura di una differenza di assorbanza tra il campione e il bianco, ma in questo caso è sufficiente un unico bianco per tutti i campioni, non ne serve uno per ogni miele testato.

La preparazione del bianco segue quella dei campioni: si devono scaldare per qualche minuto 5 mL di tampone acetato senza miele, e poi si aggiunge una pastiglia di Phadebas; a questo punto si segue esattamente la stessa procedura descritta in precedenza per i campioni.

Una volta completato il protocollo, per calcolare il numero di diastasi si utilizzano due equazioni diverse a seconda del valore ottenuto; in generale l'espressione da applicare è la seguente:

$$DN = 28.2 \cdot \Delta A_{620} + 2.64 \quad (\text{Eq. 5})$$

Se tale espressione fornisce un valore di DN inferiore a 8, allora l'equazione da utilizzare è:

$$DN = 35.2 \cdot \Delta A_{620} - 0.46 \quad (\text{Eq. 6})$$

## 1.4 SCOPO DEL PROGETTO

La valutazione dell'autenticità e genuinità dei prodotti alimentari è un tema estremamente attuale, e con l'aumento degli scambi e delle importazioni da Paesi extra-UE i meccanismi di controllo devono diventare sempre più efficaci per permettere la salvaguardia dei consumatori. Questo tema (brevemente toccato nel paragrafo 1.1.2) riguarda anche il miele, matrice per il quale negli ultimi anni si sta cercando di portare avanti un processo di ammodernamento delle tecniche di analisi per far fronte alle adulterazioni sempre più sofisticate.

La spettroscopia NMR sta già rappresentando un rinnovamento per l'analisi dei carboidrati presenti all'interno del miele, e anche per la determinazione dei composti aromatici e di alcuni marcatori presenti. Questo progetto di tesi si inserisce quindi all'interno di un progetto più ampio promosso dal Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali (Dipartimento ICQRF), che ha lo scopo di giungere a produrre un report di analisi del miele tutto basato sull'utilizzo della spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare. Tale report permetterà, grazie alla comparazione tra i risultati ottenuti e i valori di controllo, di stabilire se il campione di miele preso in esame sia soggetto di frode o meno.

Nello specifico, il lavoro sperimentale di questa tesi si occupa della messa a punto di un metodo per la determinazione dell'attività enzimatica con la Risonanza Magnetica Nucleare, in modo da poter inserire anche tali dati all'interno del report, insieme a quelli delle analisi degli zuccheri in acqua e dei composti estratti in cloroformio. In questo modo risulterà possibile presentare un grande numero di dati sui campioni di miele che, una volta confrontati con i valori limite di legge (dove presenti) o con quelli di riferimento ottenuti dalle analisi di centinaia di campioni, permetteranno di valutare la presenza di frodi in modo più completo. Inoltre, l'utilizzo di una singola tecnica di analisi permetterà di ottimizzare i tempi di preparazione dei campioni e i costi.

L'obiettivo del lavoro di tesi è progettare un protocollo di analisi in grado di osservare per ogni campione il decadimento della concentrazione di saccarosio e maltosio nel tempo mediante NMR con una preparazione semplice del campione. Il successivo confronto dei dati ottenuti con quelli derivanti dall'analisi degli stessi campioni con i metodi fotometrici ufficiali consentirà di ottenere una correlazione lineare che permetta di esprimere l'attività enzimatica determinata con spettroscopia NMR nelle stesse unità previste dalle normative attuali.

La conclusione del lavoro sarà poi quella di applicare il protocollo a campioni di miele sospetti di adulterazione, per capire come i dati relativi all'attività enzimatica, insieme agli altri presenti nel report, possano contribuire all'identificazione della tipologia di frode.





## 2. SPETTROSCOPIA NMR

### 2.1 INTRODUZIONE ALLA TECNICA<sup>[18]</sup>

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica che si basa sull'interazione tra una radiazione elettromagnetica nel campo delle radiofrequenze (1-1000 MHz) e un campione costituito da nuclei atomici che possiedono momento di spin.

Alcuni nuclei, infatti, possono essere dotati di un momento angolare di spin (vettore  $\vec{I}$ ), definito dal numero quantico  $I$ , che può assumere valore positivo intero o semintero a seconda del numero di nucleoni posseduti: il numero quantico è intero quando il nucleo possiede numero dispari sia di protoni che neutroni, e semi-intero se possiede un numero dispari di protoni e pari di neutroni o viceversa. Per il nucleo  $^1\text{H}$  il valore è pari a  $\frac{1}{2}$ .

Un nucleo con spin definito dal numero quantico  $I$  ha le seguenti proprietà:

- Momento angolare di valore assoluto  $|\vec{I}| = \hbar\sqrt{I(I+1)}$
- Componente del momento angolare lungo un asse di riferimento (di solito asse  $z$  di un sistema cartesiano) pari a  $\vec{I}_z = m_I \hbar$ ; tale componente è definita dal numero quantico magnetico di spin  $m_I$ , il quale assume valori da  $-I$  a  $+I$  con variazioni unitarie.
- Ad ogni momento di spin nucleare non nullo è associato poi un momento magnetico  $\vec{\mu}$ , definito come  $\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I}$ ; esso ha tutte le proprietà del momento angolare a meno della costante  $\gamma$ , definita “fattore giromagnetico”, che assume un valore caratteristico per ciascun isotopo della tavola periodica. Per il protone  $\gamma$  vale  $2.657 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{T}^{-1}$ .

Il momento di spin può avere  $2I + 1$  orientazioni rispetto ad una direzione di riferimento, quindi gli stati di spin sono quantizzati in un numero finito univocamente determinato dal valore dei numeri quantici  $I$  e  $m_I$ . Il protone, che ha  $I = 1/2$ , ha quindi due stati di spin possibili (definiti  $\alpha$  e  $\beta$ ), i quali in assenza di campi magnetici esterni possiedono la stessa energia e all'equilibrio sono ugualmente popolati.

In presenza di un campo magnetico esterno ( $B$ ) viene rimossa la degenerazione tra gli stati di spin, e l'interazione viene definita dall'Hamiltoniano di Zeeman:

$$\hat{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\gamma \hat{I} \cdot \vec{B} \quad (\text{Eq. 7})$$

Se si considera il campo magnetico esterno diretto parallelamente all'asse z, allora  $B_x = B_y = 0$ , e quindi:

$$\hat{H} = -\gamma B_z \hat{I}_z = -\gamma B \hat{I}_z \quad (\text{Eq. 8})$$

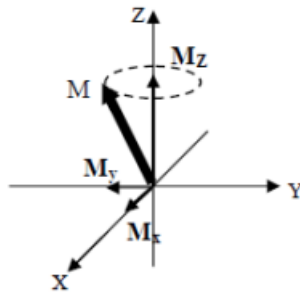
Gli autovalori dell'Hamiltoniano di Zeeman, ovvero le energie degli stati di spin in un campo magnetico, sono quindi proporzionali agli autovalori dell'operatore  $\hat{I}_z$ :

$$E_i = -\gamma \hbar m_i B \quad (\text{Eq. 9})$$

Quindi nel protone la perdita della degenerazione porta alla formazione di due stati, separati da una energia pari a:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \frac{1}{2} \gamma \hbar B - \left( -\frac{1}{2} \gamma \hbar B \right) = \gamma \hbar B \quad (\text{Eq. 10})$$

In un campione in cui è presente un numero elevato di nuclei ed è utile definire la magnetizzazione  $M$ , ovvero la somma dei momenti magnetici per unità di volume. All'equilibrio e in presenza di un campo magnetico esterno  $B_0$  la magnetizzazione è orientata parallelamente al campo magnetico esterno (per convenzione posto sull'asse z), quindi si ha  $\vec{M}_z = \vec{M}_0$ ,  $\vec{M}_x = \vec{M}_y = 0$ . Se il sistema viene perturbato ( $\vec{M}_x$  o  $\vec{M}_y \neq 0$ ), la magnetizzazione, essendo un momento magnetico associato ad un momento angolare, è soggetta ad un moto di precessione attorno alla direzione del campo magnetico esterno (Fig. 15).



**Figura 15** Moto di precessione della magnetizzazione attorno all'asse z

Tale moto di precessione si sviluppa con una frequenza angolare definita *frequenza di Larmor*:

$$\nu_L = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (\text{Eq. 11})$$

Per indurre una transizione tra lo stato di spin a minor energia e quello a più alta è necessario che si verifichi la condizione di risonanza, ovvero l'energia della radiazione deve essere esattamente pari a quella che separa i livelli; in altre parole, la frequenza della radiazione deve essere pari alla frequenza di Larmor:

$$h\nu = \Delta E = \gamma\hbar B \quad (\text{Eq. 12})$$

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B \quad (\text{Eq. 13})$$

Inoltre, una transizione risulta permessa se rispetta la seguente regola di selezione:  $\Delta m_I = \pm 1$ .

Ad ogni transizione NMR è associato un segnale caratteristico centrato alla frequenza di risonanza del nucleo. L'intensità delle righe è proporzionale alla popolazione dei due stati di spin, che all'equilibrio è descritta dalla distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT} \quad (\text{Eq. 14})$$

La risonanza magnetica nucleare è quindi una tecnica con scarsa sensibilità, in quanto la differenza di popolazione tra gli stati è piccola. È però possibile aumentare questa differenza agendo sulla temperatura e l'intensità del campo magnetico esterno, ricordando che all'aumentare dell'intensità di B aumenta la separazione energetica tra gli stati di spin e dunque anche la differenza di popolazione.

### 2.1.1 Chemical Shift

Il campo magnetico esterno induce nei nuclei un momento angolare orbitale elettronico, che genera in corrispondenza dei nuclei un ulteriore piccolo valore di campo magnetico  $\delta B$ ; tale campo è proporzionale a quella esterno ed espresso come:

$$\delta B = -\sigma B_0 \quad (\text{Eq. 15})$$

Dove  $B_0$  è il campo esterno, e  $\sigma$  è la "costante di schermo" del nucleo (adimensionale). La capacità del campo esterno di indurre una corrente elettronica nella molecola dipende dalle caratteristiche della struttura elettronica in prossimità del nucleo in esame, quindi dal suo "intorno chimico".

Il campo locale che viene sentito dal nucleo risulta espresso come:

$$B_{loc} = B_0 + \delta B = (1 - \sigma)B_0 \quad (\text{Eq. 16})$$

$$\nu_L = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma)B_0 \quad (\text{Eq. 17})$$

La frequenza di risonanza è quindi diversa per nuclei che abbiano diverso intorno chimico, anche se sono nuclei di uno stesso elemento.

Inoltre, la frequenza a cui risuonano i nuclei dipende dal campo esterno che viene applicato, quindi per convenzione le frequenze di risonanza si esprimono in funzione di una quantità empirica detta *chemical shift*, il quale è correlato alla differenza tra la

frequenza di risonanza di un nucleo in esame,  $\nu$ , e quella di uno standard di riferimento  $\nu_0$

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} 10^6 \quad (\text{Eq.18})$$

I valori di chemical shift sono generalmente espressi in ppm, che sono adatti a descrivere differenze molto piccole tra le frequenze.

### 2.1.2 Accoppiamento scalare

Il momento magnetico di un nucleo interagisce con i momenti magnetici dei nuclei vicini in due possibili modi: interazione dipolare e interazione scalare.

L'interazione dipolare dipende dall'orientazione dei due spins che interagiscono, ed è una interazione a corto raggio attraverso lo spazio; di fatto, in questa interazione i nuclei risentono del momento magnetico generato dai momenti magnetici dei nuclei con cui interagiscono. Tuttavia, in fase liquida le molecole ruotano velocemente e l'interazione dipolare viene mediata a zero, diventando rilevante solo nelle analisi di campioni in stato solido.

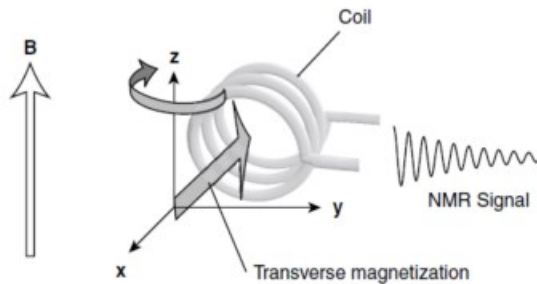
L'interazione scalare invece è responsabile della struttura fine, ovvero la separazione del segnale NMR in singole righe. La forza dell'interazione è definita dalla costante scalare di accoppiamento  $J$ , espressa in Hertz (Hz), che è indipendente dal campo magnetico esterno. Questa interazione è mediata dagli elettroni dei legami tra i due nuclei, e solitamente è trascurabile solo quando essi sono separati da più di tre legami. In generale l'interazione di un nucleo con un numero  $N$  di nuclei equivalenti aventi spin  $I$  separa il picco NMR in un multipletto avente  $2NI+1$  ( $N+1$  nel caso del protone) segnali, con distribuzione dell'intensità data dal Triangolo di Tartaglia. Nel caso in cui le differenze di chemical shift siano molto maggiori delle costanti di accoppiamento scalare ( $\Delta\nu \gg J$ ) si parla di accoppiamento del primo ordine. Se invece, i valori di  $J$  e  $\Delta\delta$  sono confrontabili si ha un accoppiamento del secondo ordine.

## 2.2 ESPERIMENTO FT-NMR

Un esperimento di spettroscopia NMR ad impulsi (FT-NMR) si basa sull'applicazione di impulsi molto brevi ed intensi di un campo magnetico  $B_1$ , polarizzato ortogonalmente alla direzione di  $B_0$ ; tale impulso equivale ad una eccitazione a “banda larga”, che contiene quindi un gran numero di lunghezze d'onda attorno al valore nominale della frequenza della radiazione, e permette quindi l'eccitazione di un ampio intervallo di frequenze attorno a quella di risonanza.

A seguito dell'impulso la magnetizzazione giace sul piano  $xy$  (ad esempio lungo  $y$ ), ma tende a ripristinare la condizione di equilibrio attraverso un moto di precessione di velocità angolare pari a  $\omega_1 = \gamma B_1$  e angolo di rotazione  $\theta$  che dipende dalla durata dell'impulso di radiazione:  $\theta = \omega_1 t = \gamma B_1 t_p$ .

La magnetizzazione viene rivelata misurando la tensione indotta dal suo moto di precessione su una bobina con asse sul piano  $xy$ ; tale segnale è oscillante alla frequenza di Larmor, e poi viene amplificato ed elaborato (Fig. 16).



**Figura 16** Ottenimento del segnale NMR attraverso l'induzione di tensione nella bobina sul piano  $xy$

Il segnale NMR ottenuto viene detto FID (Free Induction Decay), e la componente  $y$  della magnetizzazione per un singolo spin varia secondo

$$M_y(t) = M_0 \cos(2\pi\nu_L t) e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (\text{Eq. 19})$$

In presenza di più frequenze di Larmor, il FID è costituito dalla somma di oscillazioni smorzate, una per ogni frequenza dei nuclei presenti nel campione, e per sapere quali frequenze sono presenti nel campione si effettua la *Trasformata di Fourier* (Fig. 17).



**Figura 17** Trasformata di Fourier di un FID per ottenere uno spettro NMR

Al termine dell'impulso la magnetizzazione tende a ripristinare la condizione di equilibrio iniziale attraverso processi di *rilassamento di spin*, che si distinguono in due categorie:

- Il rilassamento longitudinale (spin-reticolo), che permette il ripristino della magnetizzazione lungo l'asse z, in un tempo caratteristico indicato con  $T_1$
- Il rilassamento trasversale (spin-spin), che invece permette di annullare la magnetizzazione sul piano xy, in un tempo indicato solitamente con  $T_2$ .

Il tempo di rilassamento longitudinale  $T_1$  varia tra 0.1 e 100 secondi a seconda del nucleo, della molecola in cui esso si trova inserito, del solvente e della temperatura; essenzialmente esso è legato alla velocità con la quale il sistema di spin che si trova in uno stato di non equilibrio scambia energia con l'ambiente per tornare allo stato di equilibrio.

Il tempo di rilassamento trasversale  $T_2$  assume valori tra i millisecondi e i secondi, e dipende dagli stessi fattori di  $T_1$ ; tuttavia, esso è legato a fenomeni di defasamento di spin dovuti alle differenze tra le frequenze di risonanza, è alla base del decadimento del FID, e quindi della larghezza intrinseca delle righe NMR.

## 2.3 SEQUENZA ge-DPFGSE-VT-CSSF-TOCSY<sup>[19]</sup>

In uno spettro monodimensionale tradizionale, soprattutto in presenza di matrici ricche di metaboliti quali il miele, è molto comune la sovrapposizione di segnali. Per questo motivo nel presente lavoro è stata utilizzata una sequenza NMR che permette di ottenere spettri selettivi degli zuccheri del miele desiderati, semplificando notevolmente la loro quantificazione.

Tale sequenza è stata precedentemente usata nella procedura analitica sviluppata per definire il profilo zuccherino del miele<sup>[20]</sup> (brevetto 102017000071682, 27/06/2017).

### 2.3.1 Impulsi selettivi

Negli esperimenti NMR si possono distinguere due grandi categorie di impulsi: gli impulsi non selettivi (“hard pulses”), che sono brevi e intensi, utilizzati per eccitare tutte le frequenze dello spettro; gli impulsi selettivi (“soft pulses”), che invece sono lunghi e poco intensi, utilizzati per eccitare solo una piccola parte dello spettro. Questi ultimi permettono di ottenere migliori risoluzioni digitali e informazioni più dettagliate nella struttura fine. Gli impulsi selettivi hanno una durata variabile tra 1 e 100 ms, quindi di almeno 3 ordini di grandezza più grandi rispetto agli impulsi “hard”.

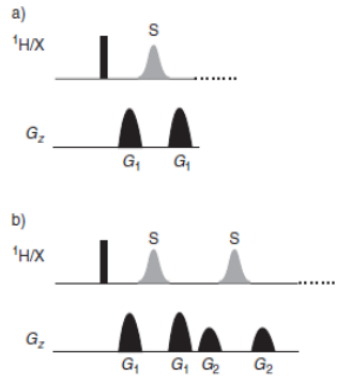
### 2.3.2 Impulsi di gradienti

Spesso gli impulsi “soft” sono combinati a degli impulsi di gradienti (PFG, *Pulsed Field Gradient*) al fine di indurre uno sfasamento dei segnali indesiderati.

I PFG sono spesso rappresentati dalla sequenza G-S-G, dove G indica i due gradienti, mentre S è l’impulso selettivo che viene applicato dopo l’eccitazione del campione con un impulso a radiofrequenze. Il primo gradiente provoca la perdita di fase della magnetizzazione mentre il secondo, agendo in modo opposto, la rifocalizza; per questo motivo sono spesso conosciuti come *gradient-echo*. Gli spin che non vengono eccitati con l’impulso selettivo S rimangono defasati nel piano trasversale e non danno luogo ad un segnale NMR; quelli sottoposti all’impulso invece sono rifocalizzati al termine del secondo gradiente e sono osservabili nello spettro.



In questo progetto di tesi viene utilizzato il *Double Field Gradient Spin-Echo (DFGSE)*, nel quale il gradient-echo viene ripetuto due volte al fine di eliminare ogni errore di fase rimanente e ottenere un'ottima soppressione delle risonanze non desiderate.



**Figura 18** Sequenza di eccitazione selettiva basata su (a) single e (b) double pulsed field

### 2.3.3 Filtro CSSF

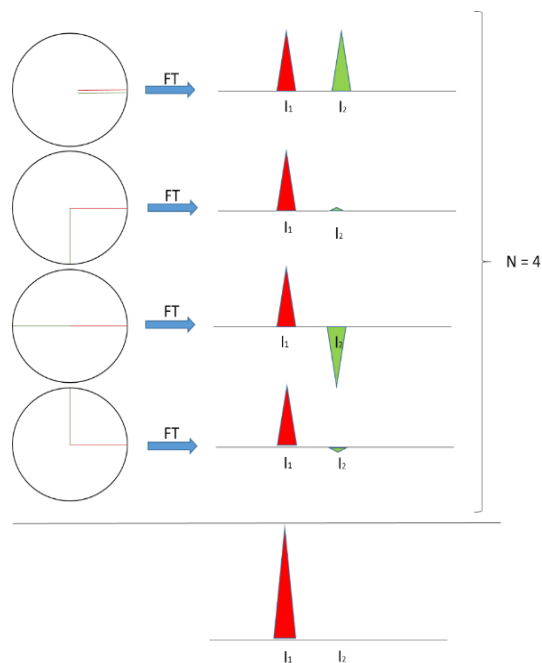
Il filtro CSSF (*Chemical Shift Selective Filter*) sfrutta la sovrapposizione di più FID acquisiti a incrementi gradualmente del periodo di evoluzione del chemical shift, in modo da ottenere l'addizione costruttiva dei segnali in risonanza e allo stesso tempo l'eliminazione, per interferenza distruttiva, dei segnali fuori risonanza.

