UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

APPLICAZIONI NMR PER IL CONTROLLO QUALITATIVO DEL MIELE

Relatore: Prof. Elisabetta Schievano

Laureanda: Francesca Alverà

1194635

Anno Accademico: 2021/2022

INDICE

Introduzione	5
Origine del miele	6
Composizione chimica	7
Adulterazioni e contraffazioni del miele	11
Metodi per l'analisi del miele	12
Spettroscopia NMR nell'analisi del miele	15
Applicazioni	18
Conclusioni	24
Bibliografia	25

INTRODUZIONE

Il miele è una sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante (melata) che esse bottinano, trasformano combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare. (Direttiva 2001/110/CE del 20 dicembre 2001).
È un alimento molto apprezzato grazie al suo notevole valore energetico, ai suoi molteplici utilizzi (dalla cucina alla cosmesi) e in virtù delle sue proprietà, note fin dall'antichità. Le prime testimonianze di allevamenti di api provengono, infatti, dall'Antico Egitto. Nel mondo greco e romano il miele assunse persino un valore sacro e un'origine divina, fino a diventare di uso costante nel Medioevo. Esistono tantissime varietà di miele, ognuna con le proprie caratteristiche e proprietà: per esempio il miele di acacia è antinfiammatorio, quello di millefiori è un ottimo tonificante, il miele di tiglio possiede proprietà rinfrescanti e quello di castagno migliora la circolazione sanguigna. I mieli possono essere classificati anche in base all'origine: mieli di fiori (o di nettare) e i mieli di melata. Un'ulteriore classificazione all'interno dei mieli di nettare distingue quelli monofloreali da quelli multifloreali. Ogni miele è quindi unico nelle sue caratteristiche organolettiche sulla base della chimica, la quantità e la combinazione dei diversi componenti. Dal punto di vista economico il miele ha sempre mantenuto un ruolo importante nel mercato, godendo di stabilità economica, che ha contribuito all'aumento e diffusione di frodi, per esempio con aggiunte al prodotto di sciroppi zuccherini. Ad oggi il miele è infatti al sesto posto nell'elenco di prodotti a rischio frode secondo la Commissione Europea. La maggior parte delle tecniche analitiche utilizzate coinvolgono un pretrattamento del campione. Il processo di caratterizzazione complessivo è, di per sé, laborioso e dispendioso in termini di tempo e non sempre riproducibile. La tecnica NMR è usata per ottenere informazioni strutturali e può aiutare a capire la struttura dei componenti in sistemi complessi come il cibo. I vantaggi della tecnica NMR sono l'approccio non invasivo, l'acquisizione relativamente facile e veloce dei dati e la possibilità di ricavare informazioni su un vasto range di metaboliti in un singolo esperimento e la preparazione del campione è quasi trascurabile. La ricchezza di informazioni rende lo spettro molto complesso e difficile da analizzare. Vengono perciò utilizzate analisi multivariate applicate direttamente ai dati dello spettro per estrarne le informazioni utili. La combinazione di dati NMR con analisi chemiometriche possono inoltre dare risultati interessanti per l'autenticazione del cibo in generale come dimostrato in differenti lavori (Beretta, Caneva, Regazzoni, Bakhtyari, & Facino, 2008; Boffo, Ferreira, & Ferreira, 2009; Boffo, Tavares, Ferreira, & Ferreira, 2009; Consonni & Cagliani, 2008; Prestes et al., 2007; Schievano, Peggion, & Mammi, 2010).

ORIGINE DEL MIELE

Come accennato precedentemente, il miele è prodotto dalle api dal nettare e dalla melata. La melata viene prodotta da insetti (produttori di melata) che succhiano il nettare dalla pianta, trattenendo l'azoto ed espellendo il liquido zuccherino in eccesso sottoforma di melata. La melata, inoltre, contiene enzimi prodotti dall'insetto e responsabili della formazione di zuccheri diversi rispetto a quelli del nettare. Per produrre il miele l'ape trasporta il nettare, o melata, all'alveare. A questo punto la goccia di nettare passa da un'ape all'altra. Questo processo è molto importante perché provoca la concentrazione e la trasformazione enzimatica degli zuccheri. La concentrazione avviene per evaporazione dell'acqua presente nel nettare o nella melata, grazie all'aria secca e calda dell'alveare e alla grande superficie di scambio offerta dalla lingua allungata dell'ape. La goccia viene poi depositata nelle celle dove avviene una ulteriore concentrazione fino ad ottenere il miele maturo, con un tenore di acqua del 18% necessario per evitare processi fermentativi. Una volta che le celle sono piene vengono sigillate con un tappo di cera. La trasformazione degli zuccheri avviene grazie alle secrezioni ghiandolari dell'ape che contengono enzimi in grado di modificarne la natura. Particolarmente importante è l'azione di una invertasi in grado di scindere il saccarosio in glucosio e fruttosio. Il miele è ottenuto da nettari con composizione in zuccheri molto diversa: l'azione enzimatica comporta una standardizzazione degli zuccheri; infatti, c'è poca differenza nella composizione in zuccheri del miele proveniente da nettari diversi. A questo punto, dal miele maturo, l'apicoltore procede con diverse fasi di lavorazione per ottenere un miele commercializzabile (secondo la legge italiana non può essere aggiunto né sottratto alcun suo componente):

1. Estrazione dei melari (Figura 1)
2. Stoccaggio dei melari
3. Disopercolatura: rimozione del "tappo" di cera delle celle nei melari.
4. Smielatura: raccolta del miele in vasche grazie alla forza centrifuga operata negli smielatori.
5. Filtraggio: raccolta dei residui di cera, resti i api e altri materiali.
6. Decantazione: eliminazione dell'aria acquisita nella fase di smielatura, con produzione di schiuma superficiale.
7. Schiumatura: eliminazione della schiuma prodotta nella fase di decantazione.
8. Confezionamento: invasettamento in contenitori isolati ermeticamente, prima della cristallizzazione.

Figura 1 Estrazione dei melari.

COMPOSIZIONE CHIMICA

La composizione chimica del miele dipende dalla fonte botanica da cui le api hanno ricavato il nettare, dalla regione di produzione e dal processo di lavorazione. Viene considerato una soluzione satura di zuccheri (75-80% zuccheri e 16-18% acqua). La restante percentuale (0.1-3%) di miele è composta da diverse sostanze come peptidi e amminoacidi, enzimi, composti fenolici, metalli (calcio, magnesio, ferro, rame, manganese, silicio, iodio, potassio, sodio, fosforo, zolfo), vitamine (A, gruppo B, C, E, K) e sostanze che caratterizzano il profilo aromatico, carotenoidi, terpeni e acidi organici (Figura 2). La presenza e la concentrazione delle diverse sostanze varia a seconda delle specie botaniche e sono diagnostici per stabilirne l'origine botanica, geografica ed entomologica. A causa della loro bassa concentrazione, per poterli studiare è necessario estrarli dalla soluzione soprasatura di zuccheri. Un solvente adatto all'estrazione di composti terpenici e polifenoli è il cloroformio. Al miele disciolto in acqua si aggiunge cloroformio, si agita e si centrifuga; la fase organica recuperata viene seccata e ripresa con cloroformio deuterato.

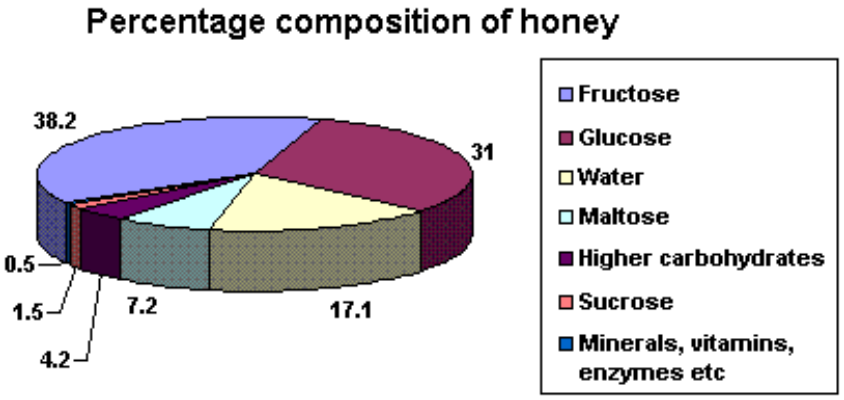

Figura 2 Diagramma dei componenti principali del miele

Zuccheri

Dal punto di vista degli zuccheri presenti è l'alimento più complesso, con un profilo zuccherino ben distinto. Il 75% circa degli zuccheri del miele è rappresentato da glucosio e fruttosio (figura 3). L'alto contenuto di zuccheri del miele contribuisce in modo significativo alle sue proprietà fisiche come viscosità, igroscopicità, e stato fisico, oltre che alle sue proprietà alimentari come il valore energetico e il potere dolcificante. Il fruttosio, per esempio, contribuisce a rendere il miele più dolce (il suo potere dolcificante è pari a 1,7, mentre per il glucosio è 0,7) ed essendo molto solubile in acqua permette di conservare il miele allo stato liquido. Un alto contenuto di glucosio, invece, porta ad una maggiore cristallizzazione del miele.

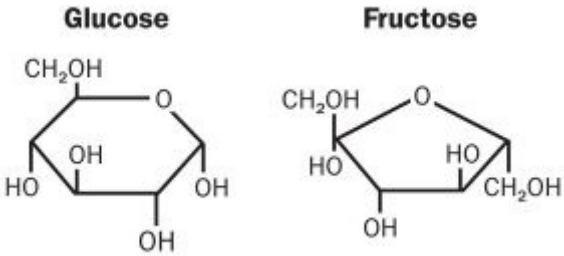

Figura 3 Struttura del glucosio e del fruttosio.

