UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTÀ DI SCIENZE AGRARIE E ALIMENTARI

CORSO DI LAUREA IN
VALORIZZAZIONE E TUTELA DELL'AMBIENTE E DEL TERRITORIO MONTANO

STUDIO COMPARATIVO TRA PROPOLI DELL'APPENNINO LIGURE E DELLA PIANURA PADANA

Relatrice: Prof.ssa Gigliola Borgonovo

Correlatrice: Dott.ssa Valeria Leoni

Tesi di Laurea di:

CHIARA BRUNETTI

Matricola N. 891746

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale alla mia relatrice, la professoressa Gigliola Borgonovo e alla correlatrice, la dottoressa Valeria Leoni che mi hanno aiutato durante questo progetto con la loro competenza e disponibilità fornendomi le informazioni e il materiale necessario.

Un ringraziamento ai miei genitori, alla mia famiglia, ai miei amici, in particolare alle mie amiche Elena e Chiara che mi sono state particolarmente vicine in questi anni e mi hanno sempre supportato.
Un grazie alla mia compagna di viaggio Ottavia con cui ho condiviso questa esperienza a Edolo.
E infine un grazie al mio amico a quattro zampe Zeus.

INDICE

Riassunto 5

1. Introduzione 7

2. Finalità del tirocinio 17

3. Materiali e metodi 19

3.1. Campionamento..... 19

3.2. Analisi della resa in balsamo e resa in umidità 21

3.3. Analisi spettrofotometrica dei gruppi di molecole come fenoli, flavoni e flavonoidi e dell'attività antiossidante (fenoli totali, flavoni e flavonoli e attività contro i radicali liberi 23

3.3.1. Fenoli totali 23

3.3.2. Flavoni e flavonoli totali 25

3.3.3. Attività antiossidante 25

3.4. Analisi qualitative dei componenti tramite TLC e NMR 27

3.4.1. Cromatografia su strato sottile (TLC) 27

3.4.2. Analisi NMR 27

4. Risultati 28

4.1. Analisi della resa in balsamo e umidità 28

4.2. Analisi spettrofotometrica dei fenoli totali, flavoni e flavonoli totali e dell'attività antiossidante (Free Radical Scavenging Activity) 30

4.3. Analisi TLC 35

4.4. Analisi NMR 38

5. Discussione e Conclusioni 41

6. Bibliografia 43

7. Sitografia 47

RIASSUNTO

La propoli, o colla d'api, è una sostanza resinosa naturale di origine vegetale raccolta e utilizzata dalle api per sigillare crepe o spazi aperti e per prevenire la contaminazione all'interno dell'alveare da parte di batteri, virus o parassiti a causa del suo effetto antisettico; così come per coprire gli intrusi morti all'interno dell'alveare per evitare la loro decomposizione.

Recenti studi hanno confermato le numerose proprietà della propoli come anti-cariogena, antimicrobica, antinfiammatoria, antiossidante, antivirale, antitumorale, epato-protettiva, antimicotica e antibatterica ed è stata quindi oggetto di crescente interesse scientifico per la sua vasta gamma di proprietà biomediche.

La propoli è formata da resine vegetali (50%), cere (30%), oli essenziali e aromatici (10%), polline (5%) e altre sostanze organiche (5%).

I composti fenolici rappresentano un gruppo importante di componenti chimici e comprendono fenoli, flavonoidi, acidi fenolici e sostanze volatili. Il contenuto e la presenza dei vari componenti fenolici dipendono dalla vegetazione da cui le api raccolgono la propoli, dalla temperatura, dal clima e dal luogo di raccolta.

Lo scopo primario di questo studio è stato quello di caratterizzare due propoli prodotte in una zona collinare (Appennino Ligure-Piemontese) e in una zona pianeggiante (Pianura Padana) del Nord Italia utilizzando diversi approcci analitici come l'analisi spettrofotometrica, l'analisi TLC e l'analisi NMR nonché la valutazione della resa in balsamo e dell'umidità al fine di valutare le informazioni che ognuno di questi metodi può fornire per la caratterizzazione della propoli.

Nelle analisi l'umidità è risultata molto bassa in entrambi i campioni, leggermente più alta nella propoli di collina (0,74%±0,38) rispetto alla pianura (0,69%±0,52). Anche per la resa in balsamo è risultata maggiore nei campioni raccolti in area collinare (74%±9,71) mentre nei campioni di pianura è risultata più bassa (52%±16).

Nelle analisi spettrofotometriche, per calcolare i fenoli totali è stata realizzata una retta di taratura a partire da una stock solution di acido gallico. I fenoli totali sono stati calcolati in equivalenti di acido gallico e sono 236,32±40,92 mg GAE/g FW per la pianura e 242,42±11,67 GAE/g FW per la collina. Per l'analisi dei flavoni e flavonoli i risultati sono espressi come equivalenti di quercetina per g di peso fresco e hanno mostrato una maggiore presenza nella propoli di collina con una media di 32,14±4,38 mg QE/g FW rispetto al 26,91±4,31 mg QE/g FW della propoli di pianura. Nella propoli prodotta più in quota la concentrazione di polifenoli è superiore rispetto alla propoli di pianura anche se non in maniera significativa. L'attività antiossidante è risultata invece molto simile nelle due tipologie di propoli, 46%±0,96 in pianura e 45%±1,39 in collina.
Le analisi TLC hanno permesso di escludere in tutti i campioni la presenza di rutina e quercetina mentre entrambi le propoli si caratterizzano per la presenza di crisina, acido caffeico e acido trans-cinnamico. L' acido ferulico, seppur nelle condizioni analitiche utilizzate è co-eluito con l'acido m-cumarico, si è differenziato da questo per la colorazione più rapida a seguito di esposizione all'aria, e quindi si può ipotizzare la presenza di entrambi nell'estratto. Anche le analisi NMR hanno mostrato segnali tipici della presenza dei composti fenolici enumerati.

La scelta del luogo di produzione è molto importante per ottenere un prodotto di qualità.

La propoli è un prodotto apistico secondario da valorizzare che potrebbe rappresentare un'importante integrazione, per le sue caratteristiche qualitative, nelle attività apistiche, e in generale agricole, montane.

1. INTRODUZIONE

La propoli, o colla d'api, è una sostanza resinosa naturale simile alla cera che si trova negli alveari dove viene utilizzata dalle api come cemento per sigillare crepe o spazi aperti (Kuropatnicki et al., 2013). Viene utilizzata dalle api anche per prevenire la contaminazione all'interno dell'alveare da parte di batteri, virus o parassiti a causa del suo effetto antisettico; così come per coprire gli intrusi morti all'interno dell'alveare per evitare la loro decomposizione (Righi et al., 2010).

La propoli è resinosa, gommosa e balsamica, viene raccolta dalle api sulle gemme apicali e sui tronchi di alcune piante. La resina raccolta dalle api per fabbricare la propoli è una sostanza prodotta dalle piante per mantenere attivi i rapporti di scambio con l'ambiente (tra pianta, ambiente e uomo). Le api producono questa sostanza raccogliendo le sostanze resinose e miscelandole poi con enzimi, polline e cera.

La propoli è formata da resine vegetali (50%), cere (30%), oli essenziali e aromatici (10%), polline (5%) e altre sostanze organiche (5%). Sono stati identificati tantissimi componenti della propoli compresi i composti fenolici, terpeni, sostanze lipidiche, cere e altre sostanze come vitamine, proteine, aminoacidi e zuccheri. Tra questi i composti fenolici costituiscono il gruppo più abbondante di componenti chimici e comprendono, i semplici fenoli e i loro esteri e aldeidi, flavonoidi, acidi fenolici e sostanze volatili. Il contenuto totale di composti fenolici è stato proposto come indice di qualità per la propoli grezza, una percentuale inferiore all'11% è indice di propoli di scarsa qualità, dall'11 al 17 % è indice di buona qualità e maggiore di 17% è indice di ottima qualità. Le diverse fonti vegetali influenzano la composizione chimica della colla d'api, in particolare il profilo fenolico. Bisogna precisare che il contenuto delle componenti fenoliche dipende dal tipo di pianta da cui si raccoglie la

propoli, dalla temperatura, dal clima e dal luogo di raccolta. I composti fenolici presenti nella propoli fanno parte di uno dei più grandi gruppi di metaboliti secondari delle piante. Questi composti fenolici derivano da due vie metaboliche: la via dell'acido shikimico dove si formano principalmente fenilpropanoidi e la via dell'acetato in cui si formano semplici fenoli. La combinazione di metaboli derivanti dalle due vie biosintetiche porta alla formazione di flavonoidi.