Considerando due nuclei,  $I_1$  e  $I_2$ , separati da una differenza di chemical shift di  $\nu$  Hz ed entrambi situati nella banda di rifocalizzazione dell'impulso selettivo, quando il segnale  $I_1$  è in risonanza i segnali che emergono dal filtro sono:

$$I_{1x} + I_{2x} \cos(2\pi\nu t) \quad (\text{Eq. 20})$$

Dove  $t$  indica la durata del filtro, compresa tra 0 e  $t_{max}$ . Il segnale di  $I_2$  risulterà quindi sfasato rispetto a quello di  $I_1$  di un fattore  $\cos(2\pi\nu t)$ , che dipende dal tempo di evoluzione del chemical shift.

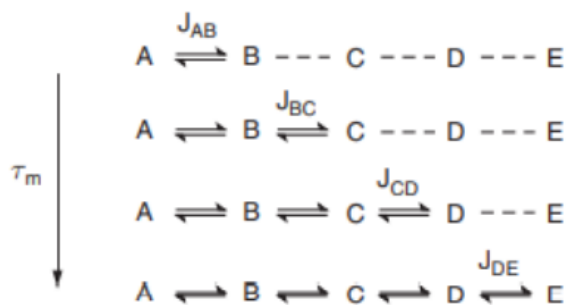
Nella pratica il tempo  $t$  viene discretizzato in una serie di  $N$  intervalli, tali che  $N \cdot \Delta = t_{max}$ , e per ciascuno di essi viene acquisito un FID. Variando l'intervallo il segnale  $I_2$  risulterà sempre più sfasato, e la somma dei FID acquisiti a intervalli crescenti porta alla eliminazione del segnale  $I_2$  per interferenza distruttiva.[20] [21]



**Figura 19** Rappresentazione sistematica del funzionamento del filtro CSSF, tramite acquisizione e sovrapposizione di  $n$  spettri (4 in questo esempio) con tempi di evoluzione diversi

### 2.3.4 TOCSY

La spettroscopia in correlazione totale (TOCSY, *Total Correlation Spectroscopy*) è una tecnica che permette la correlazione tra protoni appartenenti allo stesso sistema di spin. Questo è possibile grazie all'applicazione di uno *spin-lock*, un impulso debole di fase costante lungo l'asse  $y$ , che viene applicato per un tempo detto *mixing time* (generalmente di decine di millisecondi). Durante lo *spin-lock* tutti i protoni sono soggetti allo stesso campo effettivo, permettendo la propagazione della magnetizzazione lungo la catena di spin accoppiati, impedendone l'evoluzione del chemical shift. Il mixing time è un parametro molto importante perché da esso dipende l'entità del trasferimento della magnetizzazione.



**Figura 20** Schema di propagazione della magnetizzazione, in funzione del mixing time ( $\tau_m$ ) dello *spin-lock*, lungo una catena di spin accoppiati



### 3.PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 CAMPIONI DI MIELE

Le analisi di questo lavoro di tesi sono state eseguite su quaranta campioni di miele, appartenenti a otto origini botaniche diverse; le loro specifiche sono presentate in tabella 1.

Campione	Origine botanica	Provenienza	Campione	Origine botanica	Provenienza
AC-24	Acacia	Abruzzo	SF-729	Girasole	Marche
AC-37	Acacia	Piemonte	SF-1288	Girasole	Marche
AC-94	Acacia	Calabria	SF-1296	Girasole	Marche
AC-159	Acacia	Emilia-Romagna	SF-1308	Girasole	Marche
AC-179	Acacia	Lombardia	SF-1348	Girasole	Marche
CI-44	Agrumi	Puglia	CH-579	Castagno	Piemonte
CI-111	Agrumi	Basilicata	CH-663	Castagno	Sardegna
CI-145	Agrumi	Basilicata	CH-699	Castagno	Piemonte
CI-170	Agrumi	Basilicata	CH-974	Castagno	Lombardia
CI-347	Agrumi	Puglia	CH-1212	Castagno	Piemonte
LI-980	Tiglio	Emilia-Romagna	DAN-116	Tarassaco	Valle d'Aosta
LI-1016	Tiglio	Lombardia	DAN-177	Tarassaco	Veneto
LI-1031	Tiglio	Emilia-Romagna	DAN-178	Tarassaco	Lombardia
LI-1346	Tiglio	Emilia-Romagna	DAN-216	Tarassaco	Lombardia
LI-1409	Tiglio	Piemonte	DAN-321	Tarassaco	Veneto
HD-585	Melata di bosco	Lazio	ROD -492	Rododendro	Lombardia
HD-844	Melata di bosco	Calabria	ROD-642	Rododendro	Piemonte
HD-1113	Melata di bosco	Lazio	ROD-870	Rododendro	Piemonte
HD-1177	Melata di bosco	Veneto	ROD-975	Rododendro	Lombardia
HD-1393	Melata di bosco	Basilicata	ROD-981	Rododendro	Piemonte

**Tabella 1** Dati tecnici dei mieli analizzati

Tutti i mieli provengono dal concorso “Tre gocce d’oro” dell’anno 2022, che premia i migliori mieli di Italia. Le origini botaniche sono state scelte sulla base di dati già presenti in letteratura, in modo da spaziare da basse ad alte attività enzimatiche; esse sono quindi: acacia (AC), agrumi (CI), tiglio (LI), melata (HD), castagno (CH), girasole (SF), tarassaco (DAN), rododendro (ROD).

## 3.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI UV-Vis

Tutte le analisi UV-Vis sono state eseguite con lo strumento Shimadzu UV-2501PC in configurazione a doppio raggio; le misure sono state quindi ottenute dalla lettura dei valori di assorbanza alla lunghezza d'onda desiderata prendendo come riferimento acqua. Le cuvette utilizzate sono cuvette usa e getta con cammino ottico di 1 cm (*Sigma Aldrich*).

### 3.2.1 Soluzioni UV-Vis per Invertasi

Per la determinazione dell'attività enzimatica dell'invertasi con metodo colorimetrico è stato applicato il protocollo descritto nel paragrafo 1.3.1.

- Tampone fosfato

Il tampone fosfato è stato preparato utilizzando potassio diidrogeno fosfato ( $KH_2PO_4$  *Carlo Erba*) e sodio fosfato dibasico ( $Na_2HPO_4$ , *Sigma Aldrich*  $\geq 99.0\%$ ) in modo che la concentrazione fosse 0.1 M e il pH fosse pari a 6.0.

- Tampone pH 9.5

Per il tampone basico usato per bloccare la reazione e inattivare l'invertasi è stata preparata una soluzione 3M di Tris (*Fluka*); poi il pH è stato aggiustato fino al valore di 9.5 aggiungendo gocce di una soluzione di HCl 3M. Quest'ultima è stata preparata a partire da HCl concentrato (*Sigma Aldrich*,  $\geq 37\%$ ).

- Soluzione p-NPG

Per l'analisi dei campioni è stata preparata una soluzione di p-NPG (*Merck*) 0.02 M. Siccome il substrato è poco solubile, esso è stato sciolto scaldando il tampone su una piastra senza superare i 60°C, e poi, una volta raffreddata, la soluzione ottenuta è stata versata in bottiglie scure. Le bottiglie sono state conservate in frigo secondo le indicazioni del protocollo.

- Soluzioni di miele

Le pesate per le soluzioni di miele sono state riproporzionate rispetto al procedimento ufficiale (5.0 g in 25 ml) in modo da utilizzare meno tampone, mantenendo comunque la stessa concentrazione di miele; quindi esse sono state preparate pesando 1.0 g di miele da sciogliere poi in 5ml di tampone.

### 3.2.2 Soluzioni UV-Vis per Diastasi

Per la determinazione dell'attività enzimatica della Diastasi è stato scelto di utilizzare il metodo di Phadebas, descritto al paragrafo 1.3.2.2. Tale scelta è stata mossa dal fatto che questo metodo richiede meno tempo per l'analisi dei campioni ed è quello che viene presentato in Gazzetta Ufficiale italiana per la determinazione dell'indice diastatico.<sup>4</sup>

- Tampone acetato pH 5.3

Il tampone acetato è stato preparato tre volte perché l'analisi dei campioni è stata divisa in diverse giornate. In tutti i casi esso è stato ottenuto preparando una soluzione 0.1M di sodio acetato anidro ( $CH_3COONa$ , *Carlo Erba*), e poi il pH è stato aggiustato fino a pH 5.3 con acido acetico glaciale (*Sigma Aldrich, 100%*).

- Soluzione NaOH

Le soluzioni di NaOH per “quenchar” la reazione prima delle misure di assorbanza sono state preparate utilizzando idrossido di sodio in pellets (*Sigma Aldrich, ≥ 98%*), in modo che la concentrazione finale fosse circa 0.5M.

- Soluzioni di miele

Il metodo seguito prevede di preparare i campioni di miele pesando 1.00 g in 100 ml di tampone. In questo lavoro di tesi, come nel caso dell'invertasi, le pesate sono state ridotte mantenendo la stessa concentrazione di miele; in questo caso il rapporto utilizzato è 0.1000 g di miele in 10 ml di tampone acetato.

---

<sup>4</sup> Decreto 25 luglio 2003, “Approvazione dei metodi ufficiali di analisi da applicarsi per la valutazione delle caratteristiche di composizione del miele” (Pubblicata in G.U. 11 agosto 2003, n. 185)

## **3.3 ANALISI NMR**

### **3.3.1 Preparazione delle soluzioni di miele**

Il campione di miele è stato preparato sciogliendo 300 mg di miele in 1,5 ml tampone fosfato pH 6 in D<sub>2</sub>O (si veda la preparazione al paragrafo 3.2.1). In questo modo, la concentrazione di miele è stata mantenuta come quella che si utilizza nei metodi colorimetrici ufficiali.

Lo sciroppo è stato preparato aggiungendo al tampone saccarosio e maltosio in quantità tali da ottenere una concentrazione finale rispettivamente di 60 mM e 100 mM. Le concentrazioni dei due zuccheri sono state scelte in modo da essere in eccesso rispetto alla concentrazione media degli stessi nel miele.

### **3.3.2 Temperature di lavoro**

La temperatura alla quale lasciar agire gli enzimi è stata mantenuta come nei metodi colorimetrici a 40°C, in quanto essa rappresenta l'optimum sia per diastasi che per invertasi.

Per quanto riguarda invece la temperatura di acquisizione degli spettri NMR dei campioni, è stato scelto di lavorare a temperatura ambiente; infatti, grazie all'inattivazione degli enzimi a 100°C i campioni preparati risultano "stabilizzati", e possono essere analizzati anche in momenti successivi senza esigenze particolari di temperatura dello strumento. Altri vantaggi di acquisire gli spettri a temperatura ambiente sono riportati in modo più specifico nel paragrafo 4.2.

### **3.3.3 Parametri di acquisizione degli spettri**

Gli esperimenti NMR stati tutti eseguiti con lo spettrometro NMR Bruker Advance Neo dotato di CryoProbe ed operante ad una frequenza di Larmor del protone <sup>1</sup>H pari a 600.13 MHz e ad una temperatura di 298 K. Gli spettri monodimensionali convenzionali (1D NMR) sono stati acquisiti con i seguenti parametri: ampiezza spettrale di 7200 Hz (12 ppm), 4 dummy scans, 2 scans, time domain di 131072 punti, tempo di acquisizione di 7.21 s, risoluzione del FID pari a 0.13 Hz, e receiver gain (RG) di 6.35. Prima di ciascun esperimento è stata eseguita la calibrazione dell'impulso di 90°.

Per gli esperimenti selettivi eseguiti mediante CSSF-TOCSY, i parametri di acquisizione usati sono: 4 dummy scans, 28 scansioni (14 cicli da 2 scansioni ciascuno), time domain di 32768 punti, RG 6.35, "mixing time" 0.07 s, gaussiana 50

ms, larghezza del filtro 30Hz. Anche in questo caso l'impulso di 90° è stato calibrato prima di ogni esperimento. Per quanto riguarda la frequenza di eccitazione, si è stato scelto di eccitare il segnale intorno a 5.4 ppm, che a temperatura ambiente contiene i segnali sovrapposti dei protoni anomericici sia di saccarosio che maltosio; in questo modo, nello spettro CSSF-TOCSY si ottengono i segnali di entrambi i sistemi di spin. Gli spettri sono stati ottenuti mediante un sistema di automazione che utilizza un software che individua il protone anomericico del glucosio a 5.2 ppm, e a partire da questo determina le frequenze di eccitazione degli altri zuccheri permettendo l'acquisizione degli esperimenti in modo automatico. Nel software viene inserita la differenza ( $\Delta$ ) in ppm tra il multipletto da eccitare ed il segnale di riferimento del glucosio a 5.2 ppm: nel caso in esame  $\Delta = +0.173644777$  ppm.

Gli spettri derivanti dai due esperimenti sono stati processati con il programma Bruker TopSpin 4.2.0, applicando le operazioni di window function (moltiplicazione per un esponenziale con line broadening di 0.3 Hz), zero filling (64k punti per gli spettri CSSF-TOCSY); le correzioni di fase e della linea base sono state eseguite in modo automatico. L'integrazione dei segnali è stata effettuata con il programma ACDLab 12.01 calibrando il segnale del saccarosio a 3.344 ppm e applicando una "macro" per l'integrazione automatica dei segnali.

### 3.4 CALCOLO DELL'INCERTEZZA

Per il calcolo dell'incertezza della misura sono state effettuate tre misure ripetute su alcuni campioni, sia con il metodo UV-Vis che con quello proposto basato su spettroscopia NMR. L'errore assoluto su tali misure è stato determinato come semidispersione massima:

$$\Delta x = \frac{x_{max} - x_{min}}{2} \quad (\text{Eq. 21})$$

dove  $x_{max}$  rappresenta il valore maggiore tra i tre e  $x_{min}$  quello minore. A partire dai valori ottenuti è stato poi calcolato l'errore relativo come:

$$\varepsilon_r = \frac{\Delta x}{X} \quad (\text{Eq. 22})$$

Dove  $\Delta x$  è l'errore assoluto calcolato in precedenza, e  $X$  è il valore medio delle tre misure effettuate. L'errore relativo più elevato tra quelli determinati è stato poi scelto come riferimento per tutti i dati ottenuti.





## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 MESSA A PUNTO DEL METODO CON SPETTROSCOPIA NMR

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è individuare un metodo semplice, veloce ed accurato per determinare l'attività enzimatica con la Risonanza Magnetica Nucleare.

La preparazione del campione richiede pochissime operazioni, in quanto si aggiungono ad una soluzione di miele tamponata saccarosio e maltosio (come substrati rispettivamente per invertasi e diastasi). Il metodo è poi messo a punto andando ad individuare l'intervallo di tempo in cui lasciar agire gli enzimi, il metodo migliore per bloccare la loro azione, ed infine i parametri ottimali per la sequenza di impulsi NMR, che permettano di effettuare la misura del calo di saccarosio e maltosio in un unico esperimento di breve durata. Per la progettazione del metodo si è partiti dalle condizioni utilizzate nei metodi colorimetrici, per poi ottimizzare tutti i parametri in base alle esigenze riscontrate.

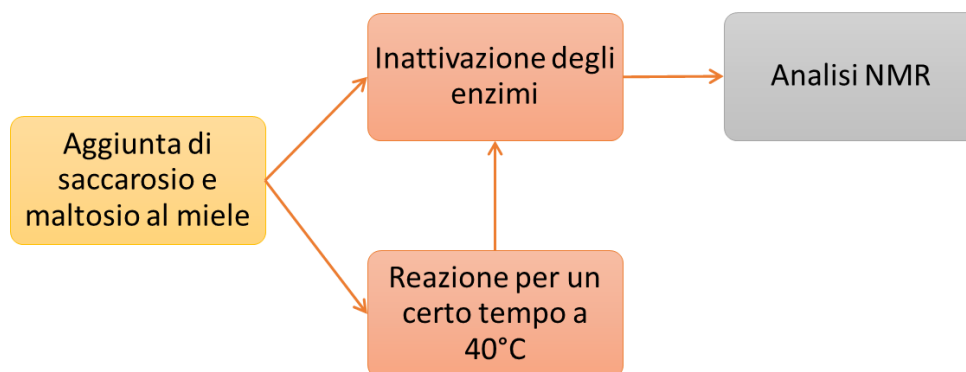
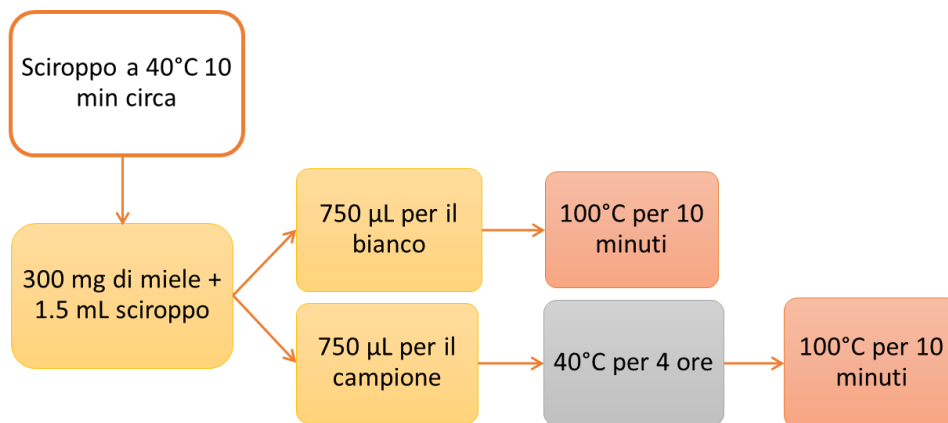


Figura 21 Schema della proposta di metodo

Per poter misurare una differenza di concentrazione degli zuccheri tra l'inizio e la fine dell'azione degli enzimi, è necessario preparare oltre al campione di analisi anche un bianco, che costituisca il tempo zero della reazione. La metodica prevede quindi di preparare, in una boccetta di vetro, una soluzione con 300 mg di miele sciolti in 1.5 mL di sciroppo di saccarosio e maltosio, che viene poi divisa in due parti prelevandone 750  $\mu$ L: una boccetta va a costituire il bianco e una il campione. In questo modo le due soluzioni di partenza sono identiche.

Lo sciroppo, prima di essere aggiunto al miele, viene scaldato una decina di minuti a 40°C per favorirne lo scioglimento e raggiungere più rapidamente la temperatura di lavoro. Il bianco viene poi immediatamente posto in un blocco termico settato a 100°C per 10 minuti, al fine di denaturare gli enzimi prima che iniziassero ad agire, e poi viene fatto raffreddare mettendolo in frigo; il campione invece viene posto a 40°C per quattro ore, al termine delle quali la procedura seguita per l'inattivazione degli enzimi è stata la stessa del bianco.

Il metodo messo a punto è quindi schematicamente riassunto nella figura sottostante.



**Figura 22** Schema della procedura di preparazione dei campioni secondo il metodo messo a punto

#### 4.1.1 Inattivazione degli enzimi

Il primo problema affrontato nella progettazione del protocollo è stato quello dell'inattivazione immediata degli enzimi al tempo zero per il bianco e a reazione completata per il campione. Ciò viene di solito ottenuto per effetto del pH, della temperatura, oppure, se esistenti, utilizzando degli inibitori. In questo lavoro di tesi, per comodità, è stato scelto di denaturare gli enzimi sfruttando l'azione delle alte temperature. Sulla base di evidenze presenti in letteratura, mentre per l'inattivazione dell'invertasi sono sufficienti temperature al di sopra dei 65-70°C, la diastasi sembra essere più resistente[22].

La resistenza degli enzimi è stata verificata da prove preliminari condotte su alcuni campioni in stufa a 80-90°C; in queste condizioni la loro inattivazione è stata osservata solo dopo un tempo piuttosto lungo (più di mezz'ora), durante il quale essi continuano ad agire. Quindi, per ridurre i tempi necessari alla pastorizzazione è stato deciso di portare il campione 100°C utilizzando un blocco termico.