La restante parte sono zuccheri minoritari (disaccaridi e oligosaccaridi) derivanti direttamente dal nettare o formati in seguito all'azione degli enzimi, principalmente l'invertasi, secreto dalle api. Questi non influiscono sulle proprietà fisiche e organolettiche,

ma possono essere utili per determinare l'origine botanica del miele; infatti, la loro composizione dipende dalla pianta dalla quale esso deriva. Ad oggi sono stati identificati più di 20 zuccheri minori. I principali disaccaridi presenti sono maltosio (Figura 4), turanosio, isomaltosio, palatinosio, koijbiosio, nigerosio e maltulosio presenti in concentrazioni simili in tutte le tipologie botaniche. Altri zuccheri invece sono più variabili e la loro concentrazione dipende dall'origine botanica: l'erlosio (Figura 4), per esempio, è maggiormente concentrato nei mieli di acacia, il melezitosio invece è presente solo nei mieli di melata.

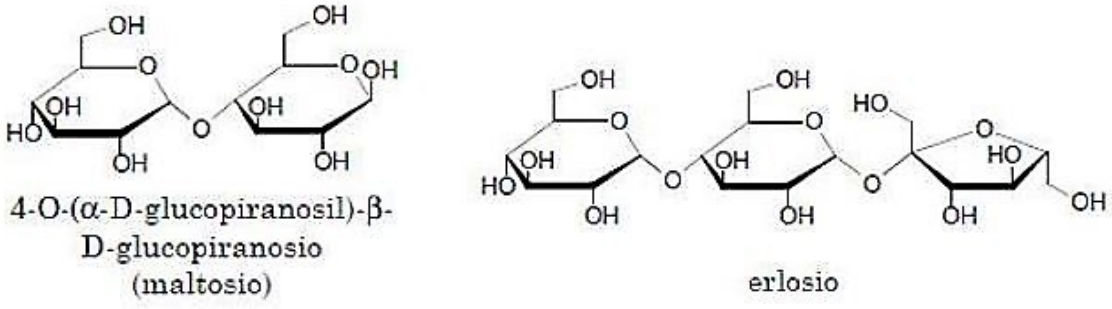

Figura 4 Struttura del maltosio e dell'erlosio.

Acqua

Il contenuto di acqua nel miele è di circa il 17% (Figura 2) e influenza la conservabilità e la lavorabilità. Percentuali troppo alte (maggiori del 20%) di acqua facilitano processi di fermentazione (degradazione del prodotto), mentre percentuali troppo basse rendono difficile la lavorabilità. I fattori che influenzano il contenuto di acqua sono: origine botanica, condizioni ambientali e atmosferiche, stagione di produzione, lavorazione dell'apicoltore e condizioni di conservazione.

Acidi organici

Anche se in piccole quantità (in peso 0,1-1%) nel miele sono presenti acidi organici che rendono il pH acido, con valori solitamente compresi tra 3,6 e 4,8. [1] L'acido presente in maggiore quantità è l'acido gluconico, importante per l'aroma del miele. Altri acidi organici presenti nel miele sono: acetico, butirrico, lattico, citrico, succinico, formico, maleico, malico e ossalico. L'acidità del miele contribuisce a determinare la stabilità del prodotto nei confronti dei microrganismi; perciò, il pH deve sempre essere tenuto sotto controllo durante l'estrazione e il confezionamento del miele in modo da evitare possibili contaminazioni microbiche. L'acidità aumenta con l'invecchiamento comportando la perdita progressiva delle sostanze aromatiche e la diminuzione dell'attività degli enzimi.

Sostanze minerali

Nel miele sono presenti anche diverse sostanze minerali come K, Na, Ca, Mg, Cl, S, P, Si, Fe, Mn, e Cu, anche se in percentuale molto bassa (0,02-1%) e variabile. Il colore è fortemente influenzato da queste sostanze: i mieli chiari ne sono poveri mentre quelli scuro ne sono ricchi. [2] La loro presenza e concentrazione varia in base all'origine botanica e geografica [3], perché causata dall'assorbimento attraverso la linfa dei minerali contenuti nel terreno.

Proteine e amminoacidi

In genere il miele è povero di proteine e amminoacidi, che possono essere presenti nel nettare, nella melata o nel polline, oppure possono provenire da secrezioni delle api. La prolina è l'amminoacido presente in maggiore quantità [4]. Altri amminoacidi solitamente presenti sono l'arginina, l'istidina, la leucina, la lisina e la metionina.

Enzimi e vitamine

Gli enzimi presenti nel miele derivano dal nettare, dalla melata o dalle secrezioni ghiandolari delle api. Sono importanti perché catalizzano le reazioni che portano al prodotto del miele. Rappresentano, inoltre, l'indice di freschezza del miele, perché si degradano con il tempo e in seguito a trattamenti termici. I principali enzimi del miele sono l'invertasi e glucosio ossidasi, secreti da specifiche ghiandole delle api, le diastasi (o le amilasi) di origine sia animale che vegetale ed infine le catalasi e fosfatasi che derivano dal nettare e dalla melata. In figura 5 si riporta: A) l'attività della glucosio ossidasi che, in presenza di acqua, provoca l'ossidazione del glucosio con liberazione di acido gluconico e acqua ossigenata, B) l'attività dell'enzima invertasi che catalizza l'idrolisi del legame glicosidico del saccarosio, formando i due monomeri che lo costituiscono, C) l'attività della catalasi che catalizza la conversione dell'acqua ossigenata in acqua e ossigeno, D) l'attività della diastasi che in presenza di acqua scinde gli oligosaccaridi in composti più semplici.

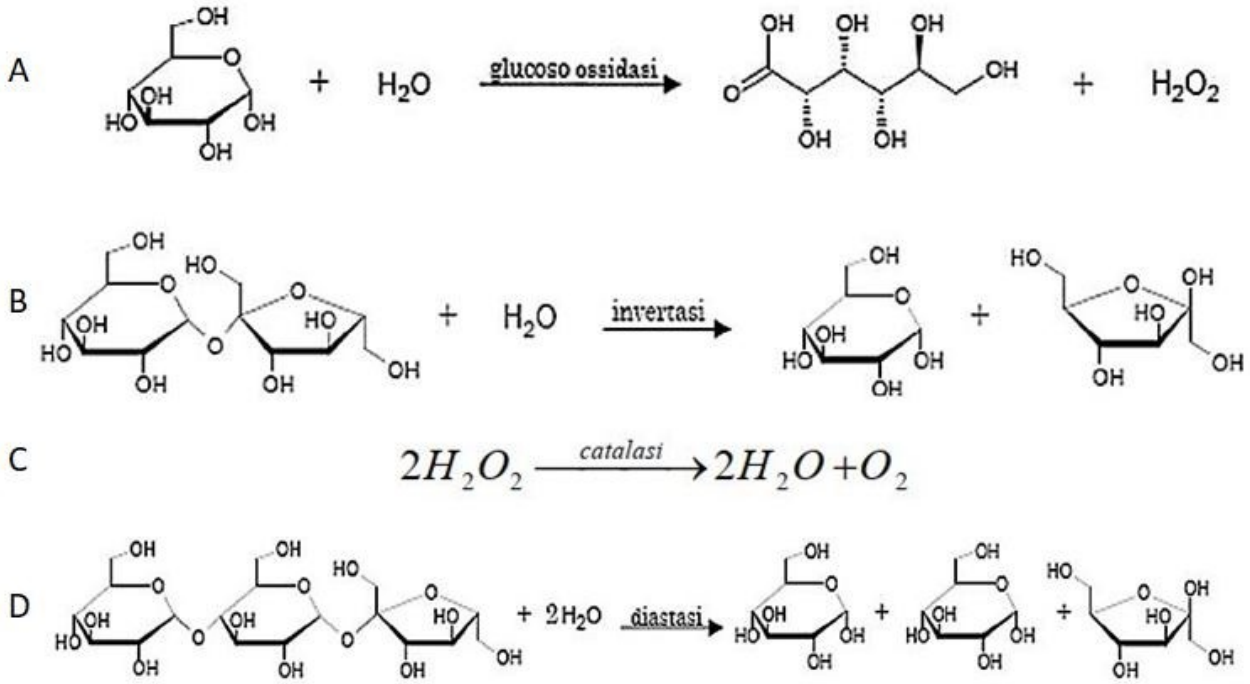

Figura 5 A) Ossidazione del glucosio catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi. B) Idrolisi del legame glicosidico del saccarosio catalizzata dall'enzima invertasi. C) Conversione dell'acqua ossigenata in acqua e ossigeno catalizzata dall'enzima catalasi. D) Scissione degli oligosaccaridi in composti più semplici data dall'enzima diastasi.

Dal punto di vista vitaminico, il miele è estremamente povero. Le vitamine presenti derivano dal polline e appartengono al gruppo delle idrosolubili (tiamina, riboflavina, acido ascorbico, piridossina, acido pantotenico, biotina, acido folico, niacinamide).

Costituenti minori

Composti aromatici e sostanze volatili: contribuiscono a caratterizzare l'aroma del miele e sono differenti per ogni specie. Risulta difficile identificarle perché volatili e termolabili, anche se alcune sono state determinate attraverso tecniche NMR e gascromatografiche. Possono differire a seconda del nettare, delle condizioni di produzione, dell'origine e della conservazione. Sono presenti a concentrazioni molto basse e comprendono monoterpeni, sesquiterpeni, derivati del benzene e in minima parte alcoli superiori, esteri, acidi grassi, chetoni, terpeni e aldeidi. Un esempio è il siringato di metile, marcatore botanico del miele di asfodelo o l'acido fenillatico per il miele di cardo [7].

Lipidi: la loro presenza è dovuta a cere residue ed è praticamente nulla.

Esteri ed alcoli: sono di diversi tipi in base all'origine del miele.

Idrossimetilfurfurale: assente nel miele appena estratto, si forma successivamente a causa della degradazione degli zuccheri, in particolare del fruttosio in ambiente acido. È perciò indice di freschezza: la sua concentrazione aumenta con il tempo e con trattamenti termici. Mieli di buona qualità hanno valori di 20 mg/Kg di HMF.

Propoli: presente in tracce all'interno del miele, viene raccolta dalle api dalla corteccia delle piante ed elaborata con aggiunte di cera, polline ed enzimi da esse.