La presenza di flavonoidi nella propoli è stata suggerita per la prima volta da Jaubert (1926), che aveva identificato il flavone crisina nella colla d'api e lo aveva associato come possibile contribuente al colore della cera d'api. La relazione tra i flavonoidi presenti nella propoli e la composizione chimica dell'essudato della pianta è stata evidenziata da Popravko et al., (1970) che riuscì a identificare due flavonoidi e altri sei pigmenti nella propoli. In parallelo, presso l'istituto di ricerca Levie's, un gruppo di ricercatori francesi riuscì a identificare flavonoidi come galangina, pinocembrina, tectocristina e isalpinina. Ad oggi sono stati identificati più di 150 flavonoidi nella propoli. Lo studio dei flavonoidi include diversi metodi analitici, come la spettrofotometria UV-VIS, spettrometria NMR, sia tecniche cromatografiche, di separazione come GC, HPTLC, HPLC o HPCE (Gomez-Caravaca et al., 2006; Cuesta- Rubio et al., 2007).

I flavanoni sono uno dei gruppi più significativi dei flavonoidi nella propoli con più di 40 composti. Questi composti sono molto comuni nella propoli del pioppo sia in ambienti temperati sia in ambienti dell'emisfero nord e sud. Oltre a pinocembrina, pinostrobina, naringenina sono state segnalate anche sakuranetina, isosakuranetina e liquiritigenina tra i flavanoni più diffusi in Europa, Cina e Nord America (Villanueva et al., 1970). (Figura 1.1) Oltre ai flavanoni, si trovano comunemente nella propoli i flavoni e flavanoli come ad esempio l'acacetina, l'apigenina, la crisina, la tectocrisina, la galangina, la quercitina e la izalpinina (Stevens et al., 1995). Gli acidi fenolici nella propoli sono costituiti principalmente da acidi idrossibenzoici (gallico, gentisico, acido protocatecuico, salicilico e vanillico) e

acidi idrossicinnamici (p-cumarico, acidi caffeico e ferulico). Oltre alle loro forme libere, sono spesso presenti acidi fenolici come benzil-, metilbutenil-, feniletil- e cinnamil-esteri, con acido caffeico l'estere fenilico è uno dei principali costituenti della propoli delle zone temperate (Marcucci et al.,1995). (Figura 1.2)

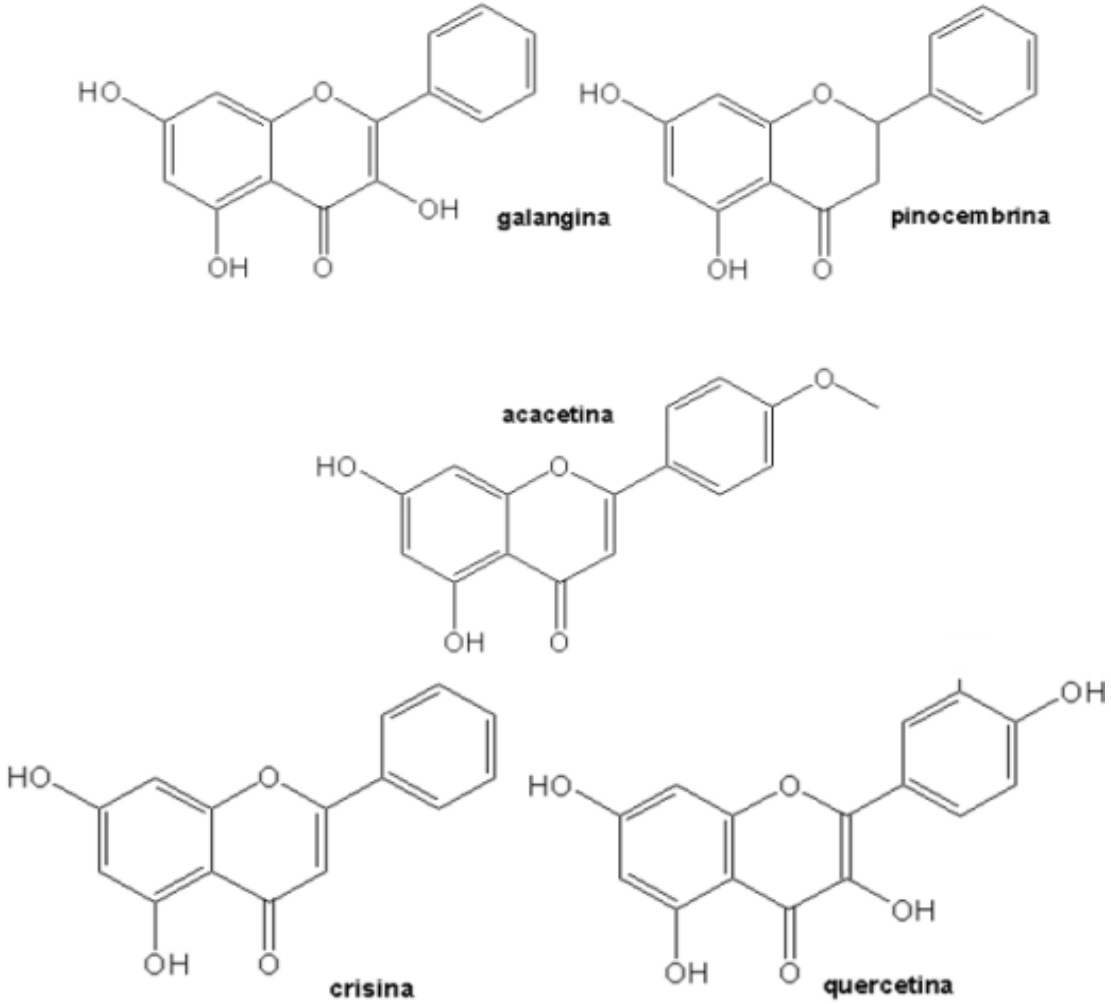
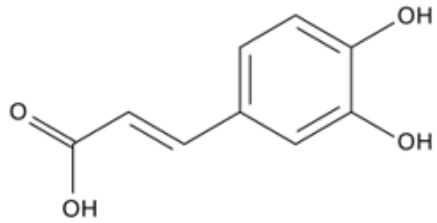
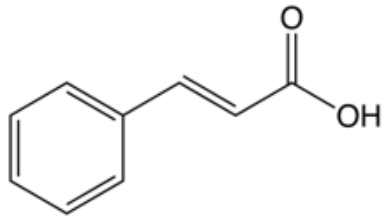


Figura 1.1 Principali flavonoidi della propoli



ACIDO CAFFEICO



ACIDO CINNAMICO

Figura 1.2 Principali componenti della propoli

Sebbene rappresentino solo una piccola parte dei costituenti della propoli, i composti volatili organici costituiscono una componente importante. Essi comprendono diversi terpeni e terpenoidi dall'importante attività biologica che possono essere quantificati con l'utilizzo di tecniche di Gas Cromatografia di Massa (GC-MS) accompagnata da microestrazione in fase solida (SPME). Quest'ultima tecnica permette l'estrazione della componente volatile di una matrice evitando manipolazioni del campione ed è utile per evitarne un'eventuale degradazione delle molecole durante i processi di idrodistillazione. I composti volatili compromettono gli aromi particolari alla propoli di diverse origini e sono stati considerati come possibile criterio di qualità per la freschezza della propoli.