Le prove di pastorizzazione a tale temperatura sono state effettuate prima sugli enzimi puri, preparando soluzioni separate di diastasi (*Diastase from Aspergillus oryzae*,  $\geq 3500$  U/g, *Sigma Aldrich*) e invertasi (*Invertase from baker's yeast*, 200-300 U/mg, *Sigma Aldrich*) a concentrazione di 24  $\mu\text{g/mL}$ ; alla prima è stato aggiunto maltosio e alla seconda saccarosio. Dopo una iniziale verifica dell'azione degli enzimi sugli zuccheri a temperatura ambiente, per ogni enzima sono state preparate due soluzioni identiche, una tenuta a 100°C per 5 e una per 10 minuti. Sono stati poi registrati spettri a diversi intervalli di tempo ed è stato calcolato il valore degli integrali dei segnali degli zuccheri. I valori di tali integrali sono riportati in tabella 2.

<b>Invertasi, 100°C</b>			
<b>5 min</b>	<b>t=0</b>	<b>55 min</b>	<b>77 min</b>
	4.24E+10	4.23E+10	4.24E+10
<b>10 min</b>	<b>t=0</b>	<b>55min</b>	
	4.56E+10	4.56E+10	4.57E+10

<b>Diastasi, 100°C</b>			
<b>5 min</b>	<b>t=0</b>	<b>5 min</b>	<b>150 min</b>
	4.26E+10	4.26E+10	4.26E+10
<b>10 min</b>	<b>t=0</b>	<b>5 min</b>	<b>150 min</b>
	4.55E+11	4.54E+11	4.55E+11

**Tabella 2** Valori degli integrali di saccarosio (tabella sopra) e di maltosio (tabella sotto) ottenuti dopo trattamento a 100°C per 5 e 10 minuti, misurati subito dopo (t=0) e a diversi intervalli di tempo successivi

Come si può osservare dalla tabella, i segnali di saccarosio e maltosio sono rimasti costanti in tutto l'intervallo temporale considerato, dimostrando l'efficacia della denaturazione degli enzimi. La stessa prova è stata effettuata su un campione di miele sciolto in sciroppo, contenente i due zuccheri in concentrazione 20 mM. In questo caso sono stati registrati due spettri a distanza di 24 ore, per verificare l'efficacia dell'inattivazione (Tabella 3).

<b>729-SF, 100°C</b>	<b>Integrale Saccarosio</b>	<b>Integrale Maltosio</b>	<b>Saccarosio dopo 24h</b>	<b>Maltosio dopo 24h</b>
5 min	1.86E+10	2.65E+10	1.87E+10	2.67E+10
10 min	1.96E+10	2.47E+10	1.95E+10	2.48E+10

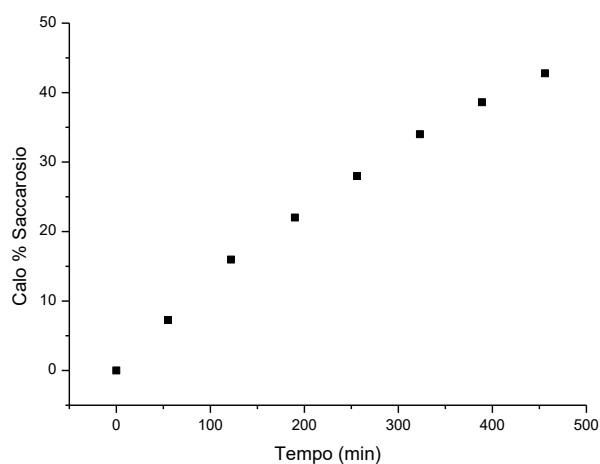
**Tabella 3** Valori degli integrali di saccarosio e maltosio nel miele dopo trattamento a 100°C per 5 e 10 minuti, analizzati subito e dopo 24 ore

Alla fine delle prove descritte è stato scelto di utilizzare la temperatura di 100°C e 10 minuti di tempo.

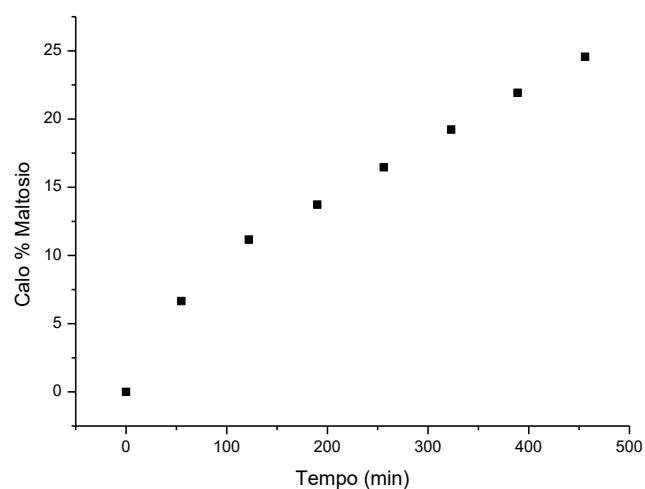
### 4.1.2 Scelta dei tempi di reazione

Per scegliere quanto tempo lasciare agire gli enzimi sono state effettuate delle prove settando lo spettrometro NMR alla temperatura di 40°C, registrando poi spettri ogni ora per più di 6 ore. In questo modo è stato possibile monitorare il calo temporale di saccarosio e maltosio, e stabilire il tempo minimo per osservare un calo da determinare in modo accurato (Figg. 23, 24).

Le prove sono state effettuate su un campione di miele di acacia, caratterizzato da bassa attività enzimatica, e alla fine è stato scelto un periodo di quattro ore (240 minuti); nel caso esaminato tale intervallo di tempo corrispondeva ad un calo del 17% di maltosio e del 28% di saccarosio circa.



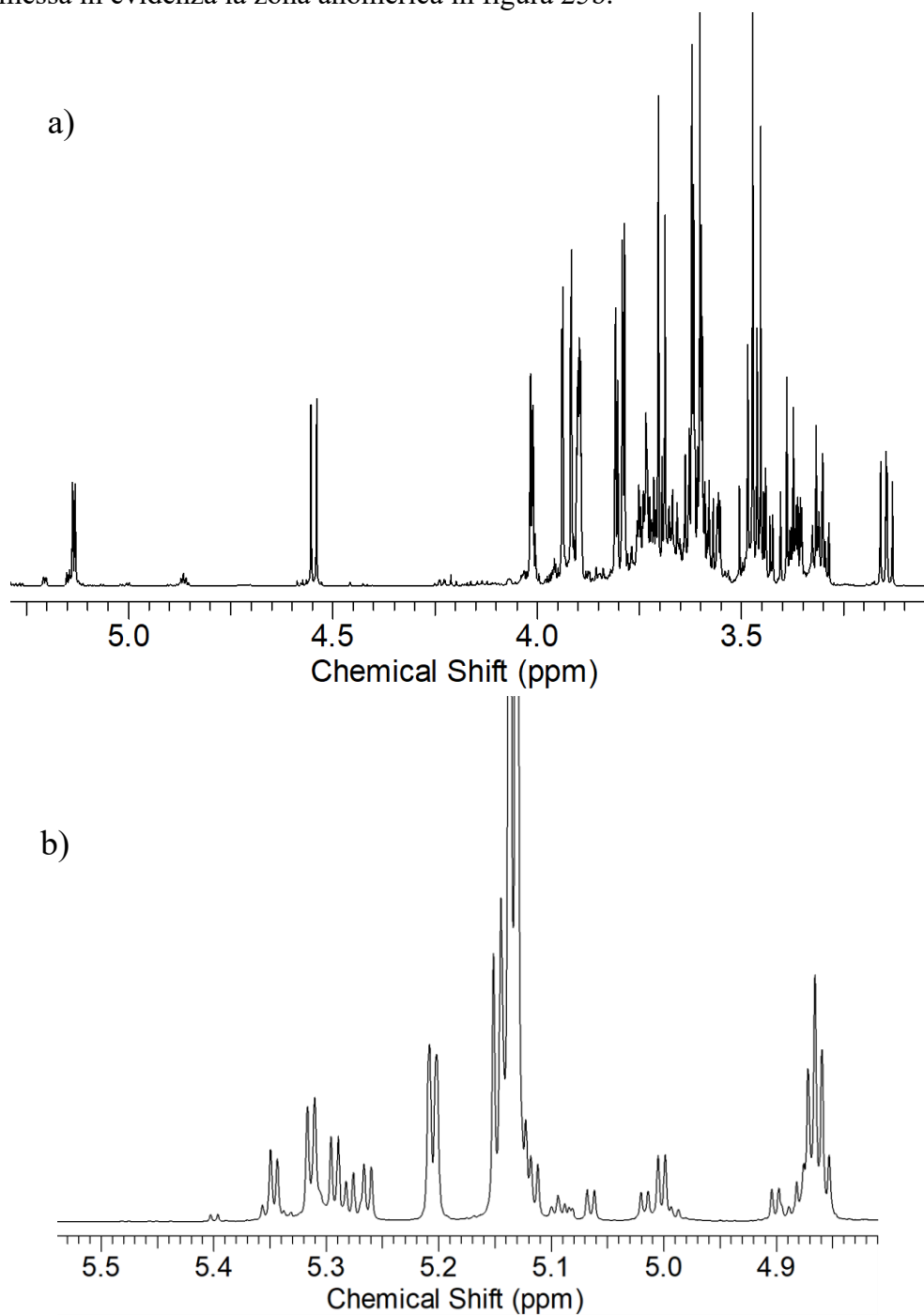
**Figura 23** Calo % di saccarosio nel tempo



**Figura 24** Calo % di maltosio nel tempo

## 4.2 ACQUISIZIONE DEGLI SPETTRI 1D-<sup>1</sup>H-NMR DEL MIELE

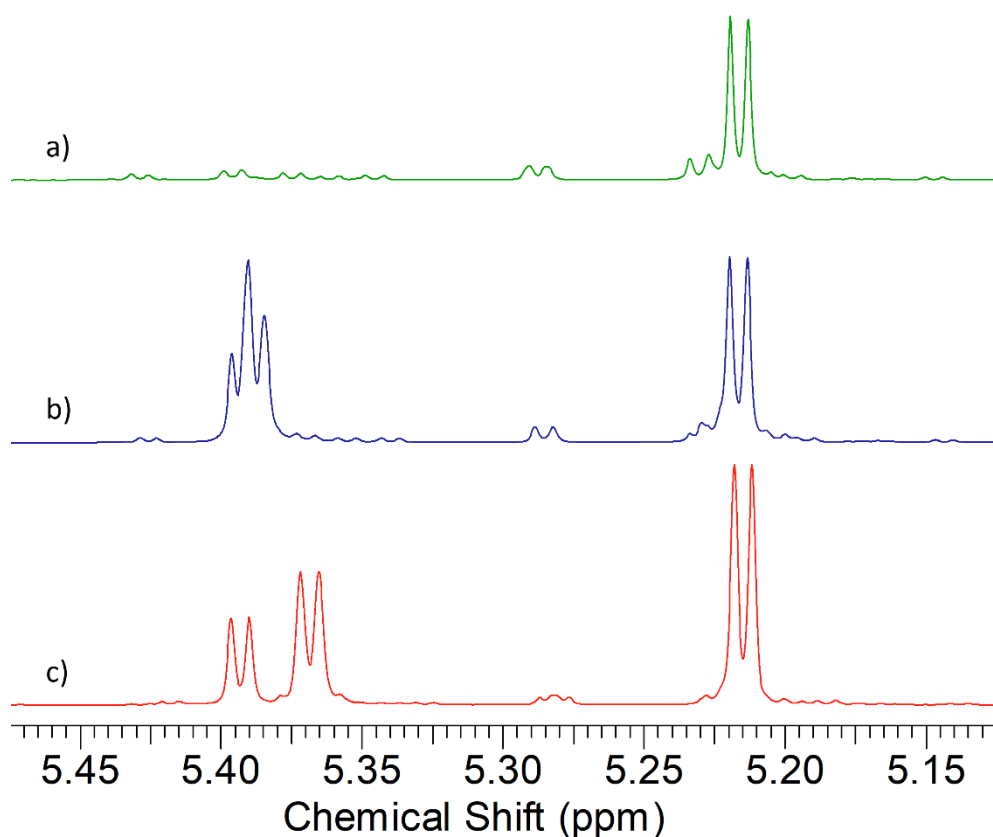
In figura 25a viene riportato lo spettro di un campione di miele, del quale viene poi messa in evidenza la zona anomeric in figura 25b.



**Figura 25** Spettro 1D-NMR di un campione di miele (a) e ingrandimento della sua rispettiva zona anomeric (b)

Come si può vedere, lo spettro risulta molto ricco di segnali anche nella zona dove risuonano i protoni anomeric degli anelli, quindi l'utilizzo di esperimenti CSSF-

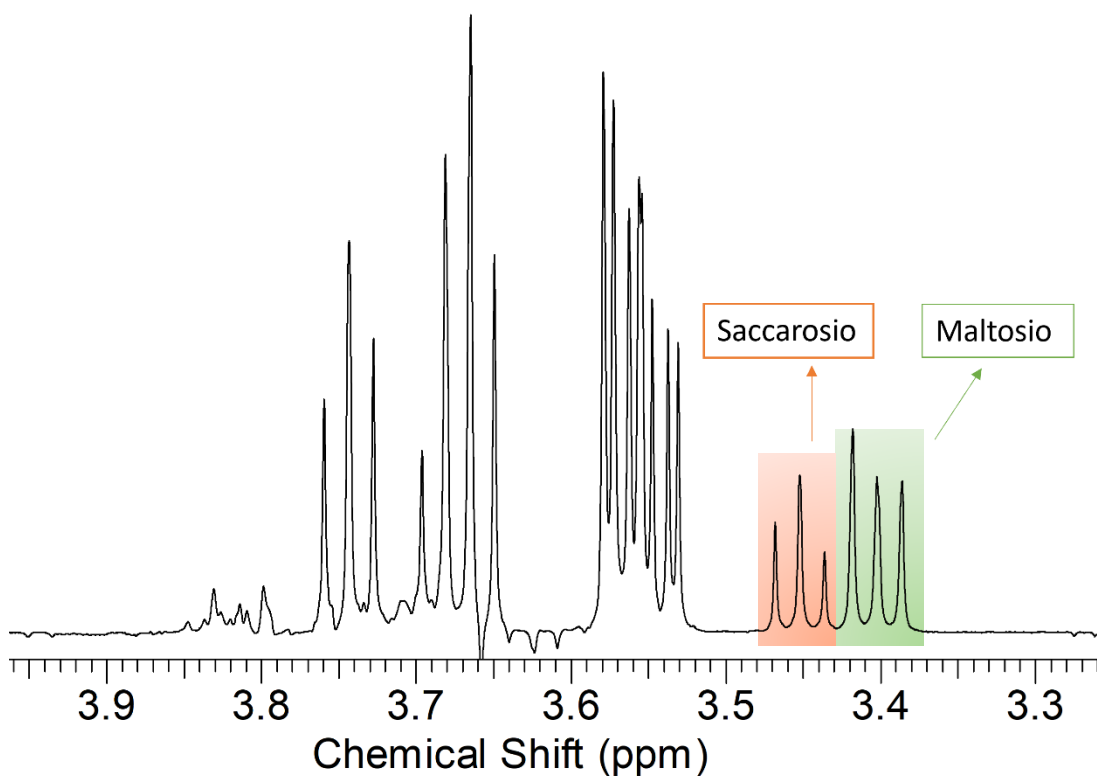
TOCSY risulta di fondamentale importanza per ottenere una semplificazione spettrale; essi, infatti, grazie all'invio di impulsi selettivi, e al successivo trasferimento di magnetizzazione TOCSY, permettono l'ottenimento di spettri contenenti solo il sistema di spin dei nuclei eccitati. I segnali dei protoni anomeric del primo residuo di glucosio sia di saccarosio che di maltosio risuonano intorno a 5.4 ppm, e, come si vede dalla figura 26a, la loro intensità in un miele genuino è troppo bassa per poterne monitorare il calo nel tempo in modo accurato. Per questo motivo è stato deciso di utilizzare lo sciroppo, grazie al quale si può anche con buona approssimazione considerare la concentrazione dei due zuccheri uguale in tutti i campioni. In figura 26 è quindi mostrata la zona anomeric dello stesso campione di miele prima (a) e dopo l'aggiunta dei due zuccheri, sia a temperatura ambiente (b) che a 40°C (c).



**Figura 26** Zona anomeric dello spettro CSSF-TOCSY su un campione di miele prima dell'aggiunta di sciroppo (a), dopo l'aggiunta a T ambiente (b) e a 40°C (c)

La posizione dei picchi dei protoni dipende dalla temperatura; come mostra la figura 26c, a 40°C i segnali di maltosio e saccarosio sono separati, mentre a temperatura ambiente sono sovrapposti. Per lo scopo del presente lavoro risulta molto vantaggioso

eccitare contemporaneamente i due sistemi di spin, al fine di ottenere i segnali sia di maltosio che saccarosio nello stesso spettro; per questo motivo si è scelto di acquisire gli spettri a temperatura ambiente. Inoltre, grazie al fatto che ciascuno zucchero ha un pattern caratteristico di segnali del sistema di spin, è possibile individuare un contributo specifico per ciascuno di essi nella stessa traccia ottenuta da un esperimento CSSF-TOCSY, riducendo notevolmente i tempi di acquisizione e processamento. In figura 27 viene quindi presentato lo spettro CSSF-TOCSY ottenuto attraverso l'eccitazione del segnale a 5.4 ppm, in cui vengono evidenziati i multipletti di saccarosio e maltosio scelti per l'integrazione e la determinazione del rispettivo calo percentuale.

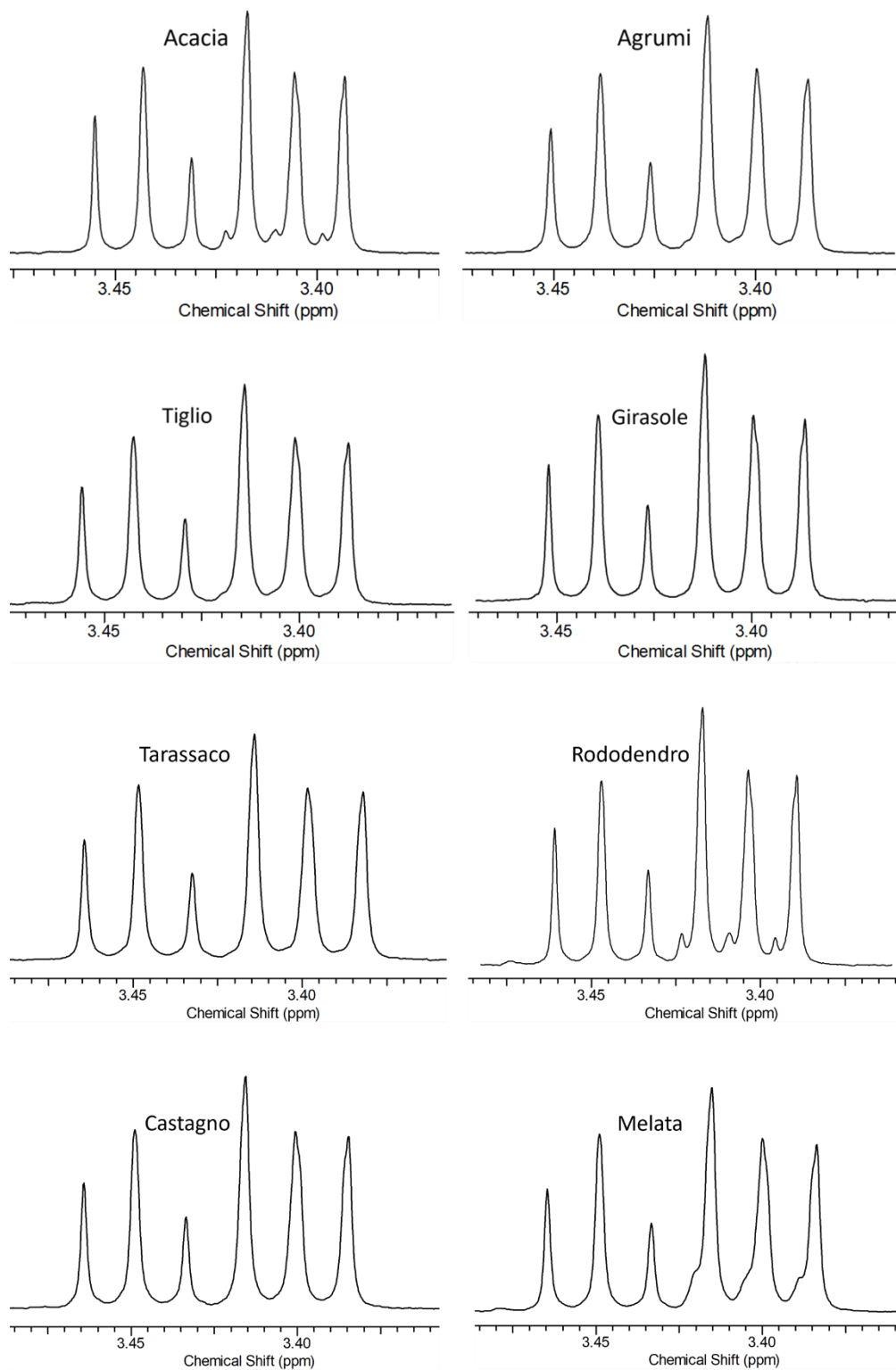


**Figura 27** Segnali di saccarosio e maltosio nello spettro CSSF-TOCSY delle diverse origini botaniche studiate



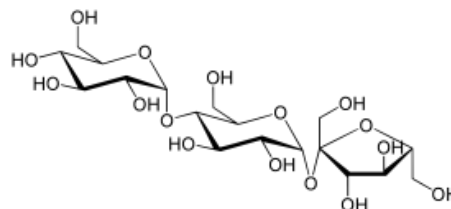
## 4.2.1 Problema dell'erlosio

In figura 28 vengono presentati i segnali di saccarosio e maltosio nello spettro CSSF-TOCSY per le diverse origini botaniche considerate nel lavoro di tesi.