Sostanze aggiunte dall'uomo: L'acido ossalico, l'acido formico e l'acido lattico vengono aggiunti per combattere un acaro parassita delle api. Eventuali sostanze nocive aggiunte dall'uomo per uccidere i parassiti devono rientrare nei valori di soglia stabiliti dalle normative vigenti.

ADULTERAZIONI E CONTRAFFAZIONI DEL MIELE

Le frodi alimentari possono essere di due tipi: adulterazione, cioè vendita di generi alimentari con caratteristiche diverse da quelle dichiarate, e contraffazione, cioè imitazione fraudolenta di un prodotto la cui composizione viene regolata per legge da particolari norme.

In seguito all'esposizione del prodotto a particolari condizioni ambientali o di lavorazione, il miele può subire delle modifiche. Queste possono avvenire nel tempo o per eccessivo riscaldamento. Sottoponendo, infatti, il miele ad alte temperature vengono distrutti i cristalli di glucosio con conseguente denaturazione di enzimi e vitamine, ottenendo un miele liquido. La cristallizzazione, invece, non è un'adulterazione! Essa, infatti, modifica solo l'aspetto del prodotto, ma non influenza alcuna caratteristica o proprietà nutritiva.
Un esempio di modifica causata da particolari condizioni ambientali, invece, è la trasformazione del fruttosio in HMF a causa dell'ambiente acido. L'acidità può aumentare con l'invecchiamento, la fermentazione o se il miele viene estratto da favi fortemente propolizzati. L'HMF è quindi un indice di freschezza e di stato di conservazione del miele. La normativa vigente impone il limite massimo di 40 mg/kg di prodotto per il 5-HMF.
Anche l'imbrunimento del miele è dovuto a trasformazioni chimiche: luce e temperatura causano infatti la caramellizzazione. Il degrado microbiologico, invece, è dovuto all'igroscopicità del miele: per quanto il miele sia un prodotto stabile dal punto di vista microbiologico grazie allo scarso contenuto di acqua e alla sua acidità, un aumento al 20% di acqua ad un'adeguata temperatura favorisce processi fermentativi che provocano danni irreversibili come schiuma e odore anomalo. La determinazione del miele fermentato avviene tramite analisi del glicerolo e dell'etanolo.
Se le modifiche vengono apportate in fase di produzione con l'intento e la volontà di modificare le caratteristiche e le proprietà del miele, senza dichiararle si parla di adulterazione. Nel caso del miele le adulterazioni più comuni sono: diluizione con sciroppi, alimentare le api con zuccheri, mascherare i paesi di origine, residui di antibiotici dopo dosi veterinarie eccessive.

Le principali contraffazioni sono quelle dell'origine botanica e geografica.
Nel caso dell'origine geografica il miele è venduto con una denominazione che non gli corrisponde. Il miele è un prodotto legato al territorio di produzione, in quanto le sue caratteristiche di composizione e organolettiche derivano principalmente dal tipo di flora bottinata, variazioni di vegetazione, tipo di suolo, inquinamento, tecniche di produzione, lavorazione e trasporto. Gli spettri pollinici possono essere facilmente modificati nel corso della lavorazione, proprio con la finalità di frode, attraverso miscelazione tra mieli diversi o eliminando il polline presente in esso attraverso filtrazione spinta e sostituendolo poi con pollini di altre origini.

Nel caso dell'origine botanica sono frequenti errori di valutazione del prodotto da parte dell'apicoltore e dei commercianti. L'analisi melissopalinologica rappresenta l'unica soluzione oggettiva che permetta di avere informazioni relative all'origine botanica e geografica di un miele. Essa si basa sullo studio dei granuli pollinici presenti in un miele derivanti dai fiori che l'ape ha visitato alla ricerca del nettare, i quali rimangono in sospensione. Il problema, quindi, se guardato dal punto di vista del consumatore, non sta nel definire una percentuale minima di origine, ma nel precisare dei limiti di composizione e

di caratteristiche che facciano sì che il consumatore riscontri nel miele comprato tutte le caratteristiche (per esempio colore, aspetto fisico, odore e sapore) proprie della specie botanica desiderata. Il controllo può essere fatto attraverso la verifica della corrispondenza alle caratteristiche organolettiche, chimico-fisiche e microscopiche standard. Per alcuni tipi di mieli più comuni sono riportate in letteratura le schede con le loro caratteristiche specifiche e sarà quindi sufficiente solo la verifica organolettica. Quando invece il risultato della smielatura è diverso dall'atteso (per esempio l'acacia è troppo scura o saporita, il castagno comincia a cristallizzare due mesi dopo la produzione) è necessario verificare se il prodotto, visibilmente meno puro della norma, rientra o no negli standard previsti. Una contraffazione comune consiste nell'alimentare api con dolcificanti.

Le adulterazioni intenzionali degli alimenti a scopo economico sono descritte dall'EMA (Economically Motivated Adulteration). Solitamente si tratta di etichettature errate (ad esempio false affermazioni sull'origine geografica di un prodotto alimentare), l'aggiunta di sostanze al cibo per aumentarne l'apparente qualità, l'aggiunta di sostanze diluenti per diluire o sostituire il materiale genuino con un materiale più economico. La sostituzione non dichiarata con ingredienti alternativi, oltre ad essere una frode economica e della qualità, è un rischio per la salute a causa dei requisiti di etichettatura degli allergeni.

METODI PER L'ANALISI DEL MIELE

Al fine di tutelare il miele e valorizzarne la qualità, il controllo analitico prevede diverse valutazioni che riguardano i parametri chimico fisici, le caratteristiche organolettiche, l'origine botanica e la specificità geografica. Oltre a questi elementi di valutazione legati essenzialmente alla tipicizzazione specifica del prodotto, vengono fatti anche i controlli sull'autenticità, intesa come assenza di adulterazioni quali ad esempio l'aggiunta volontaria di zuccheri esogeni. Di seguito vengono riportate e descritte alcune delle analisi convenzionali che vengono effettuate per il controllo della genuinità e provenienza del miele. Costituiscono verifiche di parametri previsti dalla legislazione per il controllo dei requisiti di composizione del miele immesso nel mercato (Decreto Ministeriale 25/07/2003) (Cabras, Tuberoso 2004).

Acqua

Per determinare il contenuto di acqua (o umidità) si procede analizzando l'indice di rifrazione del campione del miele, che è in relazione alla quantità di acqua ad una data temperatura (formula di Wedmore). La determinazione analitica del contenuto di acqua è importante perché condiziona la conservabilità del prodotto.

Sostanze insolubili in acqua

La determinazione di sostanze insolubili in acqua avviene per via gravimetrica ed è importante per la valutazione della pulizia del prodotto. Le sostanze insolubili possono essere naturalmente presenti nel miele, come ad esempio granuli pollinici e indicatori di melata, oppure possono essere di natura estranea, come ad esempio cera, polvere, frammenti di insetti. La procedura analitica prevede una filtrazione sotto aspirazione di una soluzione di miele, lavando accuratamente con acqua calda fino ad eliminare gli zuccheri ed essiccando.

Conducibilità elettrica

La conducibilità elettrica è utilizzata come criterio per definire l'origine botanica, in modo particolare per differenziare i mieli di nettare dei mieli contenenti melata o dai mieli scuri. La determinazione di questo parametro si basa su misure della resistività specifica di una soluzione di miele in acqua bidistillata, la quale si misura con un conduttimetro con cella di conducibilità ad immersione con elettrodi di platino platinato, a 20°C.

pH e acidità libera, acidità combinata e acidità totale

L'acidità è un parametro importante per la valutazione dell'origine botanica e della qualità del miele ed è dovuta alla presenza di acidi organici in forma libera e combinata (lattoni). La procedura analitica prevede la diluizione del campione di miele in acqua distillata esente da anidride carbonica. La soluzione viene titolata con NaOH fino a pH 8.5 (determinazione dell'acidità libera). Dopo una successiva aggiunta di NaOH che idrolizza i lattoni, si retrotitola con HCl fino a pH 8.3 (determinazione dell'acidità combinata). L'acidità totale è data dalla somma dell'acidità libera e combinata.

Attività diastasica e invertasica

Gli enzimi α- e β-transglucosidasi (attività diastatica) e gli enzimi invertasi (attività invertasica) sono naturalmente contenuti nel miele e sono indice di freschezza, in quanto diminuiscono durante la conservazione o con trattamenti termici. Per determinare questi parametri si applica un metodo spettrofotometrico: il miele viene messo in contatto, in soluzione, con un substrato (amido a cui è legato un cromoforo per l'attività diastasica, p-nitrofenil-α-D-glucopiranoside per l'attività invertasica). L'attività enzimatica libera frammenti solubili colorati la cui assorbanza è direttamente proporzionale all'attività stessa.

Determinazione del contenuto di idrossimetilfurfurale (HMF)

L'idrossimetilfurfurale è un prodotto dalla degradazione degli zuccheri. È indice di freschezza in quanto nel miele appena estratto è assente o poco presente, mentre durante la conservazione o in seguito a trattamenti termici aumenta. Per determinare il contenuto di HMF la soluzione di miele viene iniettata in HPLC con rivelatore UV, operando in fase inversa. La risposta strumentale viene correlata alla risposta ottenuta con una soluzione a concentrazione nota di HMF.

Determinazione del contenuto di zuccheri

L'analisi del contenuto di zuccheri è necessaria per identificare possibili adulterazioni con aggiunte di sciroppi zuccherini al miele. Valori significativi di oligosaccaridi e polisaccaridi o valori discostanti dal normale valore del rapporto fruttosio/glucosio identificano mieli adulterati da sciroppi economici. Le adulterazioni con sciroppi pregiati, invece, risultano difficili da identificare, in quanto il contenuto di fruttosio, glucosio ed oligosaccaridi è molto simile a quello presente nel miele. Fruttosio, glucosio e saccarosio sono determinati tramite HPLC, mentre l'identificazione e quantificazione di tutti gli zuccheri avviene attraverso un sistema gascromatografico su soluzione di miele trattate con un reattivo silanizzante, per confronto con una miscela di riferimento a concentrazione nota.