Le specie di alberi più produttivi di resina sono il pioppo, la betulla, l'ippocastano, il castagno, la quercia, l'ontano, l'olmo, il salice, il frassino, il susino, il ciliegio, il larice e altre conifere (Ghisalberti et al., 1979). La propoli viene raccolta da un numero ristretto di api operaie bottinatrici, le più anziane ed esperte api propolifere. All'interno dell'alveare un altro tipo di ape operaia termina il lavoro iniziato dalle propolifere fino ad ottenere il prodotto finale. Solo la specie di *Apis mellifera* raccoglie la propoli. L'ape caucasica grigia manifesta un'attività più spiccata di quella italiana, anzi, sembra la più produttiva. La differenza razziale delle api non influisce solo sulla capacità di propolizzare ma anche sulla composizione chimica della

propoli raccolta e quindi sull'attività biologica del prodotto.
La raccolta dipende da fattori stagionali, avviene in autunno, alla fine della raccolta del miele da parte delle api. Le resine vengono raccolte nelle ore più calde della giornata quando sono più malleabili. Se la temperatura scende il prodotto tende ad indurirsi e diventa friabile. La propoli si presenta come una sostanza di consistenza e struttura variabile in base alla temperatura. Diventa molle e soffice intorno ai 60-70°C. Quando fonde si divide in due parti ben distinte: una liquida-cerosa, aromatica che galleggia e una parte vischiosa che si deposita sul fondo.
Dipende anche da fattori geografici poiché gli alberi situati nelle zone più ricche di boschi hanno una resa maggiore in propoli rispetto a quelli posti in zone di pianura.
Il suo colore varia dal verde, al marrone, al rossiccio e la caratteristica di ogni diverso tipo di propoli dipende da alcuni fattori come ad esempio la fonte vegetale e le condizioni edafo-climatiche (Silva et al.,2015).
Colore, sapore e odore variano molto a seconda dell'origine delle resine. La propoli è solubile in acqua. È parzialmente solubile in acetone, alcol etilico, ammoniaca, benzene, cloroformio, etere e tricloroetilene. I solventi più comunemente usati per l'estrazione commerciale sono etanolo, etere, glicole e acqua. Il residuo insolubile è costituito da materiale organico, tessuti vegetali, granuli pollinici, residui di cuticola e di setole delle api.
La parola propoli deriva dal greco antico ellenistico pro- "per" o "in difesa", e polis "citta", cioè difensore della città. Ci sono documenti che suggeriscono l'uso della propoli da parte degli antichi Egiziani, Persiani e Romani.
Gli antichi greci, i romani e gli egiziani furono i primi ad usare la propoli, con applicazioni nella guarigione delle ferite e come disinfettante (Sforcin 2007).
Secondo la storia egiziana, la propoli era uno dei principali ingredienti utilizzati per l'imbalsamazione per la mummificazione, in cui fungeva da conservante (Mejanelle et al. 1997; Kuropatnicki et al. 2013). I Greci usavano la propoli come ingrediente principale del polianto, profumo che combinava propoli, olibano, styrax ed erbe aromatiche. Molte altre antiche civiltà, come quella cinese, indiana e araba, credevano nel potere della propoli di trattare situazioni

mediche come piaghe, ulcere e alcune lesioni cutanee, veniva utilizzata sia internamente ed esternamente (Kuropatnicki et al. 2013). I medici arabi usavano la “cera nera” contro il freddo e come rimedio contro eczemi, mialgia, reumatismi, come antisettico cicatrizzante delle ferite e disinfettante del cavo orofaringeo. Nel diciassettesimo secolo le farmacopee londinesi consideravano la propoli come droga ufficiale.

Nonostante l'uso così precoce, la propoli è ancora considerata una "medicina popolare" (Valenzuela-Barra et al. 2015; Kuropatnicki et al. 2013; Toreti et al. 2013). Tuttavia, nel corso degli ultimi due decenni, il suo utilizzo ha cominciato a mostrare una veridicità in termini scientifici dato che recenti studi hanno confermato le numerose proprietà della propoli. Grazie alle applicazioni come anti-cariogeno, antimicrobico, antinfiammatorio, antiossidante, immunostimolante, antivirale, antitumorale, epato-protettivo, antimicotico e antibatterico, la propoli è stata oggetto di crescente interesse scientifico. La proprietà più ampiamente studiata della propoli è la sua attività antimicrobica, con centinaia di pubblicazioni sull'argomento apparse negli ultimi 40 anni (Bogdanov 2012). Questi risultati spiegano perché la propoli svolge un ruolo così importante negli alveari, in quanto può essere considerata un'arma chimica contro i microrganismi patogeni. Sono stati effettuati diversi studi per valutare questa proprietà contro un vasto gruppo di batteri Gram-positivi e Gram-negativi; sia di tipo aerobico che anaerobico. Gli studi hanno utilizzato propoli di diversa origine geografica e composizione chimica, e hanno impiegato diversi approcci sperimentali per studiare l'attività antibatterica. Inoltre, è stato dimostrato che l’attività della propoli dipende anche dal tipo di api che la raccoglie da quando si è scoperto che la propoli raccolta da *Apis mellifera* caucasica aveva una maggiore attività antibatterica rispetto a quella raccolta da *Apis mellifera* anatolica e *Apis mellifera* carnica (Silici e Kutluca 2005). I test per l’attività antibatterica sono stati effettuati contro diversi batteri Gram-positivi aerobi appartenenti al genere Bacillus spp, Enterococcus spp, Staphylococcus spp e Streptococcus spp; e anaerobi come Actinomyces, Lactobacillus e Peptostreptococcus. E anche a batteri Gram-negativi aerobi tra i quali troviamo *Pseudomonas, Proteus spp, Corynebacterium sp, Helicobacter*

pylori ed *Escherichia coli*; e batteri anaerobi come *Actinobacillus, Pophyromonas spp, Prevotella spp* e *Porphyromonas spp*. I risultati mostrano che la propoli è molto più attiva contro i batteri Gram-positivi rispetto agli altri e questo può essere dimostrato in diversi studi (Kujumgiev et al., 1999). L'effetto antibatterico della propoli si svolge principalmente inibendo la mobilità batterica.

Negli ultimi anni, la propoli è stata sempre più usata da parte degli ospedali come agente antibatterico a causa dell'aumento della resistenza agli antibiotici. È stato dimostrato che i complessi e variabili componenti della propoli agiscono sinergicamente contro i batteri (Bonvehi e Coll et al., 1994).

La propoli svolge anche funzioni antivirali e questo è stato capito grazie alla raccolta di vari tipi di propoli provenienti da varie parti geografiche contro i diversi ceppi di virus (quali come *Adenovirus*, virus dell'influenza A e B, *Rotavirus*, virus della Corona e virus della stomatite vescicolare). La sua attività antivirale interferisce con la replicazione di alcuni virus che causano malattie umane tra cui herpes, influenza e vaiolo. Alcuni flavonoidi hanno un effetto inibitorio sull'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV).

I flavonoidi della propoli agiscono impedendo al virus di entrare nella cellula ospite e riducendo le attività di replicazione intracellulare. Questo processo contribuisce alla soppressione della crescita e dello sviluppo del virus. Altri possibili meccanismi dell'attività antivirale includono l'inibizione della trascrizione e la stimolazione del sistema immunitario per combattere l'infezione (Schnitzler et al. 2010; Boukraâ et al. 2013).

La propoli ha un effetto protettivo contro le infezioni da virus grazie al suo contenuto di flavonoidi che inattivano il virus inibendo l'enzima che rimuove il rivestimento proteico che li racchiude. Se il rivestimento rimane intatto il materiale virale dannoso resta segregato. Sono bioattivi anche gli acidi aromatici e i terpeni degli oli essenziali.