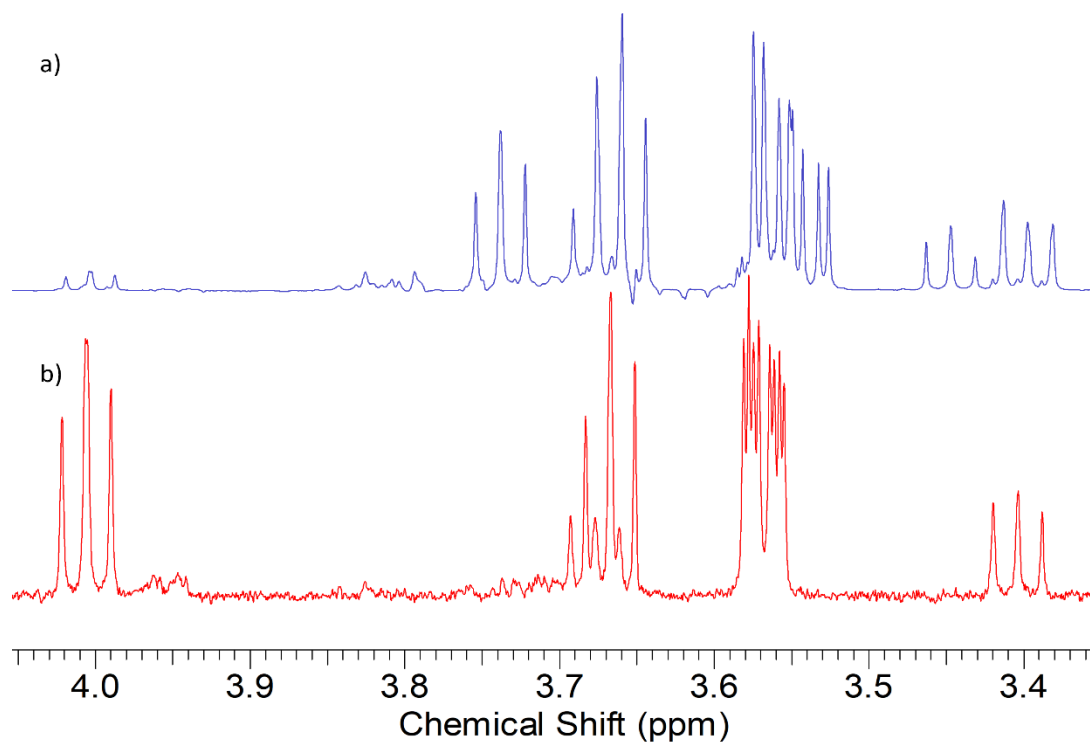
**Figura 28** Regione espansa degli spettri CSSF-TOCSY di mieli delle diverse origini botaniche, in cui risuonano i segnali di saccarosio e maltosio scelti per l'integrazione

Come si può notare dalla figura 28, alcune tipologie di miele, come acacia, rododendro e melata presentano dei segnali che si sovrappongono a quelli del maltosio. Essi sono dovuti alla presenza di erlosio, un trisaccaride costituito da saccarosio legato ad un'unità di glucosio (Fig. 29).



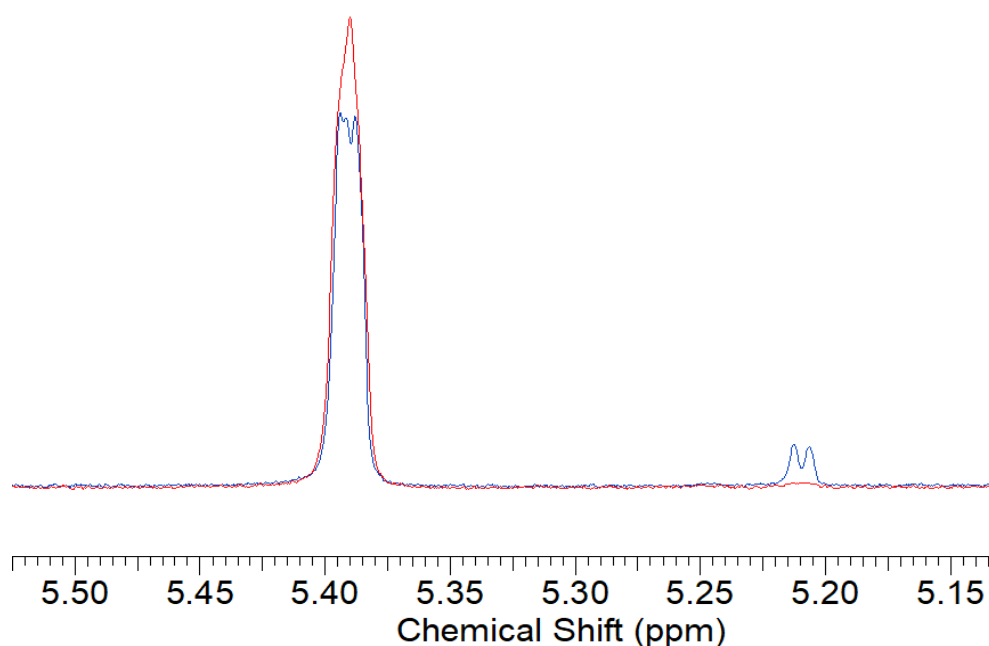
**Figura 29** Struttura dell'erlosio

Uno dei protoni anomeric di tale zucchero risuona esattamente a 5.4 ppm, e quindi anch'esso viene eccitato dall' impulso selettivo del CSSF-TOCSY. Di conseguenza, in presenza di erlosio, nello spettro si ottengono anche i segnali di quest'ultimo (precisamente i segnali relativi al sistema di spin dell'anello il cui protone anomeric risuona a 5.4ppm). Ciò si traduce principalmente nella comparsa, anche nello spettro selettivo del miele, di un tripletto a 4.0 ppm e di un tripletto a 3.40 ppm, frequenza a cui risuona anche il maltosio (Fig. 30).



**Figura 30** Spettro CSSF-TOCSY di un campione che contiene erlosio (a) messa a confronto con lo spettro CSSF-TOCSY dell'erlosio in tampone fosfato (b)

La presenza di erlosio nel miele potrebbe rappresentare un problema al fine della determinazione dell'attività enzimatica, in quanto esso presenta un'unità di saccarosio che può essere scissa in maltosio e fruttosio dall'invertasi, e anche un legame glucosio-glucosio che può essere attaccato dalla diastasi. Quindi, per valutare se effettivamente gli enzimi possano avere un'azione su tale zucchero, sono state fatte delle prove con soluzioni standard di erlosio: ad una è stata aggiunta diastasi e all'altra invertasi. L'aggiunta di diastasi commerciale alla soluzione non ha comportato modifiche allo spettro, se non dopo qualche giorno, mentre l'aggiunta di invertasi ha dimostrato che essa può agire sul legame tra glucosio e fruttosio nell'erlosio, portando alla formazione di maltosio e fruttosio. Nello spettro in figura 31 viene mostrato come, a seguito dell'aggiunta di enzima, si verifichi un calo del segnale del protone anomero dell'erlosio a 5.4 ppm, accompagnato da una contemporanea modifica della sua forma dovuta alla formazione di maltosio; al maltosio è attribuito anche il segnale che si forma a 5.2 ppm.

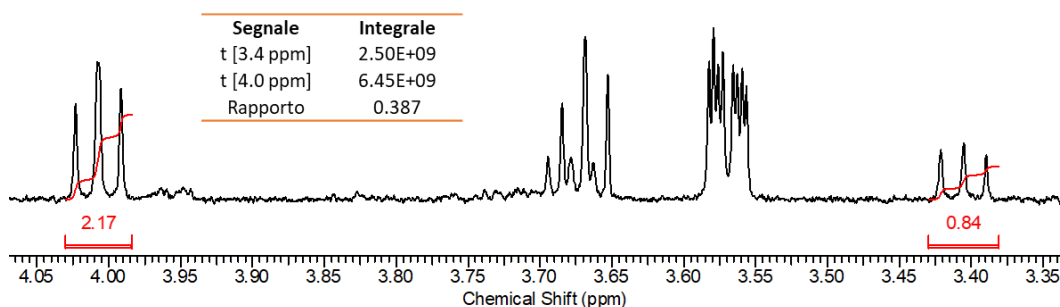


**Figura 31** Zona dello spettro 1D-NMR attorno a 5.4 ppm dell'erlosio prima (spettro rosso) e dopo (spettro blu) l'aggiunta di invertasi

Per valutare se nelle condizioni sperimentali l'azione degli enzimi del miele sull'erlosio rappresenti una fonte di errore significativa nella determinazione del calo di maltosio, è stato deciso di valutare il suo contributo nel bianco e nel test mediante deconvoluzioni del multipletto a 3.4 ppm. Il processo di deconvoluzione, tuttavia,

richiede tempo e molta attenzione, perché i risultati cambiano molto anche con piccole variazioni nel fitting, soprattutto nel caso di segnali dalla forma poco regolare; di conseguenza è stato deciso di provare con un metodo alternativo.

L'approccio seguito è stato quello di sfruttare la presenza del tripletto a 4.0 ppm, che è tipico dell'erlosio e facilmente integrabile. È stato quindi acquisito uno spettro CSSF-TOCSY del trisaccaride in tampone fosfato, con gli stessi parametri di acquisizione usati per i campioni, ed è stato determinato il rapporto tra l'area del tripletto a 4.0 ppm e quella del tripletto a 3.3 ppm (Fig. 32): tale valore è risultato pari a 0.387. Il contributo dell'erlosio sul segnale a 3.40 ppm sovrapposto a quello del maltosio è stato calcolato moltiplicando per 0.387 l'integrale del segnale a 4.0 ppm. Tale contributo è stato poi sottratto dalle aree dei segnali del maltosio sia dei bianchi che dei campioni ed è stato determinato il calo percentuale di maltosio al netto dell'erlosio.



**Figura 32** Spettro CSSF-TOCSY dell'erlosio in tampone fosfato con evidenza dei segnali integrati

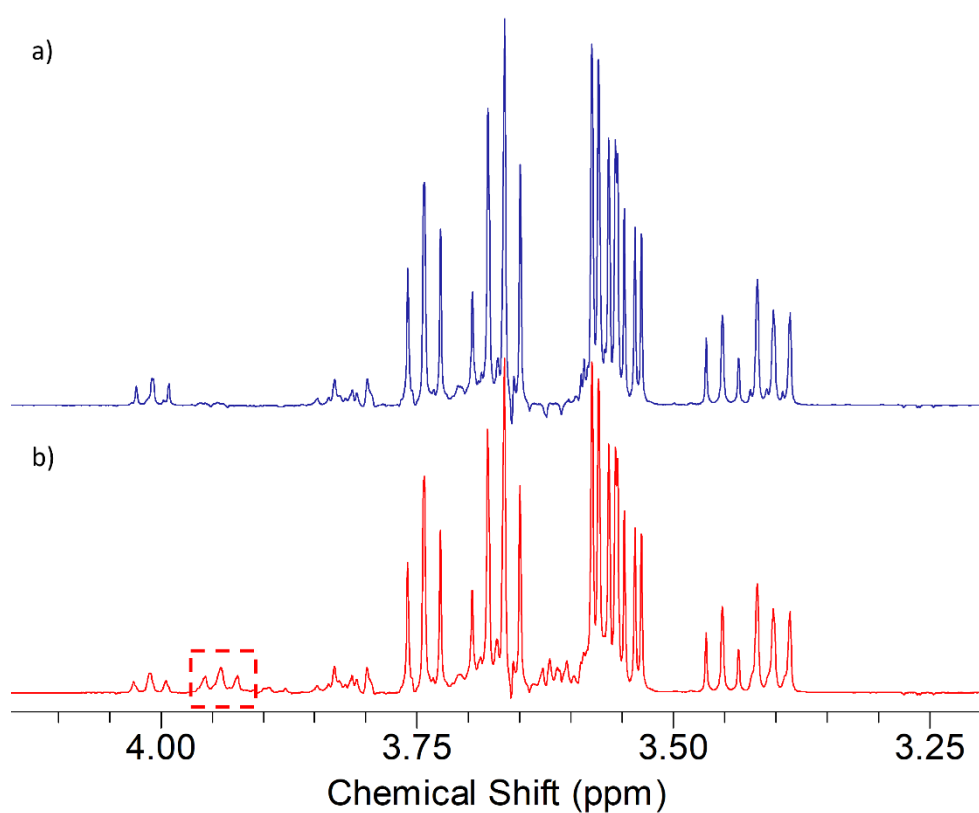
Nella tabella sottostante sono riportati i valori di calo percentuale di maltosio ottenuti per semplice integrazione del segnale, per deconvoluzione, e attraverso sottrazione dell'area del picco dell'erlosio:

MIELE	Calo % semplice	Calo % per deconvoluzione	Calo% per sottrazione erlosio
AC-24	16.6%	16.9%	17.1%
AC-94	3.5%	3.3%	3.6%
AC-159	12.6%	12.4%	12.7%
AC-179	2.8%	3.0%	3.3%
ROD-492	18.7%	18.5%	18.5%
ROD-870	22.8%	23.9%	22.4%
ROD-975	9.6%	8.7%	9.3%
ROD-981	18.6%	18.7%	18.6%

**Tabella 4** Confronto tra i valori di calo percentuale di maltosio ottenuti per semplice integrazione e con i due metodi testati per eliminare il contributo di erlosio.

Come si può notare, la differenza tra i diversi valori ottenuti non è così marcata, quindi in generale è possibile considerare come trascurabile l'errore commesso nell'integrazione del segnale intero.

Un caso particolare invece è rappresentato dal miele di melata, nel cui spettro, in corrispondenza del tripletto del maltosio, esiste un contributo di segnale che non è presente nei mieli di altra origine botanica. Lo spettro CSSF-TOCSY mostra infatti, oltre al tripletto dell'erlosio a 4.0 ppm, un segnale a 3.95 ppm relativo ad un altro zucchero, il quale probabilmente risuona anche intorno a 3.4 ppm e si sovrappone al maltosio (Fig. 33b).



**Figura 33** Spettro CSSF-TOCSY di un campione di miele con erlosio (a) e di un campione di melata (b)

Di tale segnale, e delle particolarità delle melate, si parlerà in modo un po' più approfondito nel paragrafo 4.8.1. In questa sede si vuole tuttavia precisare che nel caso di questa origine botanica non è stato possibile operare una deconvoluzione, perché il segnale sovrapposto si presenta come una spalla di quello primario, e il software non lo riconosce come un picco; quindi, è stato deciso di eliminare solo il contributo dell'erlosio come nei casi descritti in precedenza, trascurando la presenza del secondo segnale. Naturalmente, come conseguenza di questa scelta, i risultati di calcolo

percentuale di maltosio ottenuti devono essere interpretati tenendo in considerazione l'approssimazione effettuata.

I valori di calo percentuale ottenuti dall'integrale semplice e quelli al netto dell'erlosio sono riportati nella tabella sottostante, dalla quale si evince come in questo caso, al contrario dei precedenti, non sia possibile trascurare la presenza del trisaccaride perché i valori cambiano anche oltre l'1%.

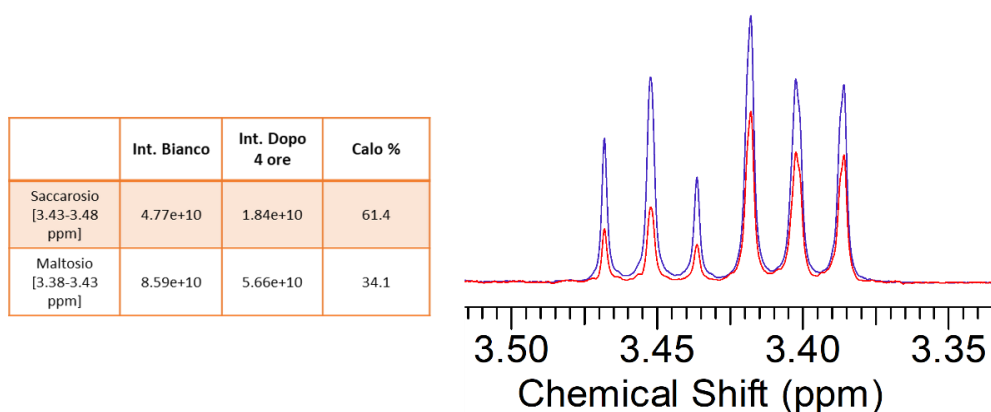
<b>Campione melata</b>	<b>Calo % semplice</b>	<b>Calo % con sottrazione erlosio</b>	<b>Differenza</b>
585	26.6%	27.3%	0.7%
844	24.3%	24.7%	0.4%
1113	25.0%	26.0%	1.0%
1177	17.7%	19.3%	1.6%
1393	24.5%	25.2%	0.7%

**Tabella 5** Confronto tra i risultati ottenuti dalla semplice integrazione del segnale di maltosio e quelli ottenuti sottraendo il contributo dell'erlosio

## 4.3 RISULTATI DELLE ANALISI CON SPETTROSCOPIA

### NMR

Come accennato in precedenza, il metodo messo a punto con spettroscopia NMR prevede la determinazione del calo percentuale di saccarosio e maltosio nelle quattro ore in cui si lasciano agire gli enzimi. Tale determinazione è stata fatta per tutti e quaranta i campioni di miele scelti, integrando i segnali relativi a saccarosio e maltosio del bianco e del test e calcolando la differenza percentuale delle due aree; un esempio di spettro di un bianco e di un campione è mostrato in figura 34.



**Figura 34** Segnali di saccarosio e maltosio nello spettro CSSF-TOCSY di un campione di miele prima (blu) e dopo (rosso) le 4 ore di reazione; nella associata tabella sono mostrati gli integrali dei due segnali e il corrispondente calo %

#### 4.3.1 Misure ripetute

Per effettuare le misure ripetute con il metodo messo a punto nel lavoro di tesi sono stati scelti quattro campioni di miele, appartenenti a quattro diverse origini botaniche. L'incertezza sulle misure è stata poi calcolata tramite l'errore relativo, scegliendo come valore di riferimento quello più elevato. I risultati sono mostrati nelle tabelle 6 e 7.