Determinazione del contenuto di prolina

Un altro parametro utile per la valutazione della freschezza e delle adulterazioni del miele è la prolina, che viene trasferita dalle api al miele durante la formazione di quest'ultimo. Per la sua determinazione viene utilizzata un metodo spettrofotometrico basato sulla formazione di un complesso colorato con la ninidrina: dopo aggiunta di 2-propanolo viene determinata l'estinzione della soluzione campione e della soluzione di riferimento a 512 nm. Risulta critico il rispetto dei tempi e delle temperature previste nelle varie operazioni del metodo.

Colore

Il colore del miele è un parametro importante nella scelta del prodotto da parte del consumatore. È determinato da diversi fattori, come il fiore da cui le api raccolgono il nettare, dalla zona in cui viene prodotto e dall'annata. L'analisi viene svolta da diversi strumenti e messo in rapporto a una scala di colori di riferimento. Si applica un'analisi colorimetrica, come descritto nella norma UNI 11375, del 2010.

Profilo organolettico

Il profilo organolettico permette di valutare il miele dal punto di vista visivo, olfattivo, gustativo, tattile in due livelli: uno analogo alla valutazione del consumatore, uno corrispondente ai requisiti organolettici minimi definiti per legge. (norme ISO 6564, 1985 & ISO 6658, del 2005).

Etanolo e glicerolo

La determinazione dell'etanolo e glicerolo non è prevista dalla legge ma è utile per una valutazione merceologica del miele in quanto i due alcoli indicano processi di fermentazione, non accettabili per un miele destinato al consumo diretto. Si applica un'analisi enzimatica, come descritto nelle norme UNI 11273 e UNI 11274, del 2008.

Analisi melissopalinologica (Analisi Pollinica)

Metodo ufficiale per la determinazione dell'origine botanica e geografica del miele, questa analisi viene sempre abbinata all'analisi organolettica e alla determinazione dei parametri chimico-fisici sopra descritti, che sono influenzati dall'origine botanica e geografica. Il riconoscimento dei diversi pollini presenti a livello microscopico richiede attrezzature poco costose, di suo contro però, è un metodo difficilmente standardizzabile e riproducibile, oltre alla necessità di un personale altamente specializzato.

Determinazione del rapporto isotopico $^{13}C/^{12}C$ degli zuccheri

Quando le analisi precedentemente descritte non forniscono una risposta certa viene eseguita l'analisi del rapporto isotopico $^{13}C/^{12}C$ degli zuccheri. Il principio si basa sul fatto che il contenuto di ^{12}C e ^{13}C degli zuccheri dipende dalla pianta da cui derivano. Le api preferiscono andare a bottinare piante con ciclo C3 per la fissazione della CO_2, raramente visitano piante C4. Il nettare che recuperano e il miele che se ne originerà avrà un rapporto isotopico $^{13}C/^{12}C$ tipico delle piante C3. I vari adulteranti, invece, possono derivare sia da piante di tipo C4, come il mais e la canna da zucchero, che da piante C3 come riso, barbabietola e frumento. La procedura analitica utilizzata si basa sulla spettrometria di massa accoppiata all'analisi elementare (EA-IRMS), in grado di individuare aggiunte di zucchero di canna e di mais anche del 7-10%. L'accoppiamento del sistema EA-IRMS con

la cromatografia liquida (EA/LC-IRMS), permette di rivelare aggiunte sia di sciroppi C4 che di sciroppi C3, con una sensibilità che va dall'1% al 10% in base alla tipologia di adulterante utilizzato.

SPETTROSCOPIA NMR NELL'ANALISI DEL MIELE

L'utilizzo della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) recentemente ha mostrato enormi potenzialità nel campo della tracciabilità del miele. La combinazione di molti metodi analitici, oltre agli alti costi e alla quantità di tempo richiesta, non permettono un controllo frequente e a largo spettro e non garantiscono, di conseguenza, un efficace controllo di qualità e autenticità. A questo scopo può essere utilizzato un approccio NMR basato sulla metabolomica, ovvero la scienza che studia i metaboliti delle reazioni chimiche che avvengono normalmente negli organismi viventi e nei prodotti da essi direttamente derivati. Lo scopo è quello di ottenere un profilo completo dell'alimento, detto "fingerprint". Questa tecnica innovativa è già estesamente utilizzata per il controllo e per l'analisi di alimenti pregiati e al tempo stesso difficilmente controllabili nelle filiere produttive come vino, succhi di frutta, olio di oliva, formaggi, tè e caffè. La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare vanta infatti un vastissimo campo di applicazioni e viene spesso affiancata ad altre tecniche analitiche per la risoluzione di problematiche che richiedono un approccio multidisciplinare, come lo studio della qualità e della genuinità dei prodotti alimentari. La Risonanza Magnetica Nucleare è in grado di identificare la provenienza geografica, la varietà e la qualità del miele. Un vantaggio dell'analisi metabolomica svolta via NMR è la possibilità di eseguire analisi multicomponenti: riusciamo ad identificare con precisione simultaneamente gli zuccheri e i composti minori, specifici dell'origine botanica del fiore da cui è stato preso il nettare. Acidi organici, fenoli, composti aromatici, terpeni e vitamine sono infatti marker botanici dell'origine del miele e vengono utilizzati per la tracciabilità del prodotto finale. Proprio per questo motivo, la Risonanza Magnetica Nucleare viene in supporto alle esigenze dei consumatori e degli operatori agro-alimentari per garantire una maggior qualità, certificazione di origine, tracciabilità delle filiere e non ultimo per il sostegno del prodotto "made in Italy".

Un altro vantaggio delle analisi svolte con l'NMR è la possibilità di studiare il miele semplicemente diluendolo con un solvente polare (acqua o dimetilsolfossido deuterati), oppure dopo una estrazione con un solvente organico per l'analisi di composti minoritari

Gli spettri ^{1}H-NMR permettono una rapida e facile estrazione delle informazioni globali in una singola analisi, oltre che a conservare i rapporti delle sostanze presenti nella matrice complessa del miele. In Figura 6 si riporta lo spettro NMR di un miele disciolto in acqua. Sono distinguibili tre zone diverse: la prima alifatica (δ 0,0–3,0 ppm), la seconda regione tipica degli zuccheri (δ 3,0–6,0), e infine quella dei composti aromatici (δ 6,0–10,0). I principali segnali di interesse nella zona alifatica derivano da amminoacidi (principalmente prolina, δ 2,3–3,37), acidi organici, alcoli e in misura minore da ammine. Nella stessa area si colloca anche il segnale dell'etanolo che deriva dalla fermentazione degli zuccheri. Nella regione a sinistra dello spettro, oltre al 5-HMF possono essere individuati i segnali dei protoni presenti sull'anello aromatico di tirosina e fenilalanina, il segnale dell'acido formico e, a seconda dell'origine botanica del miele, anche deboli segnali di marcatori botanici.

Nella regione di risonanza dei carboidrati (3,0-6,0 ppm), i segnali dei monosaccaridi glucosio e fruttosio sono dominanti. Nel miele, gli zuccheri minori si trovano in concentrazioni anche centinaia di volte minori rispetto al glucosio e fruttosio, rendendo complessa tale regione spettrale. La complessità spettrale deriva da diversi fattori: le unità di monosaccaride presenti negli zuccheri minori sono limitate a glucosio, fruttosio e galattosio. Poiché la stessa unita monomerica può essere trovata in diversi oligosaccaridi con simile sequenza è evidente che la sovrapposizione spettrale in una matrice di questo tipo è estremante importante. A questo si aggiunge la bassa concentrazione per gli zuccheri minori, la presenza delle diverse forme anomeriche per gli zuccheri riducenti, ciascuna delle quali contribuisce con il suo set di segnali distinti. [5]

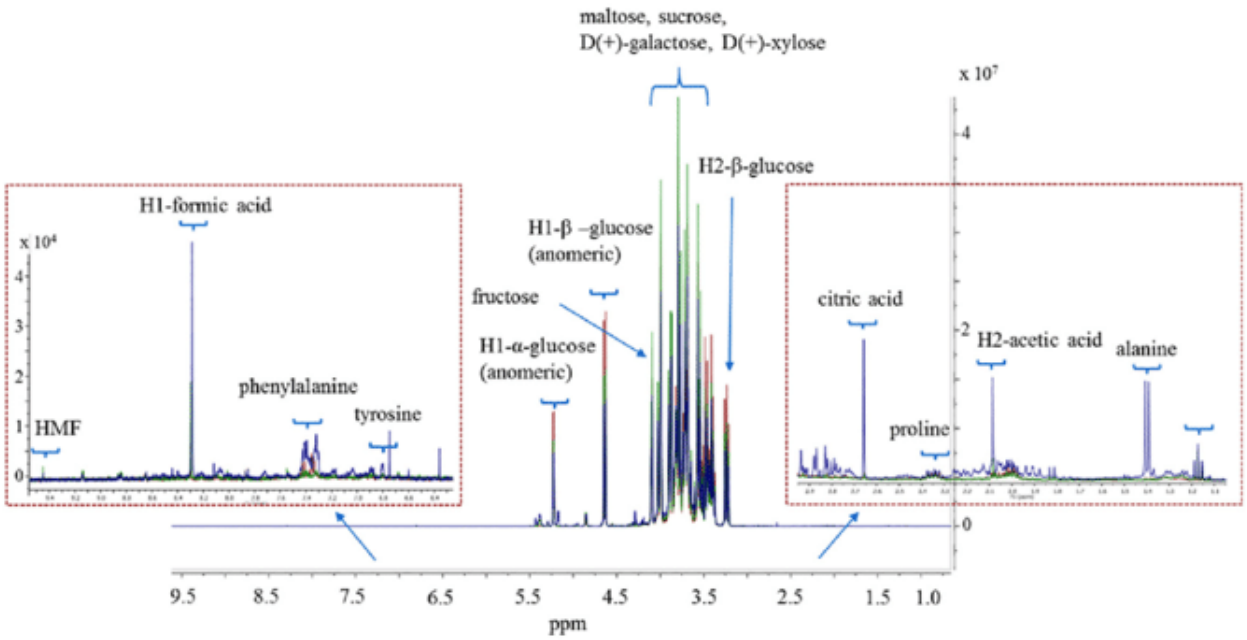

Figura 6 Spettri caratteristici 1H-NMR di mieli di acacia (rosso), colza (blu) e melata (verde) con soppressione dell'acqua. L'espansione spettrale delle regioni d 0-3 ppm (alifatica) e d 6-10 ppm (aromatica) mostra la presenza di composti minori nei mieli. [5]

Lo spettro monodimensionale convenzionale appena descritto viene utilizzato per analisi metabolomiche di tipo untargeted o di fingerprinting che considerano lo spettro come una impronta digitale di quel particolare campione. Con tale approccio, tutti i dati contenuti nello spettro vengono organizzati in matrice ed inseriti in calcoli di analisti statistica multivariata senza un'ipotesi a priori. I modelli statistici ottenuti permettono di identificare le regioni spettrali importanti per la distinzione delle classi di campioni messe a confronto.