L'attività antimicotica viene registrata su alcune specie di miceli in grado di provocare micosi. L'attività è in rapporto con esteri dell'acido caffeico. Ciò spiega anche l'attività della propoli utilizzata tipicamente come disinfiammante e cicatrizzante. In questo ambito esercita un'azione contro le

piaghe.
La propoli svolge anche un'attività antiparassitaria in quanto viene usata come componente nei farmaci esistenti contro diverse malattie causate da parassiti. Diversi studi hanno dimostrato l'attività della propoli e dei suoi componenti contro una gamma di parassiti protozoi che causano varie malattie umane, tra cui *Trypanosoma brucei* che provoca la malattia del sonno e *Trypanosoma cruzi* che provoca la malattia di Chagas (Marcucci et al., 2001). Altri campioni hanno dato effetto positivo contro la *Leishmania donovani* che provoca la Leishmaniosi viscerale. La propoli ha effetti antiprotozoici contro protozoi parassiti che causano la malaria e infezioni intestinali.
Le proprietà antinfiammatorie della colla d'api sono date dalla presenza di flavonoidi che bloccano gli enzimi responsabili della rottura della membrana cellulare impedendo così l'innesco del processo infiammatorio. La riuscita di questo è data anche dalla capacità di bloccare le prostaglandine sopprimendo la produzione di acido arachidonico che ne è il precursore (Farnley, 2003). La propoli inoltre stimola la rigenerazione del tessuto. La propoli mostra di avere una capacità di gastro-protezione sia agendo contro l'infezione da *Helicobacter pilori*, sia proteggendo la mucosa gastrica dall'infiammazione che porta a gastrite e ulcera. Questo è legato alla sua proprietà antiossidante.
La colla d'api possiede grandi proprietà anestetiche grazie agli oli essenziali volatili con possibile impiego nella pratica stomatologica.
La proprietà antiossidante dovuta in particolare ai flavonoidi è utilizzata soprattutto nel campo della cosmetica, nell'industria alimentare, in biologia e in medicina.
La proprietà di stimolazione del sistema immunitario è dovuta ai flavoni e ai flavonoidi. La propoli stimola il timo, ghiandola preposta per la regolazione ormonale. I processi immunologici sono influenzati per mezzo diretto, favorendo la fagocitosi e la formazione di anticorpi, e per mezzo indiretto aumentando la resistenza dell'organismo di fronte alle aggregazioni.
L'attività citostatica della propoli è stata testata su cellule tumorali con l'uso di alcuni estratti e quelli provati con le maggiori concentrazioni di galangina, ramnetina e quercitina hanno fermato la divisione delle cellule tumorali dopo

48 ore di incubazione. La diminuzione dei principi attivi diminuisce l'attività antitumorale. La propoli, dato i risultati, potrebbe essere usata contro cellule tumorali in crescita rapida e contro cellule tumorali a crescita lenta (Alì et al., 1997).

Gli erboristi moderni raccomandano questo prodotto apistico per le sue proprietà benefiche per aumentare l'immunoresistenza. La propoli è attualmente utilizzata come rimedio popolare ed è disponibile sotto forma di capsule (in forma pura o combinata con gel di aloe e rosa canina o polline), come estratto (idroalcolico o glicolico), come collutorio (combinato con melissa, salvia, malva e rosmarino), in pastiglie per la gola, creme e in polvere (da utilizzare in gargarismi o per uso interno una volta disciolto in acqua). È disponibile anche in commercio come prodotto purificato in cui la cera è stata rimossa. Si è verificato che la propoli è utile in cosmetica e come costituente di integratori alimentari. L'opinione corrente è che l'uso di preparati standardizzati di propoli sia sicuro e meno tossico di molti farmaci di sintesi (Silici et al.,2015).

È però da menzionare che non esistono ancora standard di qualità per questo prodotto. Un rapporto della Comunità Europea afferma che, il valore economico della propoli è difficile da misurare perché non ha una definizione legale e non è un prodotto registrato (Valutazione delle misure della PAC per il settore dell'apicoltura, rapporto finale, luglio 2013). La ricerca scientifica sulla sua composizione chimica e sulla sua attività biologica è iniziata solo circa 30 anni fa. Poiché le api utilizzano la vegetazione naturale disponibile per creare propoli, c'è un'elevata variabilità nella composizione.

Occorre tenere presente che le api raccolgono i loro prodotti a proprio vantaggio, e che l'uomo trae vantaggio dal loro duro lavoro. Se facciamo attenzione a collocare l'apiario in un luogo ricco di cibo e di fonti materiali di cui hanno bisogno, allora abbiamo api sane che contribuiscono all'impollinazione e al mantenimento della biodiversità e ad altri aspetti secondari che ne derivano. Il ruolo delle api negli ecosistemi marginali e negli agroecosistemi è molto importante, ed è anche essenziale discriminare se l'ubicazione dell'apiario può influenzare le caratteristiche di questo importante

prodotto apistico. Diversi fattori danno origine alla complessità chimica della propoli, ad esempio l'origine fitogeografica, il tempo di raccolta e il tipo di foraggiamento delle api. La complessa composizione chimica della propoli è la ragione più importante per molte delle sfide analitiche. Per ciò che riguarda l'origine fitogeografica, la caratterizzazione cromatografica è un metodo analitico prezioso per identificare i componenti organici nelle diverse parti delle piante (Giupponi et al.,2017).

La propoli è uno dei prodotti apistici più affascinanti, sicuramente un fattore chiave del successo dell'importante macrorganismo dell'alveare, e la sua complessità chimica pone una grande sfida alla comprensione della sua composizione, e dell'attività biologica connessa.

La complessa composizione chimica, in particolare la polarità dei costituenti, rende difficile l'applicazione di una singola tecnica analitica anche nell'era di tecniche molto avanzate.

La propoli è preparata principalmente come estratto alcolico e quindi la macerazione in alcool è il metodo di estrazione più comune utilizzato anche a fini sperimentali.

2. FINALITA' DEL TIROCINIO

Tenendo conto delle considerazioni sopra esposte, lo scopo primario di questo studio è stato infatti quello di caratterizzare due propoli prodotte in una zona collinare (Appennino Ligure-Piemontese, comune: Ponzone – AL; altitudine: 550 m s.l.m.; Latitudine: 44°39046"N; Longitudine: 8°30006"E) e in una zona pianeggiante (Pianura Padana, comune: Visone – AL; altitudine: 100 m s.l.m.; Latitudine 44°35021"N; Longitudine: 8°27037"E) del Nord Italia utilizzando diversi approcci analitici.
I campioni di propoli sono stati donati dall'azienda apistica "Terra di Mezzo" (AL) e raccolti con il metodo delle retine, che consiste nel piazzare una rete nell'arnia tra il melario e la copertura, in modo che le api siano indotte a tappare gli spazi con la propoli. L'azienda apistica comprende 170 alveari stanziati per la raccolta di miele e propoli e 200 nuclei di riproduzione. Con lo studio delle due propoli si è voluto valutare l'efficienza di alcuni metodi analitici per la caratterizzazione della propolis e se, grazie a questi, era possibile individuare delle differenze in resa e composizione chimica legate al luogo di produzione della propolis, con particolare attenzione alla valorizzazione del territorio montano.
Come abbiamo ampiamente discusso nell'introduzione, l'aspetto, la composizione e resa della propoli possono variare per il tipo di vegetazione, della stagione, delle condizioni ambientali e dal luogo di raccolta e sono quindi influenti sulle attività biologiche illustrate.

Le tipologie di piante situate in montagna piuttosto che in pianura potrebbero stimolare una diversa produzione della propoli. Anche rispetto alle proprietà della "colla d'api", quella di montagna e pianura potrebbero manifestare in modo diverso la loro composizione con conseguentemente differenti proprietà tra quelle descritte di antimicrobico, antinfiammatorio, antiossidante, antivirale, antifungino e antibatterico grazie alle condizioni ambientali e

climatiche del territorio. Come abbiamo visto, lo studio della propolis è molto recente e ancora non esistono standard di qualità, essendo questo prodotto erboristico molto soggetto a variabilità.

Concludendo, lo studio vuole dimostrare le caratteristiche di entrambe le propoli, cercando eventuali differenze in termini di composizione e resa.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campionamento

Nella nostra ricerca si è deciso di studiare e caratterizzare due tipi di propoli da apiari stanziali localizzati in pianura nella Valle del Po presso la municipalità di Visone (Visone – Alessandria; altitudine 100 m s.l.m.; Latitudine: 44°35021" N; Longitudine: 8°27037" E) e nell'Appennino Ligure presso la municipalità di Ponzone (Ponzone – Alessandria; altitudine 550 m s.l.m.; Latitudine: 44°39046" N; Longitudine: 8°30006" E), distanti 25 km e caratterizzati da una diversa vegetazione. (Figura 3.1)

I campioni di propoli sono stati raccolti da un apicoltore professionista con in gestione 170 alveari stanziali per la raccolta di propoli e circa 100/200 nuclei di allevamento per la rimonta dell'azienda e la vendita. La propoli viene raccolta sia con il metodo delle retine che con la raschiatura dei telaini. Nel nostro studio consideriamo solo la propoli raccolta con le retine. Tale metodo prevede il posizionamento di una rete al di sotto della soffitta dell'arnia per indurre le api a tappare i buchi della rete con la propoli per rendere nuovamente ermetica l'arnia. I campioni sono stati raccolti in una selezione randomizzata di sei arnie in pianura Padana e sei arnie sull'Appennino ligure-piemontese. Considerando che sono molti i fattori che influenzano la composizione fitochimica della propoli, i campioni che sono stati sottoposti ad una valutazione provengono dallo stesso ceppo di api e sono stati raccolti con lo stesso metodo per eliminare le altre variabili.