Campione	Calo % Saccarosio 1	Calo % Saccarosio 2	Calo % Saccarosio 3	Media	Semidispersione massima (%)	Errore relativo
AC-179	4.88	5.26	4.94	5.03	0.19	<b>0.04</b>
CI-347	15.04	15.65	15.94	15.5	0.5	0.03
LI-1031	11.44	10.52	11.11	11.0	0.5	0.04
CH-974	48.47	49.40	48.88	48.9	0.5	0.009

**Tabella 6** Valori di calo % di saccarosio ottenuti dalle misure ripetute

Campione	Calo % Maltosio 1	Calo % Maltosio 2	Calo % Maltosio 3	Media di calo %	Semidispersione massima (%)	Errore relativo
AC-179	3.29	3.22	3.45	3.32	0.11	0.03
CI-347	8.69	8.58	7.95	8.40	0.4	<b>0.04</b>
LI-1031	4.78	5.17	5.06	5.00	0.19	0.04
CH-974	24.40	20.26	19.94	19.84	0.7	0.03

**Tabella 7** Valori di calo % di saccarosio ottenuti dalle misure ripetute

I dati ottenuti mostrano come per entrambi gli zuccheri l'errore relativo più alto sia pari a 0.04, che è stato quindi scelto come riferimento per il calcolo degli intervalli di confidenza delle misure effettuate.

#### 4.3.2 Valori di attività enzimatica ottenuti con analisi NMR

Di seguito si riportano i valori di calo percentuale di saccarosio e maltosio di tutti i campioni, espressi con i relativi intervalli di confidenza.

Campione	Calo % Saccarosio	Calo % Maltosio	Campione	Calo % Saccarosio	Calo % Maltosio
AC-24	27.6 ± 1.1	17.1 ± 0.7	SF-729	28.6 ± 1.1	8.7 ± 0.3
AC-37	26.2 ± 1.0	23.9 ± 1.0	SF-1288	32.6 ± 1.3	24.9 ± 1.0
AC-94	7.2 ± 0.3	3.6 ± 0.1	SF-1296	42.2 ± 1.7	28.6 ± 1.1
AC-159	22.8 ± 0.9	16.3 ± 0.7	SF-1308	46.3 ± 1.9	30.0 ± 1.2
AC-179	5.0 ± 0.2	3.3 ± 0.1	SF-1348	32.9 ± 1.3	14.5 ± 0.6
CI-44	11.7 ± 0.5	14.0 ± 0.6	CH-579	45.3 ± 1.8	27.2 ± 1.1
CI-111	8.8 ± 0.4	6.0 ± 0.2	CH-663	65.4 ± 2.6	36.7 ± 1.5
CI-145	14.9 ± 0.6	12.3 ± 0.5	CH-699	49.2 ± 2.0	23.2 ± 0.9
CI-170	16.3 ± 0.7	7.8 ± 0.3	CH-974	48.9 ± 2.0	24.5 ± 1.0
CI-347	15.5 ± 0.6	8.4 ± 0.3	CH-1212	61.4 ± 2.5	34.1 ± 1.4
LI-980	23.2 ± 0.9	12.0 ± 0.5	DAN-116	52.8 ± 2.1	29.7 ± 1.2
LI-1016	26.6 ± 1.1	12.1 ± 0.5	DAN-177	44.6 ± 1.8	23.6 ± 0.9
LI-1031	11.0 ± 0.4	5.0 ± 0.2	DAN-178	27.5 ± 1.1	14.9 ± 0.6
LI-1346	15.9 ± 0.6	10.9 ± 0.4	DAN-216	50.0 ± 2.0	27.2 ± 1.1
LI-1409	24.1 ± 1.0	10.6 ± 0.4	DAN-321	33.3 ± 1.3	17.6 ± 0.7
HD-585	55.8 ± 2.2	27.3 ± 1.1	ROD -492	30.8 ± 1.2	18.5 ± 0.7
HD-844	52.4 ± 2.1	24.7 ± 1.0	ROD-642	18.5 ± 0.7	16.5 ± 0.7
HD-1113	54.4 ± 2.2	26.0 ± 1.0	ROD-870	40.3 ± 1.6	22.4 ± 0.9
HD-1177	42.3 ± 1.7	19.8 ± 0.8	ROD-975	15.8 ± 0.6	9.3 ± 0.4
HD-1393	46.0 ± 1.8	25.2 ± 1.0	ROD-981	32.0 ± 1.3	18.6 ± 0.7

**Tabella 8** Valori di calo % di saccarosio e maltosio di tutti i campioni, espressi con gli intervalli di fiducia calcolati



## 4.4 RISULTATI DELLE ANALISI UV-Vis PER L'INVERTASI

Nei paragrafi che seguono si riportano i valori di attività dell'invertasi ottenuti applicando il protocollo descritto al paragrafo 1.3.1 a tutti e quaranta i campioni di miele scelti per il lavoro di tesi.

### 4.4.1 Misure ripetute

Per effettuare le misure ripetute nella determinazione dell'indice invertasico sono stati scelti cinque campioni di miele, appartenenti a quattro origini botaniche diverse; i risultati ottenuti, espressi sia in IN che in U/Kg, sono riportati nelle tabelle 9 e 10.

Campione	Misura 1	Misura 2	Misura 3	Media IN	Semidispersione massima	Errore relativo
AC-24	8.80	8.50	8.86	8.72	0.18	0.02
AC-179	0.632	0.637	0.638	0.636	0.003	0.004
CI-145	5.55	5.42	5.36	5.44	0.10	0.018
DAN-178	11.55	10.98	11.83	11.45	0.4	<b>0.04</b>
ROD-642	6.75	6.81	6.88	6.81	0.07	0.010

Tabella 9 Valori di IN ottenuti nelle tre misure effettuate e il loro valore medio

Campione	Misura in U/Kg 1	Misura in U/Kg 2	Misura in U/Kg 3	Media	Semidispersione massima	Errore relativo
AC-24	64.65	62.45	65.10	64.07	1.3	0.02
AC-179	4.64	4.68	4.69	4.669	0.02	0.005
CI-145	40.76	39.83	39.34	39.98	0.7	0.018
DAN-178	84.84	80.62	86.86	84.11	3.1	<b>0.04</b>
ROD-642	49.55	50.01	50.56	50.04	0.5	0.01

Tabella 10 Valori di attività dell'invertasi, espressi in U/Kg, relativi alle tre misure effettuate

Dal calcolo dell'errore relativo è stato trovato che per l'invertasi il valore più alto ottenuto è 0.04, che quindi è stato utilizzato come riferimento per il calcolo delle incertezze su tutte le misure effettuate.

#### 4.4.2 Valori di attività dell'invertasi ottenuti con analisi UV-Vis

Di seguito si riporta la tabella con tutti i valori di IN ottenuti e gli intervalli di confidenza ad essi associati, prendendo come errore relativo di riferimento 0.04.

Campione	IN	Attività in U/Kg	Campione	IN	Attività in U/Kg
AC-24	8.7 ± 0.3	64.1 ± 2.6	SF-729	8.2 ± 0.3	60.2 ± 2.4
AC-37	9.0 ± 0.4	65.8 ± 2.6	SF-1288	9.8 ± 0.4	72.0 ± 2.9
AC-94	2.9 ± 0.1	21.4 ± 0.9	SF-1296	14.7 ± 0.6	108 ± 4
AC-159	8.5 ± 0.3	62.7 ± 2.5	SF-1308	16.5 ± 0.7	121 ± 5
AC-179	0.64 ± 0.03	4.67 ± 0.19	SF-1348	10.8 ± 0.4	80 ± 3
CI-44	5.0 ± 0.2	36.7 ± 1.5	CH-579	17.2 ± 0.7	127 ± 5
CI-111	3.0 ± 0.1	22.3 ± 0.9	CH-663	26.8 ± 1.1	197 ± 8
CI-145	5.4 ± 0.2	40.0 ± 1.6	CH-699	19.1 ± 0.8	140 ± 6
CI-170	4.2 ± 0.2	31.2 ± 1.2	CH-974	21.2 ± 0.8	156 ± 6
CI-347	3.9 ± 0.2	28.6 ± 1.1	CH-1212	29.0 ± 1.2	213 ± 8
LI-980	11.8 ± 0.5	87 ± 4	DAN-116	26.1 ± 1.0	192 ± 8
LI-1016	14.7 ± 0.6	108 ± 4	DAN-177	20.4 ± 0.8	150 ± 6
LI-1031	5.6 ± 0.2	41.0 ± 1.6	DAN-178	11.5 ± 0.5	84 ± 3
LI-1346	7.5 ± 0.3	55.3 ± 2.2	DAN-216	24.9 ± 1.0	183 ± 7
LI-1409	11.7 ± 0.5	86 ± 3	DAN-321	13.9 ± 0.6	102 ± 4
HD-585	32.9 ± 1.3	242 ± 9	ROD -492	13.6 ± 0.5	100 ± 4
HD-844	28.9 ± 1.2	212 ± 8	ROD-642	6.8 ± 0.3	50.0 ± 2.0
HD-1113	31.1 ± 1.2	229 ± 9	ROD-870	20.5 ± 0.8	151 ± 6
HD-1177	15.5 ± 0.6	114 ± 4	ROD-975	6.2 ± 0.2	45.5 ± 1.8
HD-1393	23.1 ± 0.9	169 ± 7	ROD-981	14.5 ± 0.6	107 ± 4

**Tabella 11** Valori di IN di tutti i campioni, espressi con gli intervalli di fiducia calcolati

## 4.5 RISULTATI DELLE ANALISI UV-Vis PER LA DIASTASI

Nei paragrafi che seguono si riportano i valori di attività della diastasi ottenuti applicando il protocollo descritto al paragrafo 1.3.2.1 a tutti e quaranta i campioni di miele scelti per il lavoro di tesi.

### 4.5.1 Misure ripetute

Per effettuare le misure ripetute nella determinazione dell'indice diastatico sono stati scelti cinque campioni di miele, appartenenti a cinque origini botaniche diverse; i risultati ottenuti sono presentati in tabella 12.

Campione	Misura 1	Misura 2	Misura 3	Media	Semidispersione massima	Errore relativo
CI-111	5.33	5.56	5.11	5.33	0.2	<b>0.04</b>
LI-1031	10.65	11.06	10.29	10.67	0.4	0.04
CH-699	14.83	14.27	15.06	14.72	0.4	0.03
DAN-178	9.87	10.25	10.26	10.12	0.19	0.02
ROD-981	9.96	9.22	9.52	9.57	0.4	0.04

Tabella 12 Valori di DN ottenuti nelle tre misure effettuate e il loro valore medio

Anche in questo caso è stata calcolata la semidispersione massima delle tre misure di ogni campione, e da esse l'errore relativo; il valore di errore preso come riferimento per tutte le misure è il più alto, ovvero 0.04.

#### 4.5.2 Valori di attività della diastasi con analisi UV-Vis

In tabella 13 si riportano quindi i valori di indice diastatico di tutti e quaranta i campioni, espressi con le relative incertezze calcolate.

Campione	DN	Campione	DN
AC-24	10.7 ± 0.4	SF-729	9.2 ± 0.4
AC-37	12.8 ± 0.5	SF-1288	16.0 ± 0.6
AC-94	3.2 ± 0.1	SF-1296	17.5 ± 0.7
AC-159	11.1 ± 0.4	SF-1308	17.8 ± 0.7
AC-179	4.8 ± 0.2	SF-1348	11.2 ± 0.4
CI-44	8.4 ± 0.3	CH-579	15.6 ± 0.6
CI-111	5.3 ± 0.2	CH-663	22.1 ± 0.9
CI-145	9.3 ± 0.4	CH-699	14.7 ± 0.6
CI-170	5.1 ± 0.2	CH-974	13.8 ± 0.6
CI-347	5.0 ± 0.2	CH-1212	19.7 ± 0.8
LI-980	10.2 ± 0.4	DAN-116	19.2 ± 0.8
LI-1016	11.9 ± 0.5	DAN-177	14.3 ± 0.6
LI-1031	10.7 ± 0.4	DAN-178	10.1 ± 0.4
LI-1346	10.1 ± 0.4	DAN-216	16.7 ± 0.7
LI-1409	9.9 ± 0.4	DAN-321	12.5 ± 0.5
HD-585	17.7 ± 0.7	ROD -492	11.1 ± 0.4
HD-844	18.4 ± 0.7	ROD-642	10.9 ± 0.4
HD-1113	16.7 ± 0.7	ROD-870	13.0 ± 0.5
HD-1177	13.4 ± 0.5	ROD-975	7.8 ± 0.3
HD-1393	17.5 ± 0.7	ROD-981	9.6 ± 0.4

Tabella 13 Valori di DN di tutti i campioni, espressi con gli intervalli di fiducia calcolati

## 4.6 CONFRONTO TRA DATI UV-Vis E LA LETTERATURA

Di seguito si riportano i valori di IN e DN, ottenuti con i metodi ufficiali, ed il loro confronto con i dati relativi all'attività enzimatica presenti in letteratura[23]. Nel leggere i dati riportati bisogna comunque tenere conto del fatto che le caratteristiche dei mieli sono ampiamente variabili a seconda dell'origine geografica e anche delle annate; infatti, si possono trovare range di riferimento diversi in diversi lavori presenti in bibliografia.

### 4.6.1 Mieli di Acacia

I mieli di acacia sono mieli primaverili, generalmente a bassa attività enzimatica; i dati di letteratura presi come riferimento riportano IN compresi nell'intervallo 0.4-7.7 e DN compresi tra 3.9-14.9.

I risultati ottenuti per i 5 mieli analizzati in questo progetto di tesi sono riportati nella tabella sottostante:

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
AC-24	64.1 ± 2.6	8.7 ± 0.3	10.7 ± 0.4
AC-37	65.8 ± 2.6	9.0 ± 0.4	12.8 ± 0.5
AC-94	21.4 ± 0.9	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.1
AC-159	62.7 ± 2.5	8.5 ± 0.3	11.1 ± 0.4
AC-179	4.67 ± 0.19	0.64 ± 0.03	4.8 ± 0.2

Tabella 14 Valori di IN e DN determinati per i mieli di acacia

L'indice invertasico determinato nei cinque campioni risulta mediamente alto rispetto ai valori di riferimento; ciò è probabilmente dovuto al fatto che nei campioni AC-24, 37 e 159, dall'analisi degli zuccheri in acqua è stata rilevata la presenza di marcatori di melata, ovvero zuccheri tipici di tale tipologia di miele. Nei mieli di melata l'attività enzimatica è più alta rispetto ai mieli di acacia, e la sua presenza nei tre miele 24, 37 e 159 giustifica i valori trovati; Purtroppo, in questi ultimi anni, la produzione di miele di acacia è stata molto scarsa, ed è frequente trovare campioni non del tutto monoflorali.

Per quanto riguarda invece l'indice diastatico, i risultati ottenuti sono mediamente all'interno dell'intervallo atteso.

#### 4.6.2 Mieli di Agrumi

I mieli di agrumi sono mieli considerati, insieme alle acacie, tra quelli a più bassa attività enzimatica, con IN generalmente nell'intervallo 1.0-9.5 e DN compreso nel range 4.4 -15.8.

I risultati ottenuti dall'analisi dei cinque campioni scelti appartenenti a questa origine botanica sono riportati in tabella 15.

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
CI-44	36.7 ± 1.5	5.0 ± 0.2	8.4 ± 0.3
CI-111	22.3 ± 0.9	3.0 ± 0.1	5.3 ± 0.2
CI-145	40.0 ± 1.6	5.4 ± 0.2	9.3 ± 0.4
CI-170	31.2 ± 1.2	4.2 ± 0.2	5.1 ± 0.2
CI-347	28.6 ± 1.1	3.9 ± 0.2	5.0 ± 0.2

Tabella 15 Valori di IN e DN ottenuti per i mieli di agrumi

In questo caso i valori determinati rientrano pienamente nei range riportati in letteratura.

#### 4.6.3 Mieli di Tarassaco

I mieli di tarassaco sono mieli con attività enzimatica generalmente catalogata come medio-bassa; i dati di letteratura riportano IN compresi tra 5.4-14.5 e DN compresi nell'intervallo 3.4-17.4[24]. I valori determinati dall'analisi di cinque campioni appartenenti a questa origine botanica sono riportati nella tabella sottostante:

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
DAN-116	192 ± 8	26.1 ± 1.0	19.2 ± 0.8
DAN-177	150 ± 6	20.4 ± 0.8	14.3 ± 0.6
DAN-178	84 ± 3	11.5 ± 0.5	10.1 ± 0.4
DAN-216	183 ± 7	24.9 ± 1.0	16.7 ± 0.7
DAN-321	102 ± 4	13.9 ± 0.6	12.5 ± 0.5

Tabella 16 Valori di IN e DN ottenuti per i mieli di tarassaco

In questo caso i risultati ottenuti sono mediamente in accordo con valori trovati in letteratura per l'attività della diastasi, e risultano tendenzialmente alti rispetto alla media i valori dell'attività di invertasi.

#### 4.6.4 Mieli di Rododendro

I mieli di rododendro sono generalmente caratterizzati da valori di attività enzimatica vicini a quelli del tarassaco, con IN nell'intervallo 7.3-17.7 e DN nell'intervallo 8.2-15.8. Nella tabella che segue si riportano quindi i valori ottenuti dall'analisi effettuata su cinque campioni scelti per il lavoro di tesi.

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
ROD -492	100 ± 4	13.6 ± 0.5	11.1 ± 0.4
ROD-642	50.0 ± 2.0	6.8 ± 0.3	10.9 ± 0.4
ROD-870	151 ± 6	20.5 ± 0.8	13.0 ± 0.5
ROD-975	45.5 ± 1.8	6.2 ± 0.2	7.8 ± 0.3
ROD-981	107 ± 4	14.5 ± 0.6	9.6 ± 0.4

Tabella 17 Valori di IN e DN ottenuti dall'analisi di mieli di rododendro

I valori ottenuti si mostrano mediamente in accordo con i riferimenti di letteratura, con l'eccezione di due campioni che presentano indice invertasico inferiore al limite più basso riportato.

#### 4.6.5 Mieli di Tiglio

I mieli di tiglio sono mieli che generalmente presentano attività enzimatica media, con IN compreso nell'intervallo 6.7-19.8 e DN nell'intervallo 12.0-27.2. I valori determinati sui cinque campioni selezionati nel lavoro di tesi sono riportati in tabella 18.

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
LI-980	87 ± 4	11.8 ± 0.5	10.2 ± 0.4
LI-1016	108 ± 4	14.7 ± 0.6	11.9 ± 0.5
LI-1031	41.0 ± 1.6	5.6 ± 0.2	10.7 ± 0.4
LI-1346	55.3 ± 2.2	7.5 ± 0.3	10.1 ± 0.4
LI-1409	86 ± 3	11.7 ± 0.5	9.9 ± 0.4

Tabella 18 Valori di IN e DN determinati nei mieli di tiglio

Dal confronto con gli intervalli presi come riferimento si nota come i valori di DN determinati siano tutti al di sotto del valore minimo trovato. Tuttavia, come espresso all'inizio del capitolo, il fatto che tutti quanti siano più bassi potrebbe essere

attribuibile ad esempio all'annata del miele, soprattutto perché ci si trova poco al di sotto a 12; in ogni caso, non è possibile stabilire la causa con certezza.

#### 4.6.6 Mieli di Girasole

I mieli di girasole tendono generalmente ad avere valori di attività enzimatica simili a quelli del tiglio; i dati di letteratura riportano valori medi di IN pari a  $13 \pm 2$  e DN pari a  $17 \pm 3$ . [25] I risultati ottenuti dall'analisi di cinque campioni di miele appartenenti a questa origine botanica sono riportati nella seguente tabella:

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
SF-729	$60.2 \pm 2.4$	$8.2 \pm 0.3$	$9.2 \pm 0.4$
SF-1288	$72.0 \pm 2.9$	$9.8 \pm 0.4$	$16.0 \pm 0.6$
SF-1296	$108 \pm 4$	$14.7 \pm 0.6$	$17.5 \pm 0.7$
SF-1308	$121 \pm 5$	$16.5 \pm 0.7$	$17.8 \pm 0.7$
SF-1348	$80 \pm 3$	$10.8 \pm 0.4$	$11.2 \pm 0.4$

Tabella 19 Valori di IN e DN ottenuti per i mieli di girasole

I dati ottenuti sono in soddisfacente accordo con la letteratura.

#### 4.6.7 Mieli di Castagno

I mieli di castagno sono mieli autunnali con attività enzimatica tra le più alte solitamente riscontrate. Gli intervalli in cui generalmente si attestano IN e DN sono rispettivamente  $14.7-29.2$  IN per l'invertasi e  $14.3-34.9$  DN per la diastasi.