La caratterizzazione quantitativa e accurata di specifici metaboliti, invece, non è sempre fattibile con lo spettro monodimensionale convenzionale, perché la sovrapposizione dei segnali ne impedisce la lettura. Per tale ragione si ricorre a metodi selettivi che isolano le risonanze della specie chimica presa in considerazione. Per i sistemi con spin estesi come carboidrati e amminoacidi, gli esperimenti più appropriati per semplificare lo spettro sono i TOCSY (Totale Correlation Spectroscopy) 1D selettivi. L'esperimento consiste in un'eccitazione selettiva di una piccola regione spettrale dove è presente un segnale di interesse, seguita da un trasferimento di magnetizzazione tra tutti gli spin scalarmente accoppiati. Nel caso degli oligosaccaridi, dove ogni unità zuccherina rappresenta un sistema di spin separato, si ottiene lo spettro TOCSY del sistema di spin eccitato. Il numero di pattern

di segnali presenti nel TOCSY dipende dal numero sistemi di spin eccitati. Per riuscire ad eccitare uno o pochi zuccheri in un solo esperimento, in miscele complesse come il miele, è necessaria una selettività maggiore di quella ottenuta con i più convenzionali impulsi shaped (tipo gaussiana), selettività che può essere raggiunta mediante l'utilizzo di un filtro selettivo chiamato Chemical Shift Selective filter. Il parametro da determinare è la frequenza di eccitazione più opportuna, cioè relativa ad un segnale specifico che restituisca un buon TOCSY selettivo contenente uno o pochi sistemi di spin. Grazie alla grande dipendenza del chemical shift dalla struttura molecolare, il pattern che si ottiene per ciascuno zucchero, è unico e ogni possibile sovrapposizione spettrale, di segnali di altri zuccheri, può essere individuata da una alterazione (sia in numero di segnali che nella forma) del pattern stesso. SI è dimostrato che è sempre possibile identificare un multipletto specifico, per lo zucchero in esame, da utilizzare per la quantificazione. Questa tecnica applicata al miele consente di quantificare accuratamente 22 zuccheri nei campioni eccitando le frequenze dei protoni anomerici (Figura 7) [6]. Può essere utilizzata anche per la quantificazione di altri metaboliti, ad esempio gli amminoacidi.

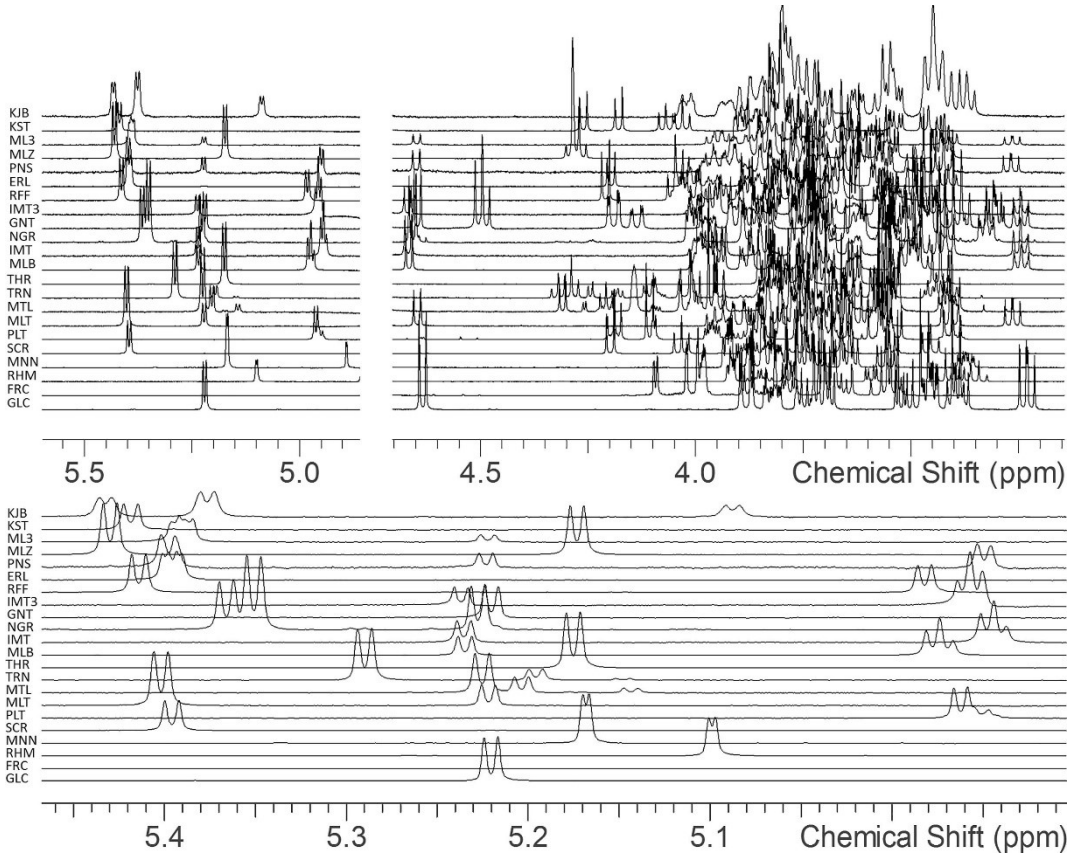

Figura 7 Sopra: spettri NMR ^{1}H dei singoli zuccheri (indicati a sinistra) Sotto: espansione di una porzione di regione anomerica. [6]

Per esempio, in Figura 8 si nota che in uno spettro ^{1}H-NMR convenzionale l'identificazione della presenza di mannosio è difficile a causa della sovrapposizione con i segnali del maltulosio. Tuttavia, l'approccio CSSF-TOCSY ha permesso l'identificazione e la quantificazione di mannosio nei campioni di acacia cinesi (Figura 8), zucchero che p assente nei mieli di acacia genuini. [6] L'approccio NMR basato sull'esperimento CSSF-TOCSY, essendo semplice e non richiedendo alcun passaggio di funzionalizzazione, è una valida alternativa alla cromatografia per l'identificazione del miele in base ai suoi carboidrati e

fornisce un'accurata determinazione quantitativa degli zuccheri in matrici complesse come il miele.

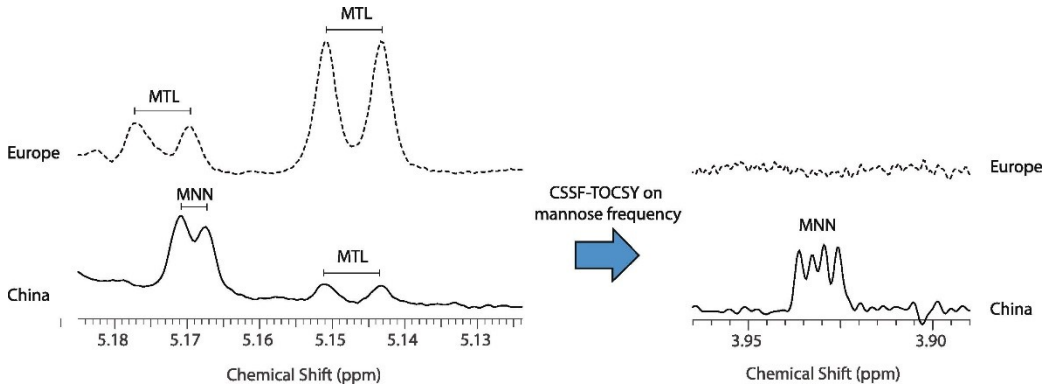

Figura 8 A sinistra: espansione degli spettri convenzionali 1H NMR dei mieli di acacia europei (in alto) e cinesi (in basso). A destra: espansione dei corrispondenti spettri CSSF-TOCSY per il rilevamento selettivo del mannosio. [6]

APPLICAZIONI

Identificazione di adulterazioni nel miele:

Le sostanze zuccherine utilizzate per adulterare il miele sono di varia natura, ma le principali derivano dalle colture di mais, grano, barbabietola, zucchero di canna e di riso. Attraverso reazioni di idrolisi catalizzate da acidi o condotte da enzimi specifici vengono prodotti gli sciroppi zuccherini, tra cui il più utilizzato è lo sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio (HFCS) a causa del suo basso costo e la composizione in glucosio e fruttosio che è simile a quella del miele. Il profilo glucidico di un miele contraffatto risulterà discostante dal profilo del miele genuino sia per la presenza di zuccheri esogeni sia per la mancanza o il basso contenuto di zuccheri endogeni. La tecnica NMR insieme a ad analisi statistiche multivariate permettono di determinare la presenza e la quantità di prodotti adulteranti. La presenza, per esempio, di zuccheri esogeni viene rilevata studiando il miele in DMSO (fino al 10% in peso) con l'identificazione di gruppi idrossilici di maltosio, saccarosio ed altri oligosaccaridi minoritari che nel miele non adulterato non sono presenti.