Figura 3.1: Campioni di propoli

3.2. Analisi della resa in balsamo e resa in umidità

Queste analisi vengono eseguite utilizzando un agitatore magnetico, carta da filtro, una pompa meccanica, una stufa termostata e una bilancia di precisione. Per quanto riguarda la resa in balsamo, i 12 campioni (sei di pianura indicati con RP e sei in Appennino indicati con RA) sono stati sottoposti ad estrazione con Etanolo (rapporto matrice/solvente 1g/10ml). I campioni, ridotti in piccoli pezzi, sono stati estratti a temperatura ambiente per 24 h con agitatore magnetico, come proposto dalla letteratura (Papotti et al., 2010). (Figura 3.2). Conclusa l'estrazione, l'estratto viene filtrato tramite carta da filtro, raccolto in un pallone tarato e il solvente evaporato in vuoto a 50°C e seccato in pompa meccanica sino a peso costante. (Figura 3.3) Per quanto riguarda l'umidità, un'aliquota di propoli è stata lasciata sedici ore in stufa a 50°C, misurando peso iniziale e peso secco con una bilancia di precisione.

Figura 3.2: Estrazione e filtrazione della propoli

Figura 3.3: Evaporazione con evaporatore rotante

3.3. Analisi spettrofotometrica dei gruppi di molecole come fenoli, flavoni e flavonoidi e dell'attività antiossidante (fenoli totali, flavoni e flavonoli e attività contro i radicali liberi)

L'analisi allo spettrofotometro è stata realizzata utilizzando uno Spettrofotometro doppio raggio Cary 50. Lo spettrofotometro è uno strumento che serve a leggere le assorbanze delle soluzioni ad una certa lunghezza d'onda. Queste analisi vengono eseguite per determinare il contenuto quantitativo generale dei fenoli e di altri gruppi di flavonoidi contenute nella propoli. È stata utilizzata una lunghezza d'onda di 760 nm per i fenoli totali e una di 415 per i flavoni e flavonoli totali. Infine, è stata utilizzata una lunghezza d'onda di 516 nm per l'analisi dell'attività antiossidante con DPPH (2,2,-Defenil-1-picrilidrazile).
L'estratto di propoli per le analisi spettrofotometriche è stato preparato su campione congelato a -80°C che è stato polverizzato per un'ora e poi triturato in un mortaio. Un grammo di campione polverizzato è stato estratto con 30 ml di soluzione etanolica al 70%. Il tutto è stato agitato per 2,5 ore in una stanza buia a media forza (200 ppm). Dopo di che l'estratto etanolico è stato separato per centrifugazione e il residuo è stato filtrato.

3.3.1. Fenoli totali

La prima analisi eseguita è stata la quantificazione dei fenoli totali. L'estratto è stato diluito 1:10 per l'analisi dei fenoli totali. La retta di taratura è stata realizzata a partire da una stock solution di acido gallico 1000 ppm in etanolo (25 mg di acido gallico in 25 ml di metanolo). La soluzione etanolica di acido gallico viene diluita nelle provette per ottenere soluzioni a diversa concentrazione (1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 130 ppm, 60 ppm, 30 ppm, 20 ppm e 10 ppm). Dopo l'aggiunta dei reattivi si ottengono colori molto diversi, dal colore blu intenso si passa ad un azzurro e poi bianco. (Figura 3.4). Il metodo, come descritto da Escriche et al., 2018, prevede la reazione di 100 µl delle soluzioni standard con 100 µl del reagente Folin-Ciocalteau, in 800 µl di soluzione di carbonato di sodio al 5% (reazione in ambiente basico) e 1900 µl di acqua distillata. In successione, all'acqua viene aggiunta l'aliquota di

soluzione, il reagente e infine la soluzione di soda dopo due minuti, dopodiché il tutto viene lasciato in un bagnetto termico a 50°C per venti minuti e la reazione viene infine bloccata col ghiaccio. Il medesimo protocollo utilizzato per i campioni in esame (100 µl di estratto). I risultati sono stati espressi come equivalenti di acido gallico mgGAE/g FW (Fresh Weight). (Figura 3.5)

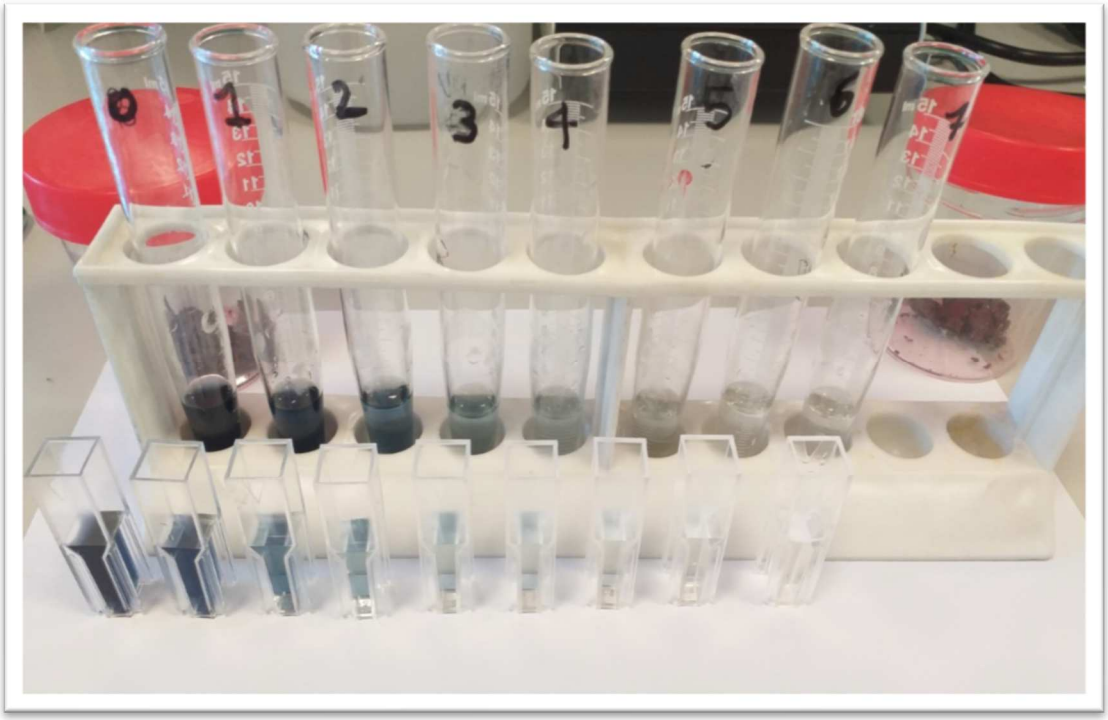


Figura 3.4: Soluzioni di acido gallico utilizzati per la retta di calibrazione

Figura 3.5: Soluzioni degli estratti di propoli

3.3.2. Flavoni e flavonoli totali

Per analizzare il contenuto di flavoni e flavonoli si fa riferimento al metodo di Miguel et al., 2010.

Per la retta di taratura sono state preparate quattro soluzioni standard di quercetina all'80% di etanolo (25, 50, 100 e 200 µg/ml). Una porzione di 0,5 ml di soluzione standard è stata mescolata separatamente con 1,5 ml di etanolo al 95%, 0,1 ml di $AlCl_3$ al 10% in acqua (p/v), 0,1 ml di 1 M di potassio acetato e 2,8 ml di etanolo all'80%. Dopo l'incubazione a 20°C per 30 minuti, l'assorbanza è stata misurata a 425 nm. Il 10% di $AlCl_3$ è stato sostituito dalla stessa quantità di acqua distillata nel campione del bianco. Allo stesso modo, 0,5 ml di ogni estratto diluito a 1:50 (v/v) in etanolo all'80% è stato analizzato come descritto sopra. I risultati sono espressi come mg QE/g FW.