I valori dei due indici ottenuti dalle analisi condotte su cinque campioni scelti di questa tipologia sono riportati in tabella 20.

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
CH-579	$127 \pm 5$	$17.2 \pm 0.7$	$15.6 \pm 0.6$
CH-663	$197 \pm 8$	$26.8 \pm 1.1$	$22.1 \pm 0.9$
CH-699	$140 \pm 6$	$19.1 \pm 0.8$	$14.7 \pm 0.6$
CH-974	$156 \pm 6$	$21.2 \pm 0.8$	$13.8 \pm 0.6$
CH-1212	$213 \pm 8$	$29.0 \pm 1.2$	$19.7 \pm 0.8$

Tabella 20 Valori di IN e DN ottenuti per i mieli di castagno



In questo caso i risultati si confermano pienamente all'interno degli intervalli di riferimento, anche se i valori DN determinati non sono mai particolarmente elevati.

#### 4.6.8 Mieli di Melata

I mieli di melata sono, insieme ai castagni, quelli che con attività enzimatica più elevata: i valori di IN sono generalmente compresi nell'intervallo 17.9-30.6, mentre quelli di DN sono compresi nell'intervallo 10.9-34.1 [24];

I dati riportati in tabella 21 mostrano i risultati ottenuti dall'analisi dei cinque campioni di melata selezionati per il progetto di tesi.

Campione	Invertasi in U/Kg	IN	DN
HD-585	242 ± 9	32.9 ± 1.3	17.7 ± 0.7
HD-844	212 ± 8	28.9 ± 1.2	18.4 ± 0.7
HD-1113	229 ± 9	31.1 ± 1.2	16.7 ± 0.7
HD-1177	114 ± 4	15.5 ± 0.6	13.4 ± 0.5
HD-1393	169 ± 7	23.1 ± 0.9	17.5 ± 0.7

**Tabella 21** Valori di IN e DN ottenuti per i mieli di melata (di bosco)

Anche in questo ultimo caso i valori determinati sono mediamente coerenti con quanto trovato in letteratura.

## 4.7 CORRELAZIONI TRA I DATI UV-Vis ed NMR PER ORGINE BOTANICA

Di seguito si riportano, divisi per origine botanica, i confronti tra i valori di calo percentuale di saccarosio e maltosio, ottenuti con spettroscopia NMR, e quelli di IN e DN ottenuti con spettrofotometria UV-Vis. Mentre nella maggior parte delle origini botaniche i dati ottenuti sono molto simili tra di loro, nei mieli di tarassaco e girasole si riscontrano valori di attività enzimatica più distribuita; in questi due casi è stato quindi deciso di presentare anche la correlazione tra i dati UV-Vis e NMR per mostrare la loro linearità.

### *Mieli di Acacia*

Campione	Calo % Saccarosio	IN	Calo % Maltosio	DN
AC-24	27.6 ± 1.1	8.7 ± 0.3	17.1 ± 0.7	10.7 ± 0.4
AC-37	26.2 ± 1.0	9.0 ± 0.4	23.9 ± 1.0	12.8 ± 0.5
AC-94	7.2 ± 0.3	2.9 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1
AC-159	22.8 ± 0.9	8.5 ± 0.3	16.3 ± 0.7	11.1 ± 0.4
AC-179	5.0 ± 0.2	0.64 ± 0.03	3.3 ± 0.1	4.8 ± 0.2

**Tabella 22** Valori di calo % di saccarosio e maltosio dei mieli di acacia messi a confronto con IN e DN

### *Mieli di Agrumi*

Campione	Calo % Saccarosio	IN	Calo % Maltosio	DN
CI-44	11.7 ± 0.5	5.0 ± 0.2	14.0 ± 0.6	8.4 ± 0.3
CI-111	8.8 ± 0.4	3.0 ± 0.1	6.0 ± 0.2	5.3 ± 0.2
CI-145	14.9 ± 0.6	5.4 ± 0.2	12.3 ± 0.5	9.3 ± 0.4
CI-170	16.3 ± 0.7	4.2 ± 0.2	7.8 ± 0.3	5.1 ± 0.2
CI-347	15.5 ± 0.6	3.9 ± 0.2	8.4 ± 0.3	5.0 ± 0.2

**Tabella 23** Valori di calo % di saccarosio e maltosio dei mieli di agrumi messi a confronto con IN e DN

### *Mieli di Rododendro*

<b>Campione</b>	<b>Calo % Saccarosio</b>	<b>IN</b>	<b>Calo % Maltosio</b>	<b>DN</b>
ROD -492	30.8 ± 1.2	13.6 ± 0.5	18.5 ± 0.7	11.1 ± 0.4
ROD-642	18.5 ± 0.7	6.8 ± 0.3	16.5 ± 0.7	10.9 ± 0.4
ROD-870	40.3 ± 1.6	20.5 ± 0.8	22.4 ± 0.9	13.0 ± 0.5
ROD-975	15.8 ± 0.6	6.2 ± 0.2	9.3 ± 0.4	7.8 ± 0.3
ROD-981	32.0 ± 1.3	14.5 ± 0.6	18.6 ± 0.7	9.6 ± 0.4

**Tabella 24** Valori di calo % di saccarosio e maltosio dei mieli di rododendro messi a confronto con IN e DN

### *Mieli di Tiglio*

<b>Campione</b>	<b>Calo % Saccarosio</b>	<b>IN</b>	<b>Calo % Maltosio</b>	<b>DN</b>
LI-980	23.2 ± 0.9	11.8 ± 0.5	12.0 ± 0.5	10.2 ± 0.4
LI-1016	26.6 ± 1.1	14.7 ± 0.6	12.1 ± 0.5	11.9 ± 0.5
LI-1031	11.0 ± 0.4	5.6 ± 0.2	5.0 ± 0.2	10.7 ± 0.4
LI-1346	15.9 ± 0.6	7.5 ± 0.3	10.9 ± 0.4	10.1 ± 0.4
LI-1409	24.1 ± 1.0	11.7 ± 0.5	10.6 ± 0.4	9.9 ± 0.4

**Tabella 25** Valori di calo % di saccarosio e maltosio ottenuti per i mieli di tiglio messi a confronto con IN e DN

### *Mieli di Castagno*

<b>Campione</b>	<b>Calo % Saccarosio</b>	<b>IN</b>	<b>Calo % Maltosio</b>	<b>DN</b>
CH-579	45.3 ± 1.8	17.2 ± 0.7	27.2 ± 1.1	15.6 ± 0.6
CH-663	65.4 ± 2.6	26.8 ± 1.1	36.7 ± 1.5	22.1 ± 0.9
CH-699	49.2 ± 2.0	19.1 ± 0.8	23.2 ± 0.9	14.7 ± 0.6
CH-974	48.9 ± 2.0	21.2 ± 0.8	24.5 ± 1.0	13.8 ± 0.6
CH-1212	61.4 ± 2.5	29.0 ± 1.2	34.1 ± 1.4	19.7 ± 0.8

**Tabella 26** Valori di calo % di saccarosio e maltosio dei mieli di castagno messi a confronto con rispettivi IN e

DN

### Mieli di Melata

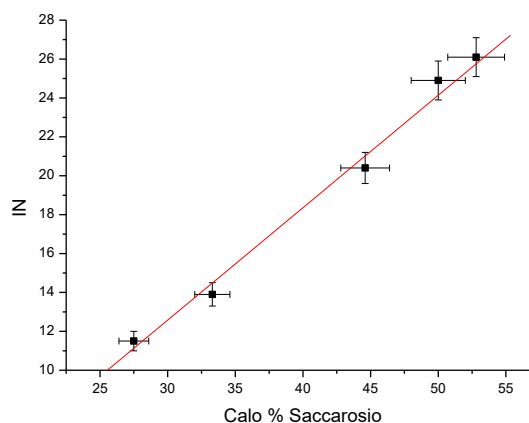
Campione	Calo % Saccarosio	IN	Calo % Maltosio	DN
HD-585	55.8 ± 2.2	32.9 ± 1.3	27.3 ± 1.1	17.7 ± 0.7
HD-844	52.4 ± 2.1	28.9 ± 1.2	24.7 ± 1.0	18.4 ± 0.7
HD-1113	54.4 ± 2.2	31.1 ± 1.2	26.0 ± 1.0	16.7 ± 0.7
HD-1177	42.3 ± 1.7	15.5 ± 0.6	19.8 ± 0.8	13.4 ± 0.5
HD-1393	46.0 ± 1.8	23.1 ± 0.9	25.2 ± 1.0	17.5 ± 0.7

**Tabella 27** Valori di calo % di saccarosio e maltosio (al netto di erlosio) dei mieli di melata messi a confronto con IN e DN

### Mieli di Tarassaco

Campione	Calo % Saccarosio	IN
DAN-116	52.8 ± 2.1	26.1 ± 1.0
DAN-177	44.6 ± 1.8	20.4 ± 0.8
DAN-178	27.5 ± 1.1	11.5 ± 0.5
DAN-216	50.0 ± 2.0	24.9 ± 1.0
DAN-321	33.3 ± 1.3	13.9 ± 0.6

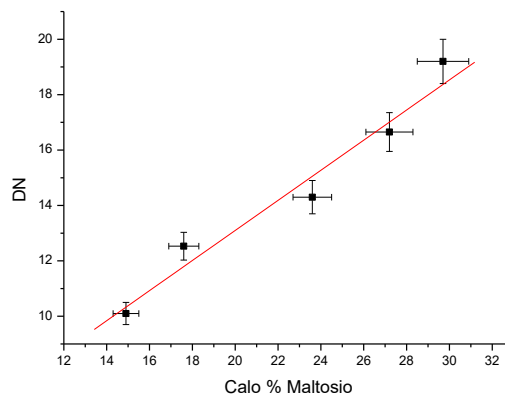
**Tabella 28** Valori di calo % di saccarosio dei mieli di tarassaco messi a confronto con IN



**Figura 35** Correlazione lineare tra IN e Calo % di saccarosio del miele di tarassaco

Campione	Calo % Maltosio	DN
DAN-116	29.7 ± 1.2	19.2 ± 0.8
DAN-177	23.6 ± 0.9	14.3 ± 0.6
DAN-178	14.9 ± 0.6	10.1 ± 0.4
DAN-216	27.2 ± 1.1	16.7 ± 0.7
DAN-321	17.6 ± 0.7	12.5 ± 0.5

**Tabella 29** Valori di calo % di maltosio dei mieli di tarassaco messi a confronto con i rispettivi DN



**Figura 36** Correlazione lineare tra DN e cali % di maltosio del miele di tarassaco

Come si può notare, nonostante in assoluto i valori ottenuti per IN e DN siano più bassi della media presente in letteratura, essi si trovano in accordo con ciò che è stato ottenuto applicando il metodo messo a punto; infatti, come si può notare dai grafici in figura 35 e 36, c'è una tendenza lineare tra i valori ottenuti con i due metodi, almeno all'interno di una stessa origine botanica.

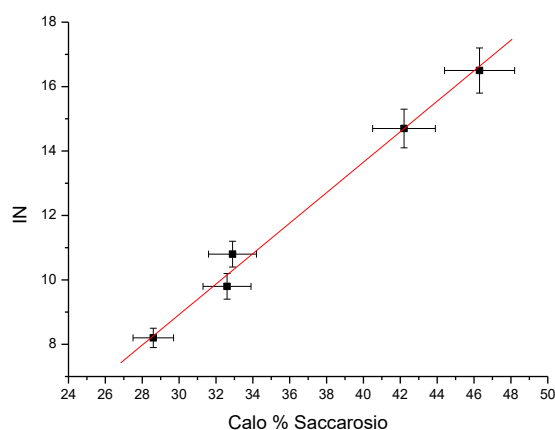
### Mieli di Girasole

Campione	Calo % Saccarosio	IN
SF-729	28.6 ± 1.1	8.2 ± 0.3
SF-1288	32.6 ± 1.3	9.8 ± 0.4
SF-1296	42.2 ± 1.7	14.7 ± 0.6
SF-1308	46.3 ± 1.9	16.5 ± 0.7
SF-1348	32.9 ± 1.3	10.8 ± 0.4

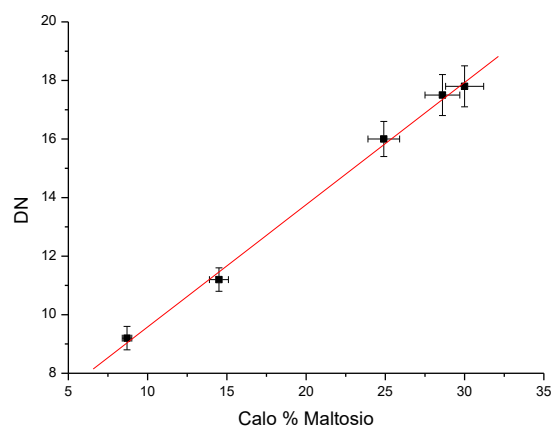
**Tabella 30** Valori di calo % di saccarosio ottenuti per i miele di girasole messi a confronto con IN determinato

Campione	Calo % Maltosio	DN
SF-729	8.7 ± 0.3	9.2 ± 0.4
SF-1288	24.9 ± 1.0	16.0 ± 0.6
SF-1296	28.6 ± 1.1	17.5 ± 0.7
SF-1308	30.0 ± 1.2	17.8 ± 0.7
SF-1348	14.5 ± 0.6	11.2 ± 0.4

**Tabella 31** Valori di calo % di maltosio dei mieli di girasole messi a confronto con il DN determinato



**Figura 37** Correlazione lineare tra IN e calo % di saccarosio nei mieli di girasole

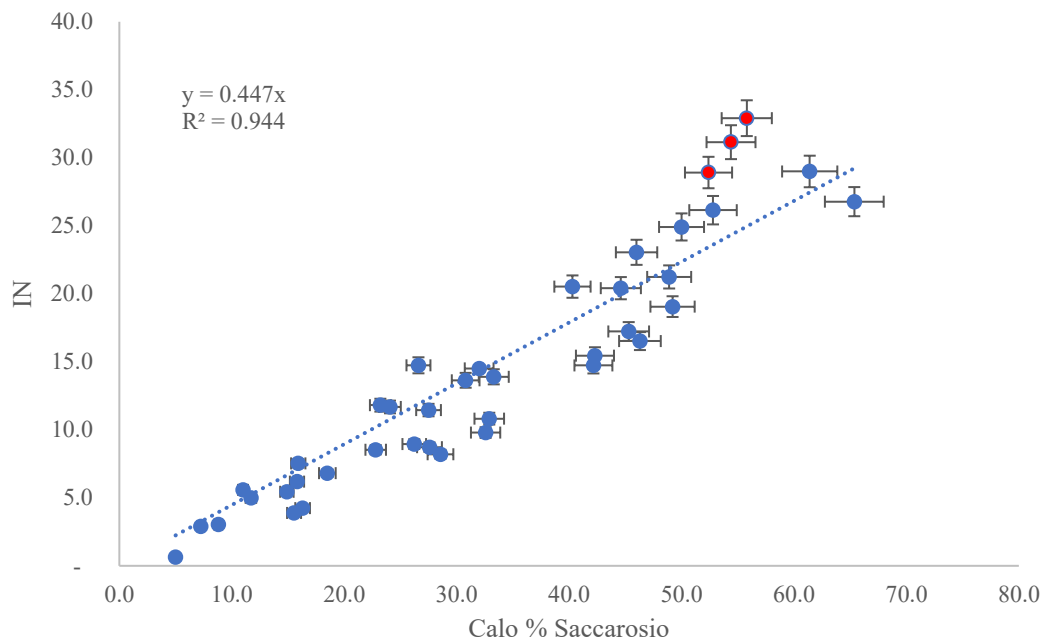


**Figura 38** Correlazione lineare tra DN e calo % di maltosio per i mieli di girasole

## 4.8 CORRELAZIONI TRA I DATI UV-Vis e NMR CON TUTTI I CAMPIONI DI DIVERSA ORIGINE BOTANICA

### 4.8.1 Invertasi

Il grafico in figura 39 mostra la correlazione lineare tra il calo percentuale di saccarosio in quattro ore determinato con spettroscopia NMR e l'indice invertasico (IN) determinato con il metodo colorimetrico ufficiale.



**Figura 39** Correlazione tra calo % saccarosio e IN per tutti i mieli studiati

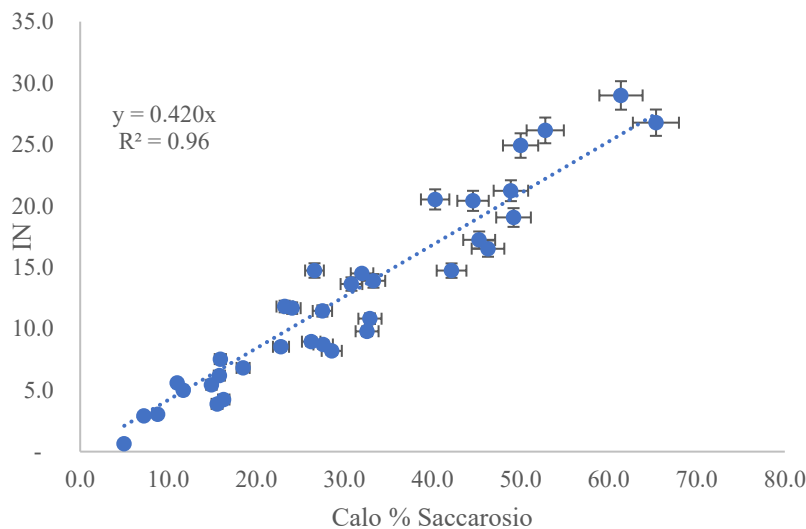
Il grafico mostra che c'è una tendenza alla linearità, e la correlazione riporta  $R^2 = 0.944$ . Secondo quanto trovato, l'indice invertasico espresso IN può essere calcolato dalla percentuale di calo del saccarosio secondo la relazione:

$$IN = 0.447 \cdot Calo \%_{Saccarosio} \quad (\text{Eq. 23})$$

Se si volesse esprimere l'attività dell'invertasi in U/Kg, grandezza legata all'IN dalla correlazione  $\frac{U}{Kg} = 7.35 IN$  la relazione è la seguente:

$$1U/Kg = 3.284 \cdot Calo \%_{Saccarosio} \quad (\text{Eq. 24})$$

I punti che maggiormente deviano dalla retta sono relativi ai mieli di melata; eliminando i punti corrispondenti a tale origine botanica la correlazione tende a migliorare (Fig. 40).



**Figura 40** Correlazione lineare tra IN e calo % di saccarosio senza i mieli di melata

Con la correlazione senza melate l'attività enzimatica può essere espressa con le seguenti equazioni:

$$IN = 0.420 \cdot Calo \%_{Saccarosio} \quad (\text{Eq. 25})$$

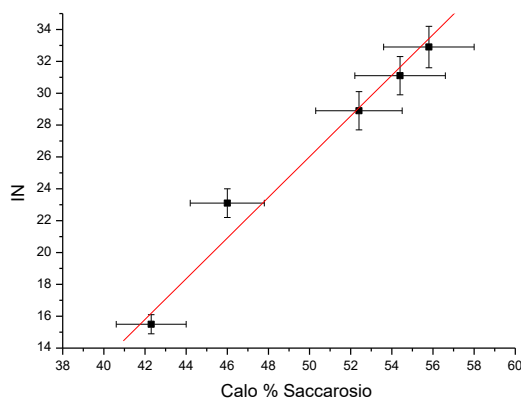
$$1U/Kg = 3.089 \cdot Calo \%_{Saccarosio} \quad (\text{Eq.26})$$

Nonostante la deviazione dalla correlazione completa, è osservato che per i campioni di melata esiste una correlazione lineare piuttosto buona tra i valori di calo percentuale ottenuto con NMR e i dati UV-Vis (Fig. 41), quindi il fenomeno riscontrato può essere definito caratteristico di tale miele.