Come scritto precedentemente, per identificare adulterazioni più sofisticate, in cui le variazioni spettrali di un monodimensionale convenzionale sono meno evidenti, si analizza il profilo zuccherino con metodi basati sul CSSF-TOCSY. La selettività della sequenza ha permesso di verificare la presenza, o assenza, di zuccheri specifici in mieli di diversa origine botanica. Il gentiobiosio, per esempio, è presente solo nei mieli di tiglio, l'erlosio, invece, si trova in maggiori concentrazioni nei mieli di acacia rispetto alle altre origini botaniche.

Alle analisi ^{1}H-NMR vengono, inoltre, associati modelli PCA (Principle Component analysis), cioè metodi analitici di riduzione dimensionale in chemiometria che estraggono solo i componenti importanti, al fine di evidenziare la relazione tra composizione e differenti campioni. Grazie alle rappresentazioni grafiche del modello statistico è infatti semplice classificare i campioni, valutando la vicinanza degli oggetti.

Un esempio è lo studio svolto sugli zuccheri di 62 mieli di acacia di diversa provenienza geografica (Europa e Cina), per verificarne l'autenticità [5]. A causa, infatti, delle sempre più sofisticate tecniche di adulterazione, l'approccio semplice di verificare i livelli di concentrazione di glucosio e fruttosio è limitato. Il profilo zuccherino di saccaridi presenti in minor concentrazione è, invece, potenzialmente più sensibile all'adulterazione. I campioni sono stati preparati sciogliendo circa 240mg di miele in 1mL soluzione tampone di fosfato (KH_2PO_4 in D_2O). Non sono state notate evidenti differenze nei profili zuccherini dei mieli europei (Italia, Ungheria, Romania e Serbia) (colonna a sinistra nella Tabella 1) con un miele cinese certificato acquistato dalla Cina Zootecnia e Industry Corporation (colonna centrale tabella 1) ma nel caso dei mieli cinesi ritrovati nel mercato europeo (colonna a destra Tabella 1) è stata notata una deviazione rispetto ai valori di riferimento nella concentrazione della maggior parte dei saccaridi. La Figura 9 rappresenta lo score ed il loading plot del modello PCA. Si nota che il mieli cinese certificato (colonna centrale in Tabella 1 e stella nera in Figura 9) rientra nel cluster europeo, identificando perciò una composizione zuccherina simile. Questa osservazione esclude la possibilità che le deviazioni nel profilo zuccherino degli altri mieli cinesi riflettano la loro diversa origine geografica, identificando così una più probabile adulterazione del miele. [5].

	European honeys found in Italian market (46 samples)	Chinese honey from Chinese corporation	Chinese honeys found in Italian market (16 samples)
Glucose (GLC)	26.5 (2.33) 21.5–31.26	28.1	29.9 (3.5) 25.8–36.4
Fructose (FRC)	42.6 (2.87) 36.7–49.4	41.9	45.1 (3.12) 38.4–49.4
Mannose (MNN)	< 0.018	< 0.018	0.14 (0.03) 0.06–0.17
Rhamnose (RHM)	< 0.009	< 0.009	< 0.009
Sucrose (SCR)	0.39 (0.51) 0.016–2.31	0.05	0.07 (0.05) 0–0.22
Maltose (MLT)	1.44 (0.32) 0.85–2.34	1.17	0.54 (0.21) 0.30–1.13
Isomaltose (IMT)	1.12 (0.30) 0.55–1.74	0.88	0.039 (0.05) 0–0.15
Turanose (TRN)	2.19 (0.32) 1.63–2.83	1.41	0.50 (0.29) 0–1.3
Maltulose (MTL)	1.16 (0.26) 0.72–1.69	0.77	0.16 (0.18) 0–0.46
Kojibiose (KJB)	0.83 (0.16) 0.52–1.17	0.84	0.21 (0.15) 0–0.52
Nigerose (NGR)	0.37 (0.05) 0.25–0.48	0.32	0.10 (0.09) (0–0.29)
Palatinose (PLT)	0.30 (0.11) 0.05–0.57	0.22	< 0.015 (0–0.05)
Erlose (ERL)	1.06 (0.42) 0.42–2.08	0.22	0.11 (0.12) 0–0.44
Maltotriose (MT3)	< 0.09	< 0.09	< 0.09
Gentiobiose (GNT)	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Melezitose (MLZ)	< 0.04	< 0.04	< 0.04
Isomaltotriose (IMT3)	< 0.05	< 0.05	< 0.05
1-Kestose (KST)	< 0.04	< 0.04	< 0.04
Raffinose (RFF)	< 0.06	< 0.06	< 0.06
α-α Threalose (THR)	< 0.015	< 0.015	< 0.015
Panose (PNS)	< 0.06	< 0.06	< 0.06

Tabella 1 Media, deviazione standard e intervallo dei valori delle concentrazioni dei saccaridi (g/100g) nei campioni dei mieli di acacia europei (a destra), mieli cinesi di riferimento (al centro) e mieli cinesi acquistati in Italia (a sinistra). [5]

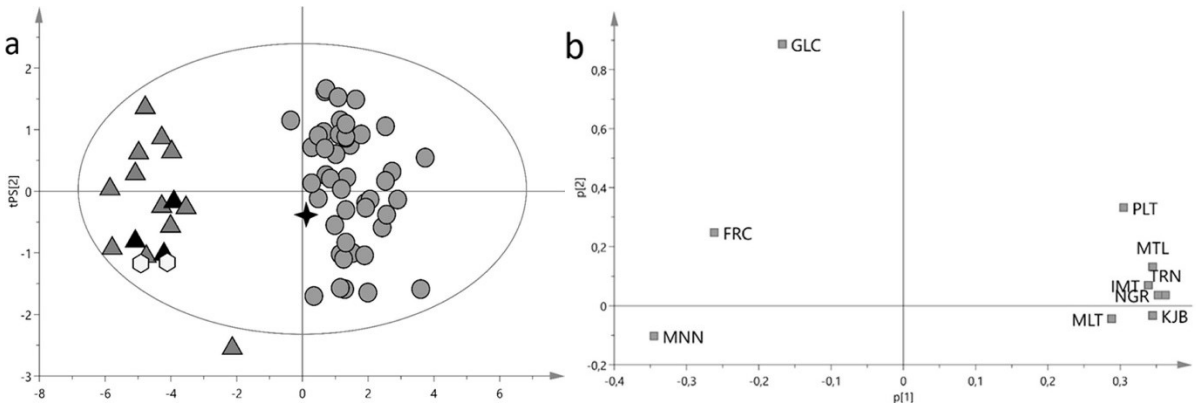

Figura 9 a: Loading plot del modello di PCA eseguito sulla matrice degli zuccheri. Cerchi grigi: mieli europei; Triangoli grigi: mieli cinesi commerciali; Triangoli neri: mieli cinesi analizzati con SCIRA; Stella nera: miele cinese acquistato in Cina; Esagoni bianchi: miele da esperimenti di alimentazione forzata b: Score plot che evidenzia i metaboliti responsabili della separazione dei cluster. [5]

Classificazione botanica

Grazie alle analisi svolte con H-NMR con un approccio chemiometrico possiamo, inoltre, distinguere con elevata precisione i mieli monoflorali da quelli millefiori (dire perciò se un miele e di acacia, di eucalpito piuttosto che ottenuto da diverse specie botaniche). L'elaborazione statistica dello spettro permette infatti di ricondurre il miele alla sua origine botanica. Gli studi metabolomici condotti su soluzioni di miele in acqua mostrano che i segnali fondamentali sono quelli del glucosio, del fruttosio, di alcuni zuccheri minori e degli amminoacidi. Negli studi svolti su estratti organici, invece, l'identificazione dell'origine botanica è data dalla presenza di metaboliti, polifenoli o terpeni, specifici per ogni specie floreale.

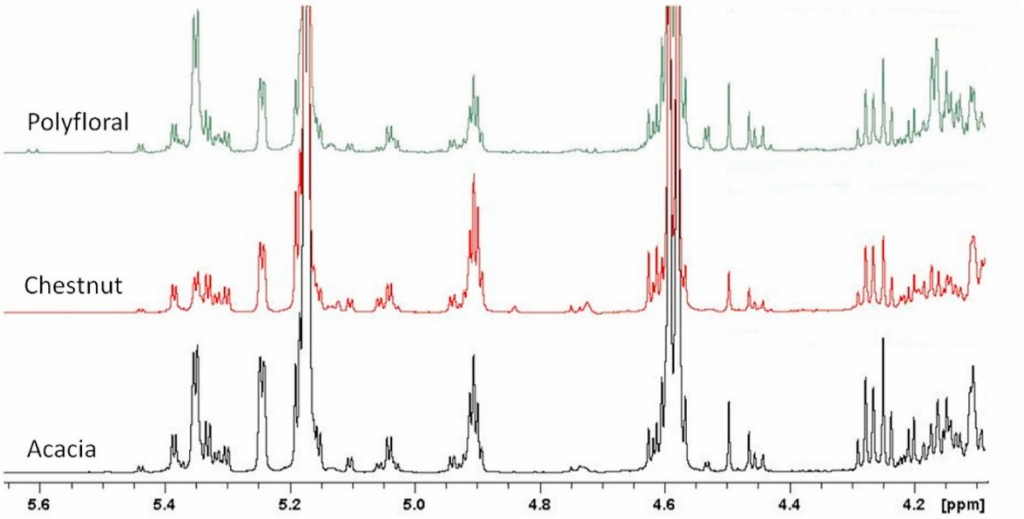

Figura 10 ^{1}H- NMR espansione della regione anomerica, dal basso, di campioni italiani di acacia, castagno e miele polifloreale. [6]