3.3.3. Attività antiossidante

Il DPPH è uno dei metodi più ampiamente utilizzati per analizzare l'attività antiossidante della propoli. Il DPPH è un radicale organico azotato di colore

viola che cambia di colore schiarendosi in base all'effetto antiossidante che ha a contatto con la sostanza analizzata. Per l'analisi è stata utilizzata una soluzione metanolica di DPPH (di 1,1-difenil-2-picrilidrazile) 60 μM. A 2 ml di soluzione 60 μM di DPPH si aggiungono 50 μl di estratto di propoli e si utilizza il metanolo come bianco. La reazione viene lasciata per venti minuti a temperatura ambiente al buio. La lettura viene fatta a 517 nm. L'attività contro i radicali liberi viene misurata come percentuale [(A0–Ax/A0) *100] in cui A0 è l'assorbanza del bianco e Ax quella dell'estratto. (Figura 3.6)

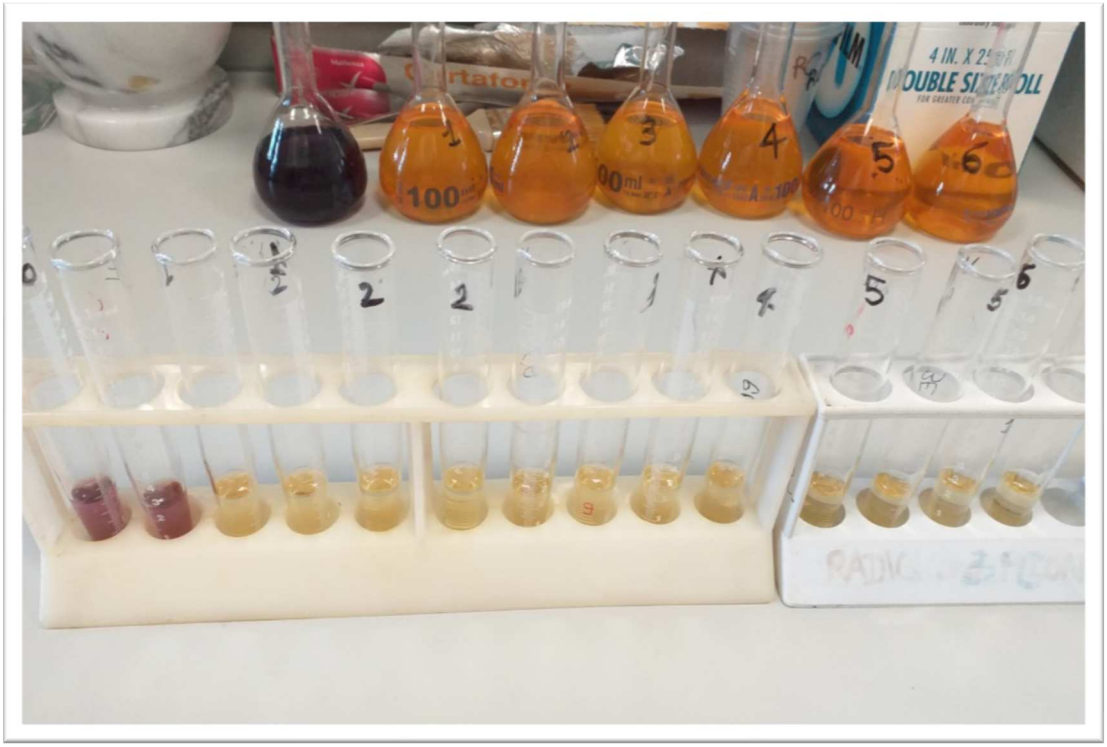


Figura 3.6: Soluzioni utilizzate per l'analisi con DPPH

3.4. Analisi qualitative dei componenti tramite TLC e NMR

Con tali metodi si è voluto indagare il profilo fitochimico della propoli.

3.4.1. Cromatografia su strato sottile (TLC)

Sono state utilizzate lastre di silice 60 F254 dello spessore di 0.25mm (marca Merck).
Per la visualizzazione delle macchie è stato utilizzato un rivelatore UV λ 254nm.

Gli estratti grezzi sono stati analizzati mediante TLC in confronto con alcuni standard utilizzando una miscela eluente costituita da toluene/acetato di etile/acido formico 6/5/1.
Gli standard presi in considerazione sono la quercetina, la rutina, la crisina, l'acido ferulico, l'acido m-cumarico, l'acido cinnamico e l'acido caffeico.

3.4.2. Analisi NMR

Gli spettri NMR dei campioni sono stati registrati su uno spettrometro Bruker Avance con frequenza operativa protonica 600 MHz con una sonda TBI da 5 mm. Gli spettri sono stati eseguiti a 300 K utilizzando 16 K di TD (dominio del tempo), tempo di acquisizione 1,27 min, tempo di delay 1,0 s e 48 il numero di scansioni. La larghezza spettrale era di 12019 Hz. Per l'analisi ^{1}H-NMR 2-3 mg di estratti grezzi sono stati disciolti in 0,6 mL di DMSO-d6, mentre per gli spettri ^{13}C-NMR sono stati utilizzati 10-20 mg per ogni campione.

4. RISULTATI

4.1. Analisi della resa in balsamo e umidità

Le analisi svolte hanno mostrato che la resa in balsamo è più alto nei campioni raccolti in zona collinare denominati A1-A6 (74%±9,71) mentre nei campioni degli apiari di Visone (pianura, P1-P6) è risultata più basso (52%±16) e la differenza è risultata statisticamente significativa. Questo perché probabilmente le api trovano più resine balsamiche in alta quota mentre in pianura producono una propoli più cerosa per isolare termicamente l'alveare soprattutto dal caldo. (Tabella 4.1)

Campione	Peso propoli (g)	EtOH (ml)	Estratto (g)	recupero (%)
Appennino				
A1	0.5227	5.2	0.4360	83
A2	0.5089	5.1	0.4120	81
A3	0.5262	5.2	0.3872	74
A4	0.5209	5.2	0.3373	65
A5	0.5214	5.2	0.4151	80
A6	0.5213	5.2	0.3064	59
Media: 74 %				
Dev. st: 9,71				
Pianura				
P1	0.5007	5.0	0.1954	39
P2	0.5453	5.4	0.3319	61
P3	0.5174	5.2	0.1869	36
P4	0.5643	5.6	0.3335	59
P5	0.5389	5.3	0.2285	42

P6	0.5572	5.5	0.4434	79
Media: 52%				
Dev. st 16				

Tabella 4.1. resa in balsamo in percentuale del peso totale (A=appennino, P= pianura)

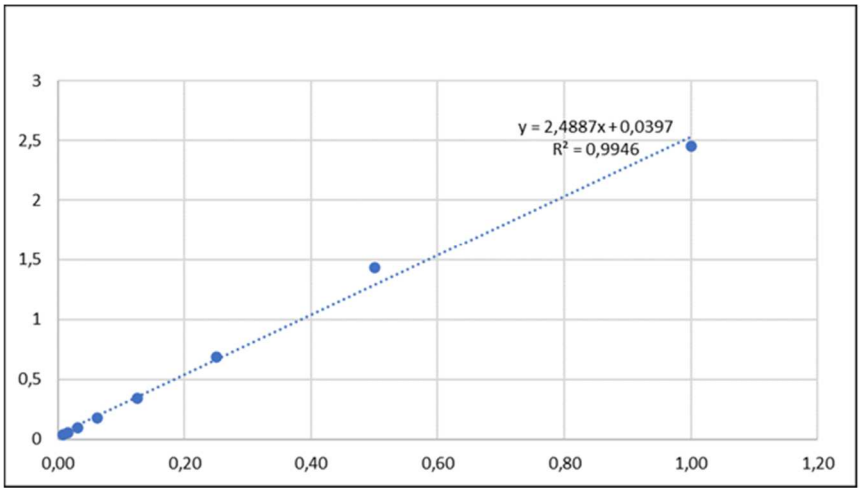
Un valore medio molto simile è stato trovato per il contenuto di umidità, leggermente più alto nella propoli di collina (0,74%) rispetto alla pianura (0,69%) ma non in maniera statisticamente significativa. La propoli è una sostanza con bassa umidità probabilmente perché ha un ruolo antibatterico e deve resistere per lungo tempo nell'alveare. (tabella 4.2)