Campione	Calo % Saccarosio	IN
HD-585	55.8 ± 2.2	32.9 ± 1.3
HD-844	52.4 ± 2.1	28.9 ± 1.2
HD-1113	54.4 ± 2.2	31.1 ± 1.2
HD-1177	42.3 ± 1.7	15.5 ± 0.6
HD-1393	46.0 ± 1.8	23.1 ± 0.9

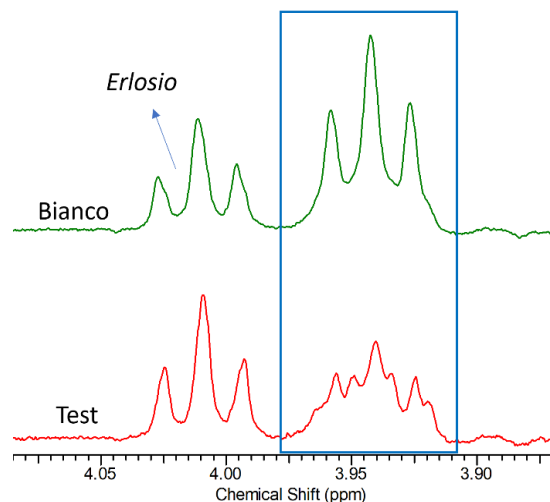
**Tabella 32** Valori di calo % di saccarosio e relativi IN.

determinati per i mieli di melata



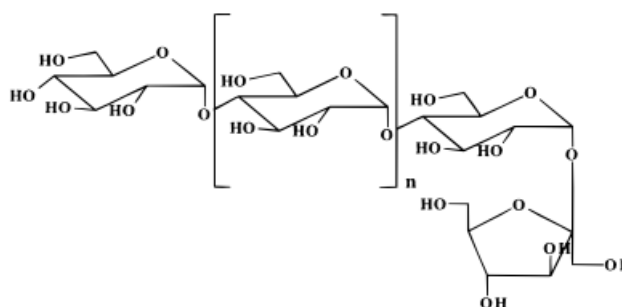
**Figura 41** Correlazione lineare tra IN e calo % di saccarosio per le melate

Dall'analisi dettagliata degli spettri NMR di melata, come già accennato in precedenza nel paragrafo 4.2.1, si osserva un segnale non presente negli spettri dei mieli delle altre origini botanica, la cui forma cambia completamente passando dallo spettro del bianco a quello del campione (Fig. 42).



**Figura 42** Ingrandimento dello spettro CSSF-TOCSY nella zona intorno a 4.0 ppm di un miele di melata prima (verde) e dopo le 4 ore di reazione (rosso).

Questo fa pensare al fatto che nelle quattro ore di azione degli enzimi a 40°C, anche gli zuccheri responsabili di tale segnale subiscano delle modifiche, come se l'enzima agisse anche su di essi, e questo potrebbe incidere sul calo del saccarosio. L'ipotesi più accreditata, a quanto riscontrato in letteratura, è che si tratti di uno o più oligosaccaridi dalla struttura analoga a quella dell'erlosio, con una o due unità aggiuntive di glucosio rispetto ad esso (Fig. 43) [26]. Tuttavia, per capire esattamente quale zucchero (o quali zuccheri) sia responsabile del segnale a 3.95 ppm e come gli enzimi possano agire su di esso (o essi) sono necessari studi più approfonditi.

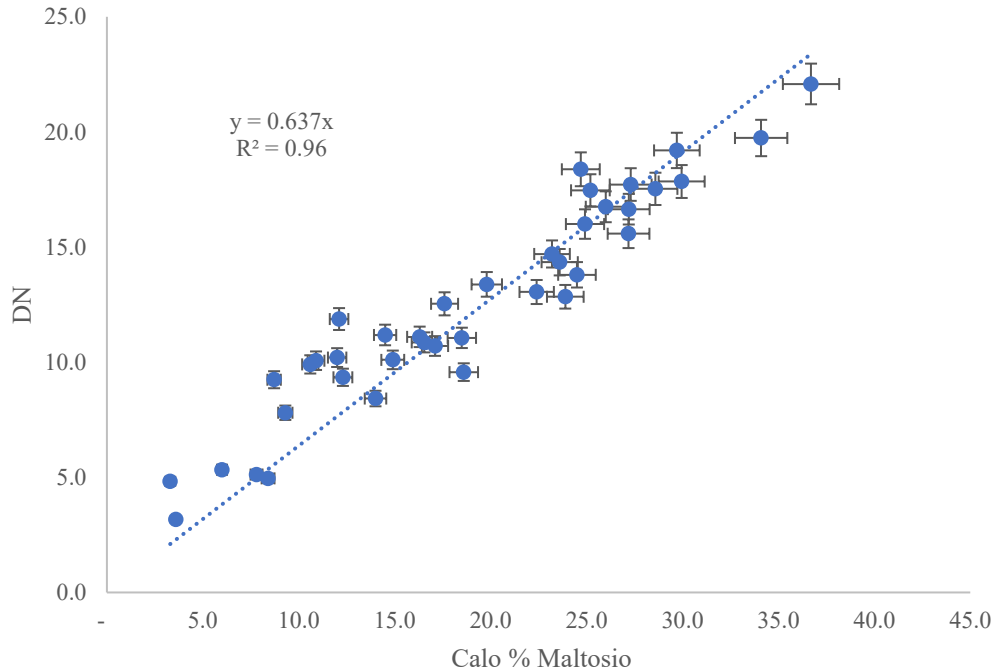


**Figura 43** Struttura di base dei possibili oligosaccaridi derivanti da erlosio; in generale si trova  $n=1$  o  $n=2$



## 4.8.2 Diastasi

Il grafico in figura 44 mostra la correlazione lineare tra il calo percentuale di saccarosio in quattro ore determinato con spettroscopia NMR e l'indice diastatico (DN) determinato con il metodo colorimetrico di Phadebas.



**Figura 44** Correlazione lineare tra calo % di maltosio e DN di tutti i campioni considerati

Il grafico mostra che c'è una buona tendenza alla linearità tra i due metodi, con coefficiente di correlazione pari a  $R^2 = 0.96$ .

Secondo quanto riscontrato l'indice diastatico in DN può essere determinato a partire dal calo percentuale di maltosio secondo la relazione che segue:

$$DN = 0.637 \cdot Calo \%_{Maltosio} \quad (\text{Eq. 27})$$

## 4.9 ANALISI DI CAMPIONI DI MIELE SOSPETTI

Come accennato nello scopo del progetto di tesi, il fine ultimo della messa a punto di un metodo per determinare l'attività enzimatica è quello di arrivare a produrre un report sull'analisi di campioni di miele, in modo da capire se essi sono stati soggetti a frodi di qualche tipo. Dopo la messa a punto del protocollo e la sua prima ottimizzazione, è stato quindi deciso di applicare il metodo su alcuni mieli sospetti di adulterazione. I campioni analizzati sono i seguenti:

- Cinque campioni (denominati *LP*), provenienti dal “Piana Ricerca e Consulenza S.r.l.”.

Tale laboratorio effettua analisi sui pollini di campioni che gli vengono inviati da richiedenti che ne sospettano la contraffazione. Questo tipo di analisi è utile per identificare sia l'origine botanica che quella geografica, e per capire, ad esempio, se campioni di miele dichiarato europeo, presenti al suo interno componenti tipiche della Cina, e quindi sia sospetto, ma non può stabilire con certezza se esso sia adulterato o meno con sciroppi.

- Venticinque campioni mandati dal dipartimento ICQRF del Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali, che sono stati dichiarati come sospetti di adulterazione (denominati ICQRF).
- Quattro campioni di miele acquistati in Cina (denominati A, B, C, D).

I risultati ottenuti sono presentati nelle tabelle che seguono, nelle quali, laddove nota, viene anche espressa l'origine botanica. In evidenza si trovano i campioni selezionati per la discussione di questo capitolo.

CAMPIONI	ORIGINE BOTANICA	Calo % Saccarosio	IN calcolato	Calo % Maltosio	DN calcolato
LP-0307	Millefiori	4.0	1.8	1.8	1.2
LP-0318	Millefiori	3.3	1.5	4.5	2.9
LP-0339	Sulla	4.2	1.9	1.6	1.0
LP-0378	Millefiori	8.7	3.9	8.2	5.2
LP-0472	Millefiori	3.5	1.6	1.1	0.7

**Tabella 33** Valori di IN e DN determinati con l'applicazione del metodo messo a punto per campioni sospetti di adulterazione

<b>CAMPIONI ICQRF</b>	<b>ORIGINE BOTANICA</b>	<b>Calo % Saccarosio</b>	<b>IN</b>	<b>Calo % Maltosio</b>	<b>DN</b>
789	Trifoglio	23.0	10.3	11.6	7.4
790	Sulla	5.3	2.4	0.5	0.3
791	Erica	18.6	8.3	7.6	4.8
792	Rododendro	26.5	11.8	13.7	8.7
793	Tarassaco	19.2	8.6	8.2	5.2
794	Limone	11.3	5.1	3.5	2.2
795	Acacia	13.7	6.1	5.4	3.4
796	Eucalipto	29.4	13.2	15.3	9.8
797	Erba medica	11.3	5.0	2.8	1.8
798	Castagno	47.1	21.0	20.9	13.3
799	Tiglio	19.6	8.7	7.1	4.5
800	Tiglio	38.0	17.0	19.9	12.7
802	Millefiori	2.2	1.0	0.7	0.5
803	Millefiori	1.6	0.7	0.1	0.0
804	Millefiori	30.7	13.7	14.7	9.4
999	-	1.6	0.7	1.1	0.7
1000	-	39.0	17.5	15.0	9.6
1001	-	20.5	9.1	14.2	9.0
1002	-	44.3	19.8	15.1	9.6
1003	-	28.6	12.8	16.6	10.6
1004	-	22.6	10.1	10.7	6.8
1005	-	10.0	4.5	4.1	2.6
1006	-	26.2	11.7	13.2	8.4
1032	-	2.7	1.2	1.9	1.2
1067	-	7.9	3.5	4.4	2.8

**Tabella 34** Valori di IN e DN determinati con l'applicazione del metodo NMR su campioni mandati dal dipartimento ICQRF

<b>CAMPIONI</b>	<b>Calo % Saccarosio</b>	<b>IN calcolato</b>	<b>Calo % Maltosio</b>	<b>DN calcolato</b>
A	12.5	5.6	7.1	4.5
B	1.1	0.5	1.9	1.2
C	0.7	0.3	0.4	0.2
D	5.5	2.4	3.8	2.4

**Tabella 35** Valori di IN e DN di campioni provenienti dalla Cina, determinati con il metodo NMR messo a punto

#### 4.9.1 Parametri determinati dall' analisi NMR dei mieli

La determinazione dell'attività enzimatica è sicuramente un parametro immediato per stabilire se il campione di miele preso in considerazione sia sospetto di frode o meno, soprattutto se è nota la sua origine botanica. Tuttavia, la forza di questo tipo di valutazione si esprime soprattutto nel confronto con le altre determinazioni che vengono di solito effettuate, ovvero gli spettri degli estratti in cloroformio ed, quando necessario, anche degli zuccheri in acqua. L'intreccio di tutti i risultati, infatti, permette non solo di confermare il sospetto, ma anche di fare ipotesi affidabili su quale tipologia di frode sia stata messa in atto.

Per quanto riguarda gli spettri degli estratti in cloroformio, i parametri che generalmente si vanno ad osservare sono:

- Il fattore aromatico: una zona dello spettro compresa tra 5.45 e 8.2 ppm che presenta i segnali dei composti aromatici che le api hanno trasportato dal nettare al miele; in generale il loro pattern è tipico dell'origine botanica, e il valore dell'integrale totale dei segnali compresi in questa zona assume valori all'interno di un range definito per i mieli genuini monoflorali.
- Il DAGE (diacetilgliceril etere), un composto endogeno secreto dalle api che ha la struttura di un trigliceride, in cui la terza unità presenta un etere invece che un estere (Fig. 46). Il segnale che di solito viene considerato è quello del protone 2, che risuona a 5.20 ppm. Anche il contenuto di questo composto dipende dall'origine botanica del miele e deviazioni dai valori di riferimento sono indicazioni di adulterazione
- L'idrossimetilfurfurale (HMF), tra i cui segnali ce n'è uno evidente a 6.5 ppm. Esso, come già accennato nel paragrafo 1.3.3, tende ad aumentare se il miele subisce riscaldamento o lunga conservazione.

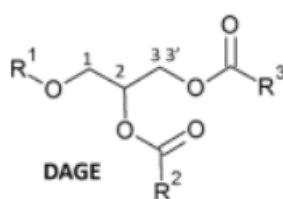


Figura 45 Struttura del DAGE

Negli spettri in acqua invece le informazioni utili che si possono ricavare riguardano soprattutto la presenza di *zuccheri esogeni*, ovvero quei carboidrati, come isomaltotriosio, maltotriosio, mannosio e gli oligosaccaridi, che non sono naturalmente presenti nel miele e possono essere solamente aggiunti dall'esterno, indicando ad esempio l'utilizzo di sciroppi. Oltre agli zuccheri esogeni ci sono poi gli *zuccheri endogeni*, che invece sono caratteristici del miele, e quelli *endo/eso*, ovvero quei carboidrati come glucosio, fruttosio, maltosio, saccarosio e isomaltosio, che sono naturalmente presenti nel miele, ma possono anche essere aggiunti.

L'analisi degli zuccheri è certamente utile per valutare la presenza di sciroppi, ma richiede tempi molto lunghi per l'acquisizione e il processamento degli spettri; è necessario effettuare questo tipo di determinazione, qualora i dati dagli spettri in cloroformio e di attività enzimatica non siano in grado di fornire informazioni esaustive riguardo il tipo di frode.

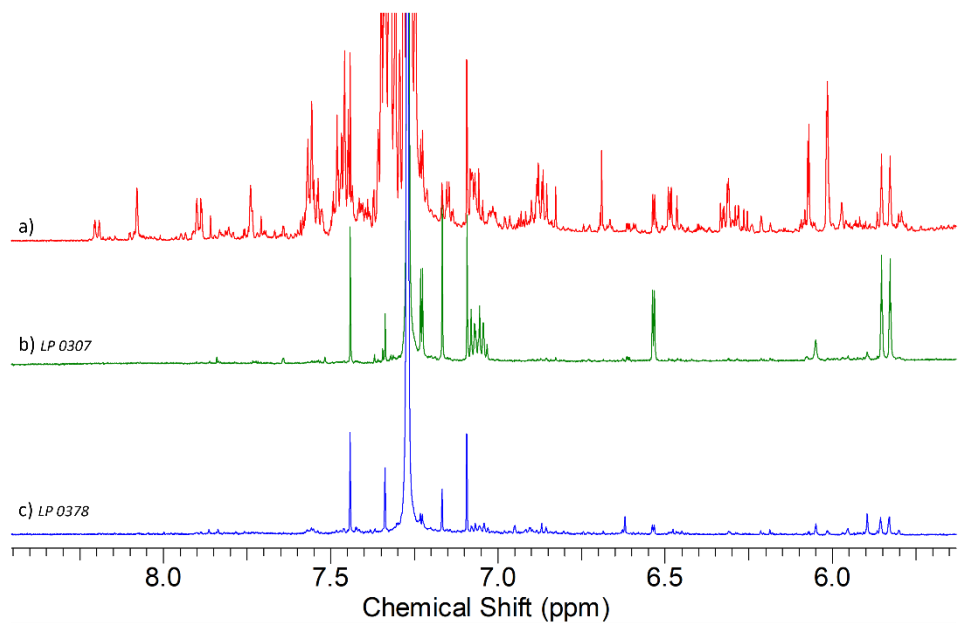
#### **4.9.2 Analisi di tre casi studio**

Per mostrare le potenzialità dell'analisi dell'attività enzimatica nella determinazione del tipo di frode, vengono presentati tre diversi casi di studio, relativi ad alcuni campioni tra quelli mostrati nel paragrafo 4.9.1. Per ciascuno di essi viene presentata sia la valutazione del tipo di frode sia il report finale che deriva dalle analisi effettuate.

##### *CASO A: Nutrizione artificiale delle api*

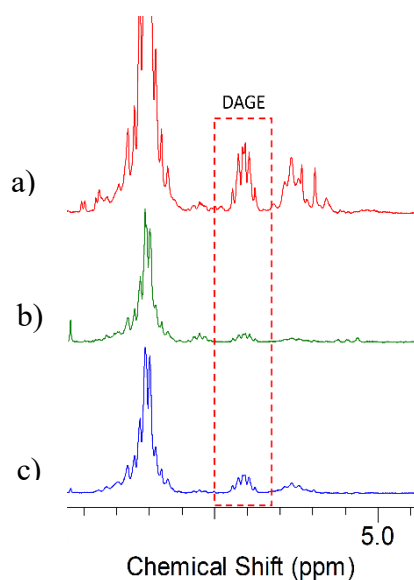
Il primo caso di studio che si riporta riguarda i campioni LP 0307 e 0378 (tabella 33). Il rapporto di analisi del Laboratorio Piana specifica che il miele 0307 presenta caratteristiche insolite dal punto di vista pollinico ed organolettico, mentre il miele 0378 presenta le caratteristiche generali di un classico millefiori; infine, per entrambi viene specificata la presenza di componenti tipiche della Cina.

Dall'analisi dell'attività enzimatica è risultato che i due campioni hanno valori di IN e DN bassi o molto bassi; sono stati quindi osservati gli spettri in cloroformio per capire meglio le caratteristiche dei due mieli. In figura 46 (b) e (c) se ne presenta la zona relativa al fattore aromatico, messa a confronto con quella di un miele millefiori genuino (Fig. 46a).



**Figura 46** Regione espansa della zona aromatica di uno spettro in cloroformio per un miele genuino (a) e per i due sospetti considerati (b) e (c).

Come si può notare, il campione 0307 non presenta evidenti segnali dei composti aromatici, mentre il campione 0378 ne presenta pochi e molto poco intensi rispetto al miele genuino; da queste osservazioni si può quindi pensare che le api abbiano avuto poco contatto con i fiori, tuttavia la presenza del segnale del DAGE a 5.20 ppm, e di altri metaboliti endogeni, fa escludere che i campioni siano completamente artificiali.



**Figura 47** Regione espansa intorno al segnale del DAGE nello spettro in cloroformio del miele genuino (a), e dei due sospetti considerati (b-c)

In figura 47 viene riportata la regione espansa della zona di risonanza di un protone del DAGE, come si può osservare, è presente in entrambi i campioni sebbene in minor quantità rispetto ad un miele genuino; la sua presenza dato che è un composto endogeno indica che c'è stata una lavorazione all'interno dell'alveare.

L'ipotesi più probabile in questo caso è quindi quella di nutrizione artificiale delle api, più spinta nel caso del campione 0307, e leggermente meno spinta nel caso del 0378. Questa supposizione è avvalorata dal fatto che l'attività diastatica del campione 0378 è più alta di quella del 0307, così come lo è anche il DAGE. Si esclude la presenza di diluizione con sciroppi perché in quel caso, dato che in genere i segnali dei composti aromatici sono più alti del segnale del DAGE, sarebbe sparito anche quest'ultimo.

Nelle pagine seguenti viene presentato il report di analisi dei due campioni considerati.

## RISULTATI ANALISI

Campione	LP-0307
Data di arrivo	01-05-2023
Origine botanica dichiarata	Millefiori
Origine botanica accertata	-
Osservazioni	Il campione presenta attività enzimatica e DAGE molto bassi, accompagnati dalla scarsità di composti florali nello spettro in cloroformio. Esso sembra non aver subito riscaldamento. L'ipotesi più accreditata è che vi sia stata nutrizione artificiale delle api.

	Valore	Range di riferimento	Responso
Invertasi (IN)	1.8	7.5-28.4	
Diastasi (DN)	1.2	>8	
DAGE (mg/Kg)	8.91	25-110	
HMF (mg/Kg)	7.76	<40	
Glucosio	29.9	22-38	
Fruttosio	41.7	29- 49	
Rapporto Fruttosio/Glucosio	1.40	1-1.7	
Zuccheri minori endogeni	0.89	1.5-7.5	
Zuccheri minori esogeni	0.06	Assente	
Marcatori melata (g/100g)	Assenti	Assenti	



## RISULTATI ANALISI

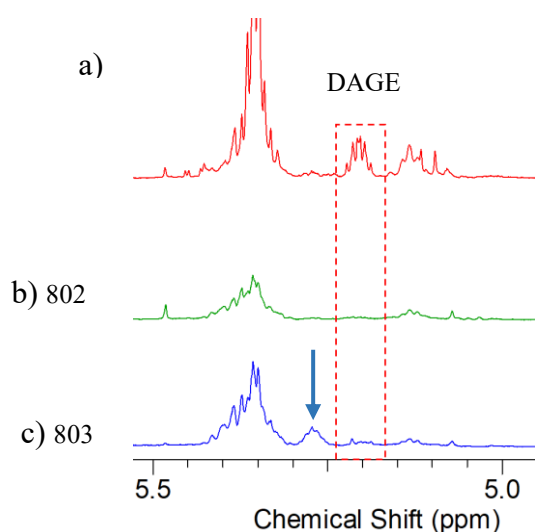
Campione	LP-0378
Data di arrivo	01-05-2023
Origine botanica dichiarata	Millefiori
Origine botanica accertata	-
Osservazioni	Il campione presenta attività enzimatica bassa e basso DAGE, accompagnati dalla presenza di pochi composti florali nello spettro in cloroformio. Esso sembra non aver subito riscaldamento. L'ipotesi più accreditata è che vi sia stata nutrizione artificiale delle api.