La spettroscopia ^{1}H-NMR accoppiata all'analisi chemiometrica è stata valutata nello studio (Gerhardta, Birkenmeiera, Kuballab, Ohmenhaeuserc, Rohnd, Wellera, 2016 [6]) per identificare i marcatori caratteristici di melata, castagno e tiglio, in modo tale da rilevare la contaminazione da melata nei mieli di nettare (Figura 10). I dati sono stati analizzati mediante PCA-LDA (principal component analysis – linear discriminant analysis), con risultati del 98,9% di correttezza nella classificazione dei campioni. L'analisi LDA è stata eseguita sui punteggi PCA al fine di calcolare funzioni discriminanti per la classificazione dei campioni di miele e per massimizzare la separabilità delle classi, con l'obiettivo di ridurre al minimo la dispersione all'interno di ciascuna classe. Si nota che la discriminazione tra le varie specie botaniche unifloreali dipende dalla variazione del contenuto di zuccheri, ma non essendoci marcatori saccaridi specifici caratteristici delle altre specie botaniche, è necessaria un'analisi multivariata. Anche considerando solo le regioni spettrali dei segni alifatici (0-3 ppm) e aromatici (6-10 ppm) si nota che il loro potere discriminante non è sufficiente per distinguere specie botaniche molto simili come il miele di acacia e di colza (Figura 11). Tuttavia, l'approccio all'intero spettro (0-10 ppm) è adatto per una soddisfacente distinzione e classificazione dei mieli unifloreali, come dimostrato in Figura 11. [6]

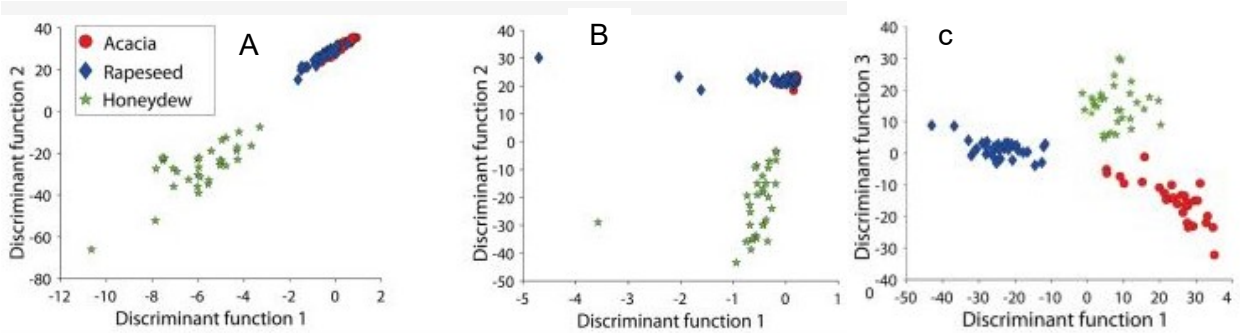

Figura 11 Grafico Score plot LDA di mieli unifloreali di diversa origine botanica: A) regione spettrale d 6-10ppm; B) regione spettrale d 0-3ppm; C) regione spettrale d 0-10 ppm. [6]

Per una semplice e precisa caratterizzazione di mieli monofloreali e di mieli millefiori è stato svolto, invece, uno studio su estratti in cloroformio basato su analisi metabolomica NMR (*Schievano, Finotello, Uddin, Mammi, Piana* [7]). Sono stati analizzati 938 campioni di 16 origini botaniche differenti. I campioni sono stati preparati aggiungendo a 6g di miele 15mL di acqua e 15mL di cloroformio e correggendo il pH a 2.5 con una soluzione acquosa di HCl. Dopo una centrifugazione a 10000 giri/min per 15 minuti, la fase inferiore del cloroformio è evaporata sotto un flusso di azoto. Il residuo solido è stato disciolto in 600 µL di $CDCl_3$ e trasferito su un tubo NMR. I dati sono stati successivamente analizzati e classificati tramite modelli OPLS-DA.

I modelli statistici rivelano non solo l'origine floreale principale, ma anche quelle secondarie presenti in un campione di miele, caratteristica inedita rispetto ai metodi presenti in letteratura che sono in grado di confermare l'autenticità dei mieli monofloreali ma non di caratterizzare una miscela di tipi di miele. Questo risultato discende dalle caratteristiche peculiari degli spettri del cloroformio che mostrano risonanze diagnostiche per quasi ogni origine botanica, rendendo questi spettri NMR impronte digitali adatte. L'affidabilità del metodo è stata testata con altri 120 campioni e sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi tradizionale. I due approcci sono in ottimo accordo in identificare le specie floreali presenti nei mieli e nella classificazione botanica. Pertanto, questo metodo NMR potrebbe rivelarsi a valida soluzione agli enormi limiti della classificazione tradizionale, molto impegnativa e complessa.

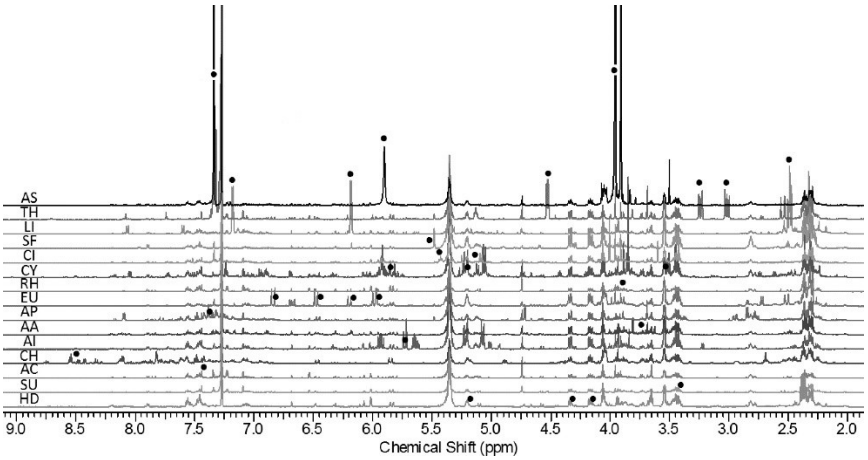

Figura 12 Porzione dello spettro ^{1}H-NMR di 15 mieli monofloreali in cloroformio. I punti neri evidenziano la risonanza diagnostica per ogni tipo di miele. [7]

Si nota in Figura 12 come gli spettri NMR degli estratti di cloroformio sono notevoli impronte digitali del miele, in quanto per quasi ogni origine botanica possono essere riconosciute risonanze cruciali (indicate dai punti nella Figura 12) semplicemente mediante l'osservazione dello spettro.

Gli S-plots per i modelli OPLS-DA sono stati utilizzati per identificare molte variabili corrispondenti alle principali risonanze dei marcatori botanici per ciascuna classe di miele. In questo studio è stato possibile assegnare, con l'aiuto dei dati di letteratura, le risonanze significative del miele di cardo all'acido fenillattico e al lumicromo. Gli spettri di asfodelo, invece, sono caratterizzati da segnali insolitamente forti di siringato di metile.

Nella Figura 13, S-plot, lo spettro NMR e le strutture chimiche sono riportati i marcatori del miele di cardo.

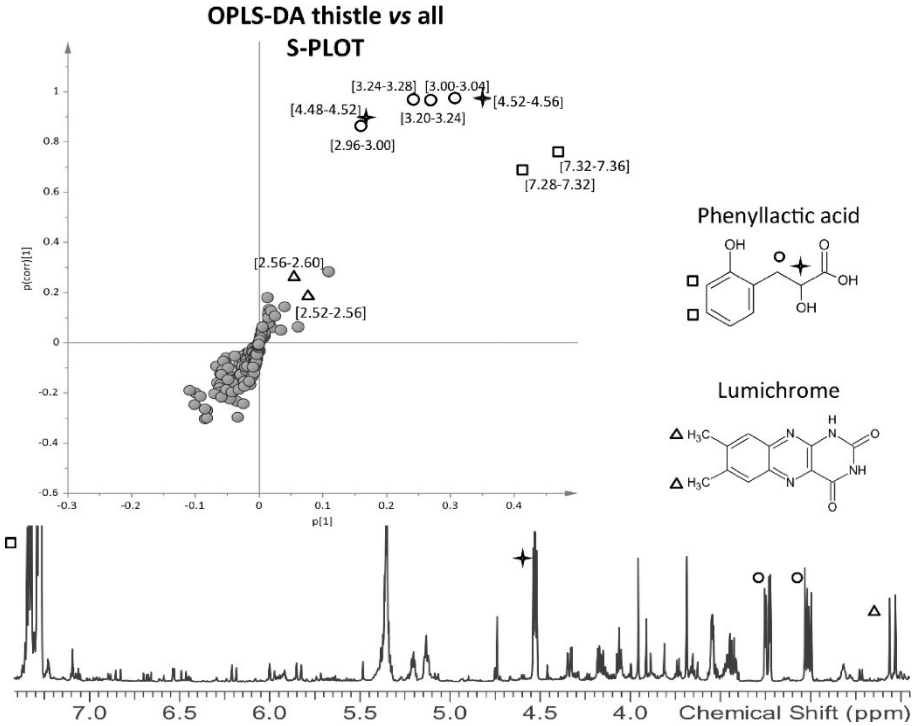

Figura 13 S-plot per il modello OPLS-DA costruito per caratterizzare la classe del cardo (in alto); spettro NMR rappresentativo ^{1}H del miele di cardo (in basso). I simboli (cerchi aperti, quadrati e stelle) indicano la posizione delle risonanze marcatori più importanti nel S-plot, nello spettro NMR e nei protoni corrispondenti nelle strutture molecolari. [7]

Classificazione geografica

Per una maggiore tutela e garanzia da parte dei produttori e dei consumatori è richiesta una certificazione dell'origine geografica. Essendo, infatti, il miele, un prodotto vario le differenze di prezzo e di qualità sono presenti non solo tra mieli europei, americani o cinesi, ma addirittura tra regioni dello stesso paese. La classificazione geografica avviene tramite analisi melissopalinologica. L'etichetta del miele così come per tutti gli altri prodotti dell'alveare, deve riportare il paese d'origine o luogo di provenienza, secondo la legislazione attuale che fa riferimento al Regolamento (UE) n. 1169/2011, entrato in vigore in Italia il 13 dicembre 2014. Se invece il miele è originario di più Stati membri (o paesi terzi) l'indicazione può essere sostituita da una delle seguenti diciture: "miscela di mieli originari della CE", "miscela di mieli non originari della CE" o "miscela di mieli originari e non originari della CE".