Campioni	**peso iniziale**	**peso finale**	**Sostanza secca (%)**	**Umidità (%)**
Appennino				
A1	0,2023	0,1999	98,8136	1,1864
A2	0,2092	0,2084	99,6176	0,3824
A3	0,2091	0,2067	98,8522	1,1478
A4	0,2025	0,2007	99,1111	0,8889
A5	0,2054	0,2047	99,6592	0,3408
A6	0,2053	0,2043	99,5129	0,4871
Media: 0,74 %				
Dev. st: 0,38				
Pianura				
P1	0,2066	0,2031	98,3059	1,6941
P2	0,2016	0,2001	99,2560	0,7440
P3	0,2035	0,2028	99,6560	0,3440
P4	0,2071	0,2059	99,4206	0,5794
P5	0,2099	0,2092	99,6665	0,3335
P6	0,2088	0,2079	99,5690	0,4310
Media: 0,69 %				
Dev. st: 0,52				

Tabella 4.2. Umidità percentuale

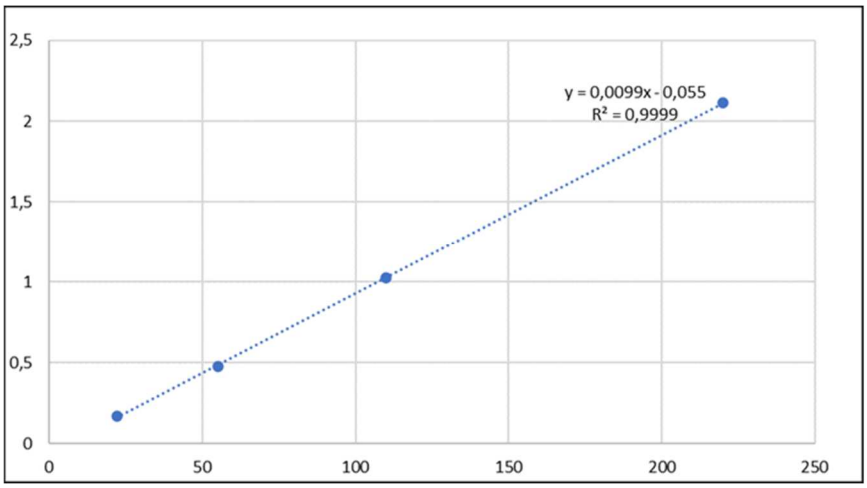
4.2. Analisi spettrofotometrica dei fenoli totali, flavoni e flavonoli totali e dell'attività antiossidante (Free Radical Scavenging Activity)

I fenoli totali, calcolati come millegrammi equivalenti di acido gallico per grammi di peso fresco (mg GAE/g FW) e i flavoni e flavonoli totali espressi come equivalenti di quercetina per grammi di peso fresco (mg QE/g FW) e l'attività di antiradicalica misurata tramite il DPPH non variano significativamente tra i lotti di collina e pianura. Il valore medio dei fenoli totali è stato misurato come 242,42 mg GAE/g FW per il campione raccolto in collina a Ponzone e 236,32 mg GAE/g FW per il campione raccolto in pianura presso Visone. Si è visto che nella propoli di collina la presenza di flavoni e flavonoli ha una media di 32,14 mg QE/g FW ed è di poco superiore a quella presente in pianura che è rispettivamente di 26,91 mg QE/g FW. Tuttavia, questi valori non sono risultati statisticamente significativi. Le analisi sono state ripetute in triplicato e il dato riportato in tabella rappresenta il valore medio (figura 4.1 e 4.2; tabella 4.3, 4.4 e 4.5).



retta 10/07 luglio	
mg/ml	760 nm
1,00	2,4546
0,50	1,4272
0,25	0,6846
0,13	0,3424
0,06	0,1754
0,03	0,1004
0,02	0,0546
0,01	0,0367

figura 4.1: retta di calibrazione dell'acido gallico per la quantificazione dei fenoli totali



µg/ml	425 nm
220	2,1165
110	1,0255
55	0,476
22	0,173

figura 4.2: retta di calibrazione della quercetina per la determinazione dei flavoni e flavonoli totali

Campione	Assorbanze 760 nm	Concentrazione (ppm – µg/ml)	mg GAE/ml	mg GAE/g FW
Appennino				
A1	0,6559	0,24759915	2,47599148	247,60
A2	0,67835	0,25661992	2,56619922	256,62
A3	0,6425	0,24221481	2,42214811	242,21
A4	0,63985	0,24115	2,41149998	241,15
A5	0,65065	0,24548961	2,45489613	245,49
A6	0,59075	0,22142082	2,21420822	221,42
Media: 242,42 mg GAE/g FW				
Dev. st: 11,67				
Pianura				
P1	0,6310	0,237594	2,375939	237,59
P2	0,7152	0,271407	2,714068	271,41
P3	0,6329	0,238337	2,383373	238,34
P4	0,7376	0,280428	2,804275	280,43
P5	0,4508	0,165187	1,651866	165,19
P6	0,5997	0,224997	2,24997	224,99
Media: 236,32 mg GAE/g FW				
Dev. st: 40,92				

Tabella 4.3. fenoli totali espressi in equivalenti di acido gallico (mg GAE/g FW)

Campione	Assorbanza 425 nm	Concentrazione (ppm – µg/ml)	mg QE/ml	mg QE/g FW
Appennino				
A1	0,725	78,79	0,393939	39,39
A2	0,64825	71,04	0,355177	35,52
A3	0,52175	58,26	0,291288	29,13
A4	0,526	58,69	0,293434	29,34
A5	0,559	62,02	0,310101	31,01
A6	0,50775	56,84	0,284217	28,42
Media: 32,14 mg QE/g FW				
Dev. st.: 4.38				
P1	0,4685	52,88	0,264394	26,44
P2	0,45325	51,34	0,256692	25,67
P3	0,46325	52,35	0,261742	26,17
P4	0,59325	65,48	0,327399	32,74
P5	0,34425	40,33	0,201641	20,16
P6	0,54425	60,53	0,302652	30,27
Media: 26,91 mg QE/g FW				
Dev. st.: 4.31				

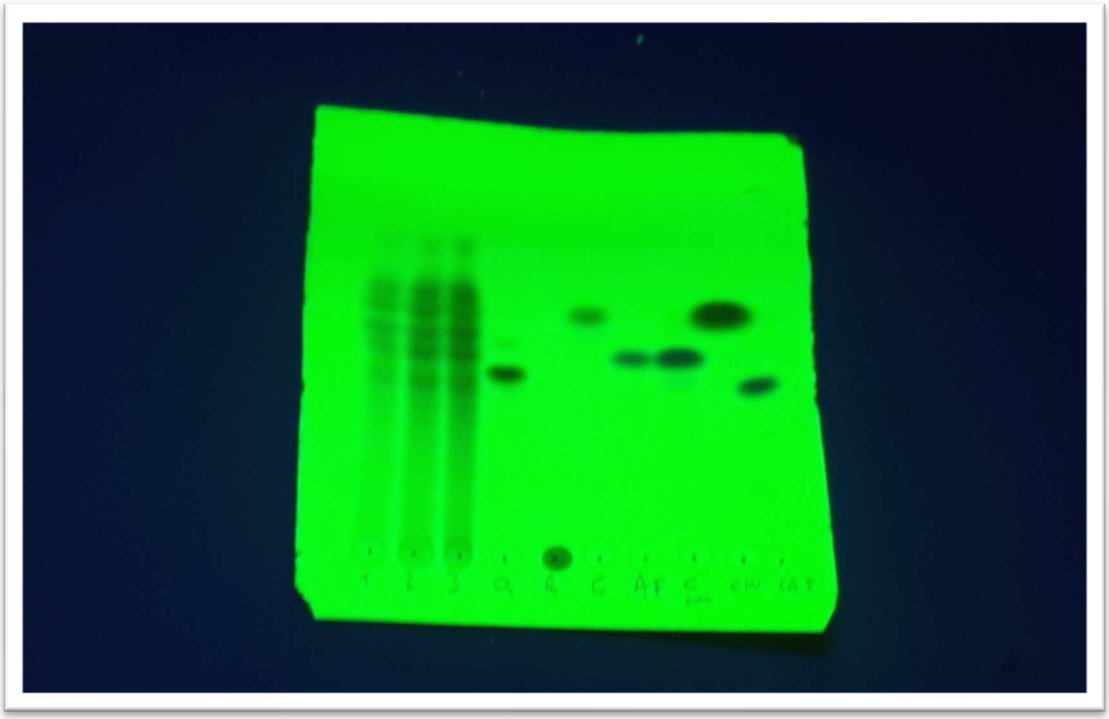
Tabella 4.4 flavoni e flavonoli totali espressi in equivalenti di quercetina