	Valore	Range di riferimento	Responso
Invertasi (IN)	3.9	7.5-28.4	
Diastasi (DN)	5.2	>8	
DAGE (mg/Kg)	19.30	25-110	
HMF (mg/Kg)	1.30	< 40	
Glucosio	29.6	22-38	
Fruttosio	42.6	29- 49	
Rapporto Fruttosio/Glucosio	1.44	1-1.7	
Zuccheri minori endogeni	1.88	1.5-7.5	
Zuccheri minori esogeni	0.41	Assente	
Marcatori melata (g/100g)	Assenti	Assenti	

### CASO B: Miele artificiale

Il secondo caso che si vuole presentare è quello relativo ai campioni ICQRF 802 e 803. Dall'analisi dell'attività enzimatica è risultato che essi abbiano valori di IN e DN pressoché pari a zero; quindi, si è deciso di indagare più approfonditamente le loro caratteristiche andando ad osservare gli spettri in cloroformio.

In figura 48 viene riportata la regione espansa dello spettro in cloroformio dove risuonano i segnali del DAGE.



**Figura 48** Regione espansa intorno al segnale del DAGE dello spettro in cloroformio del miele genuino (a) e dei due sospetti considerati (b-c)

Come si può vedere in figura, il DAGE risulta quasi completamente assente nei due campioni sospetti, e anche i valori di attività enzimatica sono vicini allo zero; poiché, DAGE ed enzimi, come precedentemente detto, derivano dalle secrezioni ghiandolari delle api, la loro mancanza fa dedurre che il miele sia completamente artificiale, ovvero realizzato solo con sciroppi. Nel campione 803 si trova inoltre un segnale a 5.25 ppm di intensità anomala; esso è indicato nello spettro in figura 48c con una freccia blu, ed è attribuibile alla presenza di trigliceridi.

Infine, per validare l'ipotesi di essere davanti a due mieli costituiti solo da sciroppi, si sono andati a vedere i risultati delle analisi degli zuccheri in acqua, i quali hanno mostrato presenza di maltotriosio e isomaltotriosio, che derivano generalmente da sciroppi a base di amido, bassi valori di zuccheri endogeni caratteristici e un contenuto molto alto di fruttosio in entrambi, che può derivare ad esempio da sciroppi HFCS o può anche essere aggiunto come sciroppo puro.

Nelle pagine seguenti sono riportati i report di analisi relativi ai due campioni.

## RISULTATI ANALISI

Campione	ICQRF-802
Data di arrivo	05-05-2023
Origine botanica dichiarata	Millefiori
Origine botanica accertata	-
Osservazioni	Il campione non presenta composti florali, né DAGE, e presenta attività enzimatica quasi nulla. Inoltre, dall'analisi dei carboidrati si evince la presenza di oligosaccaridi e zuccheri esogeni, uniti ad alta quantità di fruttosio; essi possono essere associati all'uso di sciroppi di amido e di fruttosio. Il miele si dichiara quindi con buona probabilità artificiale.

	Valore	Range di riferimento	Responso
Invertasi (IN)	1.0	7.5-28.4	Red
Diastasi (DN)	0.5	>8	Red
DAGE (mg/Kg)	3.17	25-110	Red
DA (mg/Kg)	1.73	4-16	Red
HMF (mg/Kg)	38.9	< 40	Green
Glucosio	39.6	22-38	Red
Fruttosio	51.3	29- 49	Red
Rapporto Fruttosio/Glucosio	1.3	1-1.7	Green
Zuccheri minori endogeni	0.718	1.5-7.5	Red
Zuccheri minori esogeni	0.412	Assente	Red
Marcatori melata (g/100g)	Assenti	Assenti	Green

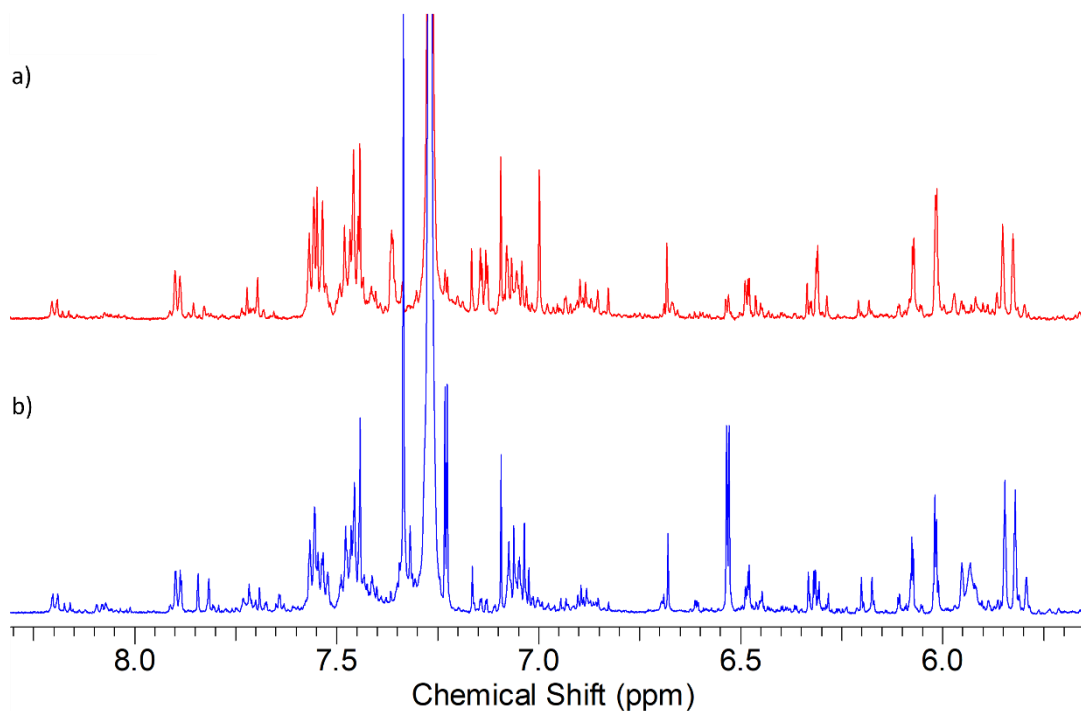
## RISULTATI ANALISI

Campione	ICQRF-803
Data di arrivo	05-05-2023
Origine botanica dichiarata	Millefiori
Origine botanica accertata	-
Osservazioni	Il campione presenta contenuto anomalo di grassi, assenza di composti florali, DAGE e attività enzimatica quasi nulli, HMF poco superiore al limite consentito. Inoltre, dall'analisi dei carboidrati si evince la presenza netta di oligosaccaridi e zuccheri esogeni, che suggeriscono l'utilizzo di sciroppi di amido. Il miele si dichiara quindi con buona probabilità artificiale.

	Valore	Range di riferimento	Responso
Invertasi (IN)	0.7	7.5-28.4	
Diastasi (DN)	0.0	>8	
DAGE (mg/Kg)	5.10	25-110	
DA (mg/Kg)	0.47	4-16	
HMF (mg/Kg)	45	< 40	
Glucosio	39.2	22-38	
Fruttosio	47.3	29- 49	
Rapporto Fruttosio/Glucosio	1.2	1-1.7	
Zuccheri minori endogeni	0.57	1.5-7.5	
Zuccheri minori esogeni	1.28	Assente	
Marcatori melata (g/100g)	Assenti	Assenti	

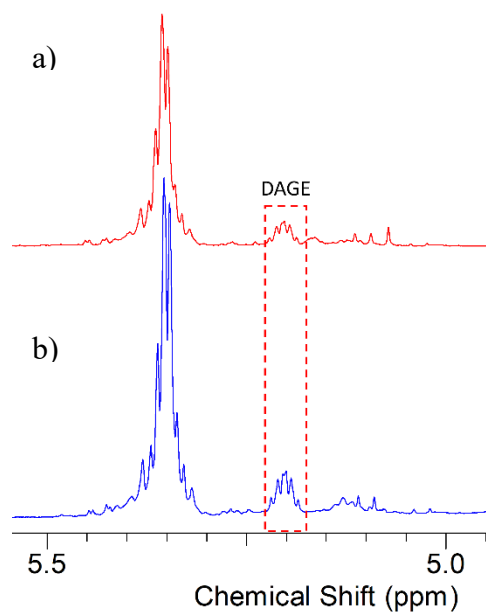
*CASO C: Miele diluito con sciroppi*

Il terzo caso che si riporta è quello del miele ICQRF-790, la cui origine botanica è dichiarata essere Sulla. In figura 49 viene mostrata la zona relativa ai composti florali dello spettro in cloroformio del campione in esame (b), messo a confronto con un miele genuino della stessa tipologia (a).



**Figura 49** Regione florale dello spettro in cloroformio di un campione di miele di sulla genuino (a) e di quello sospetto preso in considerazione (b)

Come si può notare, non ci sono differenze troppo marcate tra i due spettri, quindi non è presente nulla che faccia pensare ad un miele contraffatto o adulterato. Questa considerazione è confermata anche dal DAGE, che almeno dallo spettro, sembra essere coerente con un miele genuino (Fig. 50). Il segnale a 6.5 ppm deriva dalla risonanza di un protone dell'HMF, evidentemente molto alto nello spettro del miele sospetto.



**Figura 50** Regione espansa dello spettro in cloroformio attorno al segnale del DAGE per il miele genuino (a) e quello sospetto preso in considerazione (b).

Nonostante lo spettro in cloroformio non suggerisca adulterazioni evidenti, i valori di attività enzimatica calcolati sono molto bassi, quindi è necessario considerare i dati relativi all'analisi dei carboidrati in acqua. Da esse si constatata la presenza di mannosio, maltotriosio e oligosaccaridi, zuccheri esogeni che indicano l'aggiunta di sciroppi al miele; in questo caso l'ipotesi più plausibile è che vi sia stata una diluizione non esagerata del campione, identificabile solamente con degli zuccheri. La bassa attività enzimatica e l'alto valore di HMF suggeriscono che il miele è stato riscaldato. Nella pagina seguente viene presentato il report relativo al miele considerato.

## RISULTATI ANALISI

Campione	ICQRF-790
Data di arrivo	05-05-2023
Origine botanica dichiarata	Sulla
Origine botanica accertata	-
Osservazioni	<p>Il campione presenta i composti florali tipici della sua origine botanica, così come buoni valori di DAGE e grassi. Tuttavia, l'attività enzimatica risulta molto bassa, così come l'HMF è oltre il limite consentito. Dall'analisi degli zuccheri è emersa la presenza di zuccheri esogeni e oligosaccaridi, che indicano la presenza di sciroppi.</p> <p>Il miele è stato quindi probabilmente diluito e trattato termicamente per omogenizzarlo.</p>

	Valore	Range di riferimento	Responso
Invertasi (IN)	2.4	7.5-28.4	Red
Diastasi (DN)	0.3	>8	Red
DAGE (mg/Kg)	51.48	25-110	Green
DA (mg/Kg)	3.07	4-16	Red
HMF (mg/Kg)	62	< 40	Red
Glucosio	37.2	22-38	Green
Fruttosio	44.04	29- 49	Green
Rapporto Fruttosio/Glucosio	1.2	1-1.7	Green
Zuccheri minori endogeni	5.64	1.5-7.5	Green
Zuccheri minori esogeni	1.02	Assente	Red
Marcatori melata (g/100g)	Assenti	Assenti	Green

## 5. CONCLUSIONI

Il lavoro di tesi presentato ha permesso la messa a punto un nuovo metodo di determinazione dell'attività enzimatica nel miele basato su spettroscopia NMR. La preparazione dei campioni è semplicissima e l'acquisizione dello spettro NMR richiede solo qualche minuto. È stato determinato il calo percentuale di saccarosio e maltosio dopo un tempo di quattro ore dalla preparazione del campione durante il quale gli enzimi agiscono. La correlazione trovata tra questi valori e i dati di IN e DN ottenuti applicando i metodi colorimetrici ufficiali consente di convertire il dato NMR nelle unità di misura ad oggi utilizzate. I risultati ottenuti dalle correlazioni sono promettenti, ( $R^2 = 0.96$  per la diastasi e  $R^2 = 0.944$  per l'invertasi).

Il metodo è stato poi applicato a campioni di miele sospetti di adulterazione, provenienti dal dipartimento ICQRF del Ministero delle politiche agricole, dalla Cina e da un laboratorio di ricerca specializzato nelle analisi polliniche. Inoltre, sono stati approfonditi tre casi diversi tra i mieli sospetti, per mostrare come l'analisi sull'attività enzimatica possa, insieme agli spettri in cloroformio e in acqua, dare indicazioni affidabile sul tipo di comportamento illecito applicato al miele.

I risultati del lavoro di tesi mostrano come la metodologia messa a punto sia accurata e potrebbe andare a sostituire i metodi ufficiali, che sono risalenti agli anni '60. Essa, infatti, presenta numerosi vantaggi rispetto a quelli attualmente in uso, in quanto non necessita di reattivi costosi[29] e la preparazione dei campioni è molto meno laboriosa. La denaturazione termica degli enzimi consente di "stabilizzare" i campioni che non devono essere necessariamente acquisiti ad un tempo stabilito, come invece è previsto nei metodi ufficiali. Inoltre, è possibile preparare numerosi campioni insieme, e acquisirli con un sistema di automazione durante la notte (o in giorni successivi) in modo rapido. Sviluppi futuri possono prevedere l'ottimizzazione del metodo di preparazione dei campioni, in particolare si potrebbe partire da una maggiore quantità di miele al fine di migliorare il campionamento. Inoltre, dovendo di conseguenza, utilizzare un quantitativo maggior di solvente, si potranno preparare i campioni in acqua invece che acqua deuterata e, se necessario, modificare leggermente la sequenza di impulsi dell'esperimento NMR per sopprimere il segnale del solvente; in questo modo si ridurrebbero i costi legati al solvente usato. Inoltre, il metodo potrebbe facilmente essere applicato anche con strumentazioni NMR da 400 MHz, che sono le maggiormente diffuse nei laboratori.





## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. M. Alvarez-Suarez, S. Tulipani, S. Romandini, E. Bertoli, and M. Battino, "Contribution of honey in nutrition and human health: A review," *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 3, no. 1. pp. 15–23, Apr. 2010. doi: 10.1007/s12349-009-0051-6.
- [2] R. Jones, "Prologue: Honey and healing through the ages," *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, vol. 1, no. 1, pp. 2–5, Feb. 2009, doi: 10.3896/ibra.4.01.1.02.
- [3] D. W. Ball, "The Chemical Composition of Honey," 2007. [Online]. Available: [www.JCE.DivCHED.org](http://www.JCE.DivCHED.org)
- [4] H. D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, *Food chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, 2009. doi: 10.1007/978-3-540-69934-7.
- [5] N. Żak and A. Wilczyńska, "The Importance of Testing the Quality and Authenticity of Food Products: The Example of Honey," *Foods*, vol. 12, no. 17. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Sep. 01, 2023. doi: 10.3390/foods12173210.
- [6] White J.W., "Honey," *Adv Food Res*, vol. 24, pp. 287–374, 1978.
- [7] H. Manoochehri, N. F. Hosseini, M. Saidijam, M. Taheri, H. Rezaee, and F. Nouri, "A review on invertase: Its potentials and applications," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 25. Elsevier Ltd, May 01, 2020. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101599.
- [8] L. W. Doner, "The Sugars of Honey-A Review," 1911.
- [9] P. M. Da Silva, C. Gauche, L. V. Gonzaga, A. C. O. Costa, and R. Fett, "Honey: Chemical composition, stability and authenticity," *Food Chemistry*, vol. 196. Elsevier Ltd, pp. 309–323, Apr. 01, 2016. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.051.
- [10] M. P. Sánchez, J. F. Huidobro, I. Mato, S. Muniategui, and M. T. Sancho, "Evolution of invertase activity in honey over two years," *J Agric Food Chem*, vol. 49, no. 1, pp. 416–422, 2001, doi: 10.1021/jf0003350.
- [11] J. S. Bonvehí, M. S. Torrentó, and J. M. Raich, "Invertase activity in fresh and processed honeys," *J Sci Food Agric*, vol. 80, no. 4, pp. 507–512, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(200003)80:4<507::AID-JSFA558>3.0.CO;2-5.

- [12] O. V. Serebryakova and T. M. Rusakova, "Improvements in monofloral honey quality control," in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing Ltd, Jan. 2021. doi: 10.1088/1755-1315/624/1/012149.
- [13] M. VoldřICh, A. RAJChI, and P. CuhRA, "Detection of Foreign Enzyme Addition into the Adulterated Honey," 2009.
- [14] D. Kanelis, V. Liolios, C. Tananaki, and M. A. Rodopoulou, "Determination of the Carbohydrate Profile and Invertase Activity of Adulterated Honeys after Bee Feeding," *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 12, no. 7, Apr. 2022, doi: 10.3390/app12073661.
- [15] I. N. Pasiyas, I. K. Kiriakou, and C. Proestos, "HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration," *Food Chem*, vol. 229, pp. 425–431, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.084.
- [16] C. Makhloufi, K. Taïbi, and L. Ait Abderrahim, "Characterization of Invertase and Diastase Activities, 5-Hydroxymethylfurfural Content and Hydrogen Peroxide Production of Some Algerian Honeys," *Iran J Sci Technol Trans A Sci*, vol. 44, no. 5, pp. 1295–1302, Oct. 2020, doi: 10.1007/s40995-020-00936-x.
- [17] Bogdanov S., "HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION," 2009. [Online]. Available: <https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- [18] P. Atkins and J. De Paula, *Chimica Fisica (quinta edizione italiana)*. Zanichelli, 2012.
- [19] T. D. W. Claridge, *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Oxford Pergamon, 1999.
- [20] E. Schievano, M. Tonoli, and F. Rastrelli, "NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey," *Anal Chem*, vol. 89, no. 24, pp. 13405–13414, Dec. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03656.
- [21] P. T. Robinson, T. N. Pham, and D. Uhrín, "In phase selective excitation of overlapping multiplets by gradient-enhanced chemical shift selective filters," *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 170, no. 1, pp. 97–103, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.jmr.2004.06.004.

- [22] E. Tosi, R. Martinet, M. Ortega, H. Lucero, and E. Ré, “Honey diastase activity modified by heating,” *Food Chem*, vol. 106, no. 3, pp. 883–887, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.025.
- [23] L. Persano, O. Maria, G. Piazza, and P. Pulcini, “Invertase activity in honey,” *Apidologie*, vol. 30, pp. 57–65, 1999.
- [24] L. Persano, O. E. Baldi, and M. Accorti, “Diastatic activity in some unifloral honeys,” *Apidologie*, vol. 21, pp. 17–24, 1990.
- [25] E. Schievano, A. Dettori, L. Piana, and M. Tessari, “Floral origin modulates the content of a lipid marker in *Apis mellifera* honey,” *Food Chem*, vol. 361, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130050.
- [26] K. Astwood, B. Lee, and M. Manley-Harris, “Oligosaccharides in New Zealand Honeydew Honey,” *J Agric Food Chem*, vol. 46, no. 12, pp. 4958–4962, 1998, doi: 10.1021/jf980720d.
- [27] E. Schievano, L. Piana, and M. Tessari, “Automatic NMR-based protocol for assessment of honey authenticity,” *Food Chem*, vol. 420, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136094.
- [28] E. Schievano, A. Dettori, L. Piana, and M. Tessari, “Floral origin modulates the content of a lipid marker in *Apis mellifera* honey,” *Food Chem*, vol. 361, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130050.
- [29] L. González-Ceballos *et al.*, “Polymer film as starch azure container for the easy diastase activity determination in honey,” *Food Chem*, vol. 355, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129629.