In uno studio svolto dal Gro-product Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine [8], in Cina è stato possibile classificare le origini geografiche a livello provinciale (>200Km) e a livello di città (circa 10-50 Km) del miele monofloreale di acacia cinese grazie ad analisi basate su H-NMR ad alta risoluzione associata a modelli PCA e OPLSA-DA (filtra i rumori per migliorare l'interpretazione del risultato ed evitare l'overfitting). I mieli sono stati raccolti in tre province della Cina (ShanXi, ShanDong e LiaoNing) per un totale di 53 campioni. I campioni per le analisi sono stati preparati in acqua aggiungendo 100mg del campione di miele in 1000µL di una soluzione tampone di fosfato. Il pH è stato regolato 4,5±0,5. [8]

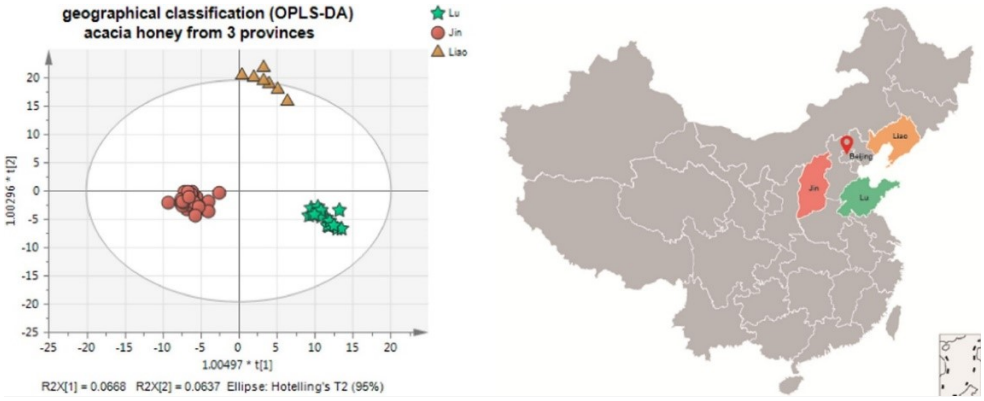

Figura 14 Classificazione geografica dei campioni di miele di acacia raccolti in tre province (ShanXi -abbr. Jin, ShanDong - abbr. Lu e LiaoNing -abbr. Liao) in tutta la Cina. A sinistra: grafico del punteggio di SIMCA-P (modello OPLS-DA, ridimensionamento UV). A destra: le aree amministrative dei luoghi di raccolta dei campioni segnati sulla mappa della Cina. [8]

Il successo delle analisi svolte su mieli di tre province è dimostrato dalla Figura 14, che riporta il grafico basato sul modello OPLS-DA dove sono ben distinguibili i campioni mieli delle tre province cinesi.

Origine entomologica

Le analisi H-NMR accoppiate a modelli PCA e PLS-DA sono state anche utilizzate con successo per l'identificazione dell'origine entomologica del miele. In particolare, sono stati svolti studi del miele ecuadoriano per distinguere il miele prodotto da *Apis mellifera* e quello prodotto da due generi di Meliponini. I Meliponini sono piccole api di colore scuro chiamate anche api senza pungiglione di origine sudamericana (senza pungiglione perché non pungono). Il loro miele è difficile da reperire e differisce per colore, sapore e viscosità dai normali mieli di *apis mellifera*, ha un'alta percentuale di vitamine C e del gruppo B, di pinocembrin, pinobanksin e acido magniferolico (flavonoidi interessanti per il trattamento di malattie neurodegenerative, cardiovascolari o arteriosclerotiche). La sua superiorità rispetto a mieli comuni riguarda le sue proprietà antimicrobiche, antitumorali, antinfiammatorie, antiossidanti, ipolipidemiche, e cardioprotettive, oltre che essere più nutriente e un ottimo cicatrizzante. Proprio per queste ragioni, il miele dei Meliponini è considerato molto pregiato e raggiunge prezzi elevati. Il suo prezzo arriva fino al 1100% del prezzo del miele prodotto da *Apis mellifera*, motivo per dichiarare il falso sulle origini entomologiche del miele.

Per lo studio sono stati raccolti mieli di Apis Mellifera, Geotrigona e Scaptotrigona (due generi di Meliponini). Gli spettri degli estratti in cloroformio dei tre mieli presentano caratteristiche comuni, ma hanno regioni che gli distinguono. La zona centrale degli spettri

(3.5-4.5 ppm) è caratteristica per ogni specie di ape (Figura 15) in quanto contiene marcatori lipofili endogeni, che sono indipendenti dall'origine geografica e floreale. [9]

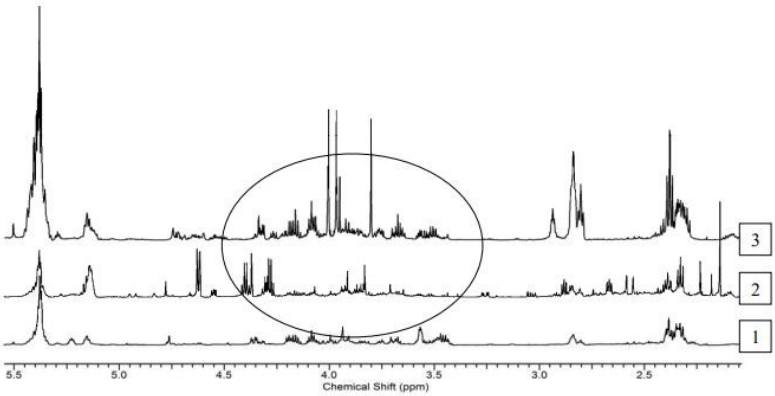

Figura 15 Confronto nella regione espansa (2.0-5.5 ppm) degli spettri ^{1}H-NMR degli estratti di cloroformio di mieli prodotti da: 1. Apis, 2. Scaptotrigona, e 3. Api Geotrigona in Ecuador. [9]

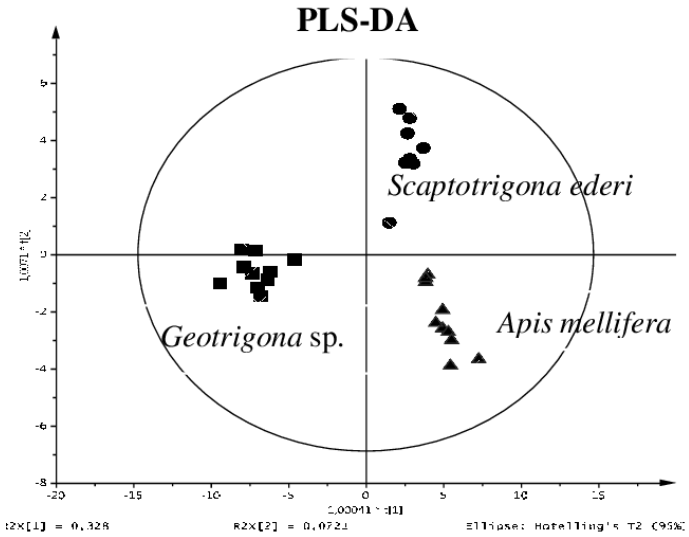

Figura 16 Analisi dei componenti principali e PLS-DA su spettri ^{1}H-NMR in cloroformio di mieli ecuadoriani prodotti da Apis mellifera e Meliponini (Geotrigona sp. e Scaptotrigona ederi) [9]

In Figura 16 il PLS-DA dimostra il successo nella distinzione tra i mieli in base all'origine entomologica. Questa ricerca propone un nuovo elemento per la denominazione di origine protetta nel miele.

CONCLUSIONI

La spettroscopia NMR, combinata ad analisi chemometriche, offre un metodo facile, veloce, non invasivo e riproducibile per la classificazione di diversi tipi di miele, in base alla loro origine botanica, geografica ed entomologica, e per l'identificazione di eventuali adulterazioni del prodotto, assicurandone così la qualità e la genuinità.

BIBLIOGRAFIA

[1]: Conti, M.E.; Stripeikis, J.; Campanella, L.; Cucina, D.; Tudino M.B., “Characterization of Italian honey (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters” *Chemistry Central Journal,* **2007**, *1*.

[2]: Gonzalez-Miret, M. L.; Terrab, A.; Hernanz, D.; Fernandez-Recamales, M. A.; Heredia, F. J., “Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin” J. Agric. Food Chemistry, **2005**, *53*, 2574-2580.

[3]: Rashed, M. N.; Soltan, M.E., “Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys”, *Journal of Food Composition and Analysis*, **2004**, *17,* 725-735.

[4]: Iglesias, M. T.; De Lorenzo, C.; Del Carmen Polo, M.; Martìn-Álvarez, P. J.; Pueyo, E., “Usefulness of Amino Acid Composition to Discriminate between Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area”, *J. Agric. Food Chemistry,* **2004***, 52,* 84-89*.*

[5]: Schievano, E.; Sbrizza, M.; Zuccato, V.; Piana, L.; Tessaric, M., “NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity”, *Food Chemistry,* **2020**, *309*, 272-277.

[6]: Gerhardta, N.; Birkenmeiera, M.; Kuballab, T.; Ohmenhaeuserc, M.; Rohnd, S.; Wellera, P., “Differentiation of the botanical origin of honeys by fast, non-targeted 1H-NMR profling and chemometric tools as alternative authenticity screening tool”, *Proceedings of the XIII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science,* **2016**.

[7]: Schievano, E.; Finotello, C.; Uddin, J.; Mammi, S.; Piana, L., “Objective Definition of Monofloral and Polyfloral Honeys Based on NMR Metabolomic Profiling”, *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, *64*, 3645−3652.

[8]: Zhang, J.; Chen, H.; Fan, C.; Gao, S.; Zhang, Z.; Bo, L., “Classifcation of the botanical and geographical origins of Chinese honey based on 1H NMR profile with chemometrics”, *Food Research International,* **2020**, *137.*

[9] Vit, P.; Uddin, J.; Zuccato, V.; Maza, F; Schievano, E., “Entomological Origin of Honey Discriminated by NMR Chloroform Extracts in Ecuadorian Honey”, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* **2015**, *9*, 458-461.