Campione	Assorbanza 517 nm	FRSA (A0-Ax/A0)*100
Bianco (A0)	0,6151	100
Appennino		
A1	0,09505	46,0072
A2	0,09655	45,7632
A3	0,11825	42,2330
A4	0,0995	45,2832
A5	0,09995	45,2100
A6	0,0978	45,5598
Media: 45%		
Dev. St.: 1.39		
Pianura		
P1	0,09155	46,6262
P2	0,09025	46,8376
P3	0,09015	46,8538
P4	0,1045	44,5209
P5	0,0909	46,7319
P6	0,08865	47,0977
Media: 46,44%		
Dev. st: 0,96		

Tabella 4.5. attività antiradicalica misurata come FRSA (Free Radical Scavenging Activity)

4.3. Analisi TLC

I campioni di propoli analizzati in TLC mostrano un profilo molto simile caratterizzato dalla presenza di 6 macchie con Rf rispettivamente di 0.80; 0.67; 0.62; 0.60; 0.55 e 0.46. In tutti i campioni si può escludere la presenza di rutina (Rf 0) e quercetina (Rf 0.50). Gli estratti si caratterizzano per la presenza di crisina (Rf 0.62), acido caffeico (Rf 0.46) e acido trans-cinnamico (Rf 0.67). L' acido ferulico (Rf 0.56), nelle condizioni analitiche utilizzate, coeluisce con l'acido m-cumarico (Rf 0.56) e si differenzia da questo per la colorazione più rapida a seguito di esposizione all'aria, nell'estratto potrebbero essere presenti entrambi. Le figure 4.3 e 4.4 riportano le analisi TLC dei vari campioni.



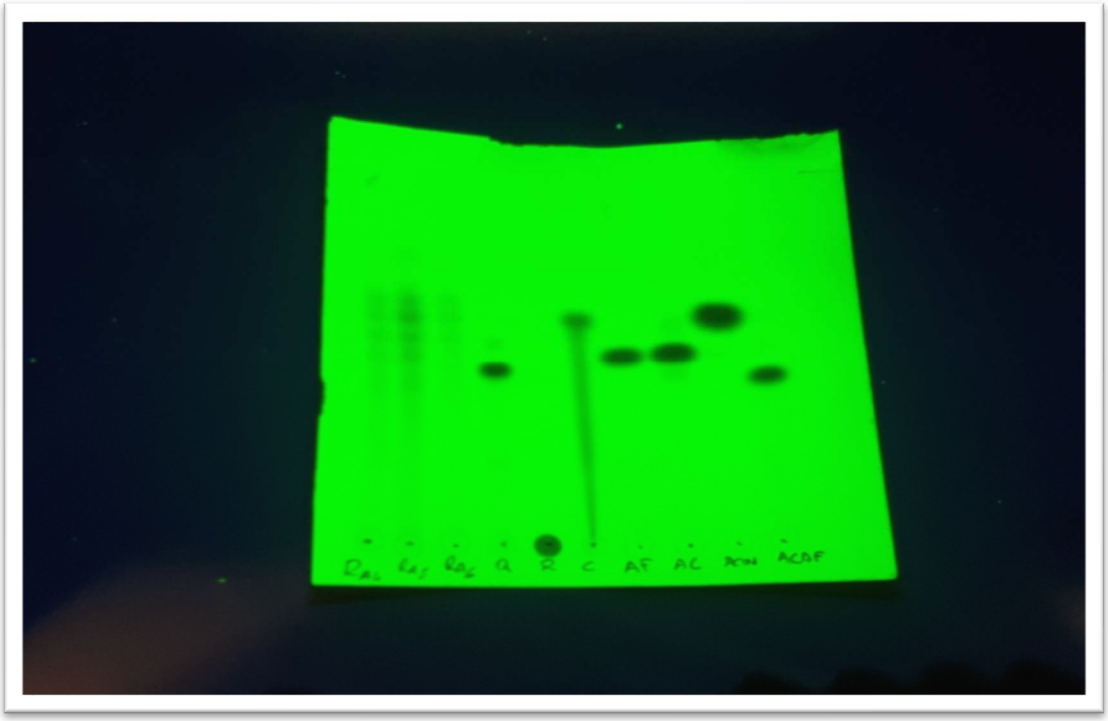
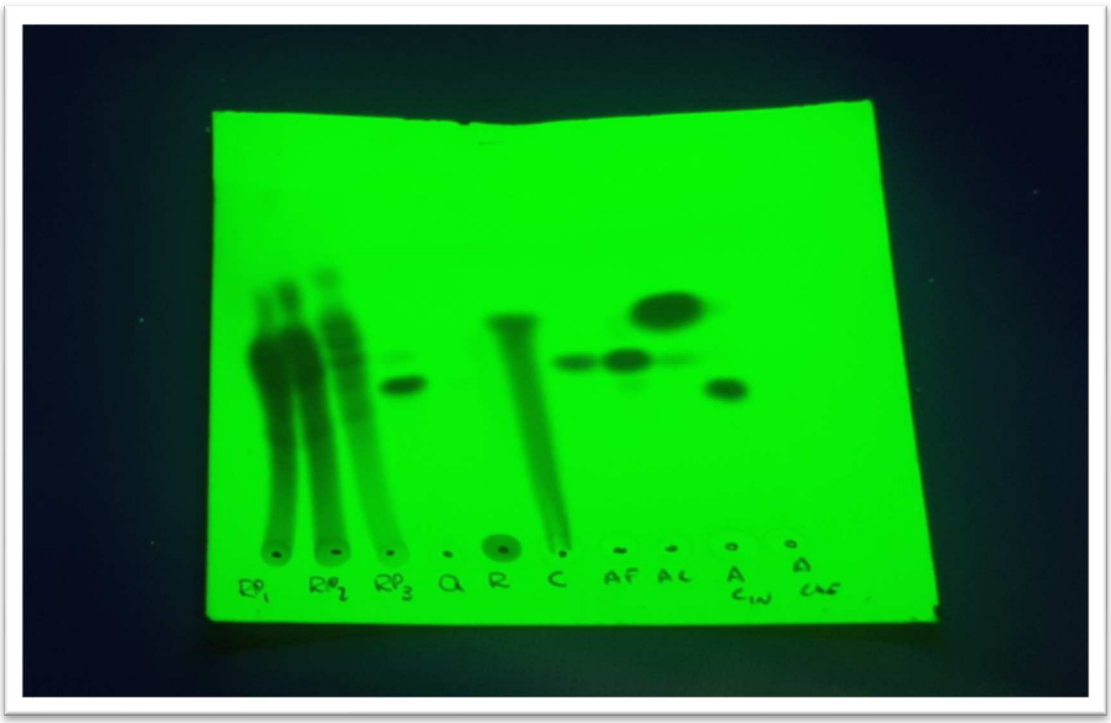


Figura 4.3: TLC dei campioni di propoli dell'Appennino dell'Appennino A1-A6, R=rutina, C= crisina, AF= acido ferulico, AC=acido m-cumarico, ACin=acido t-cinnamico, ACaf= acido caffeico



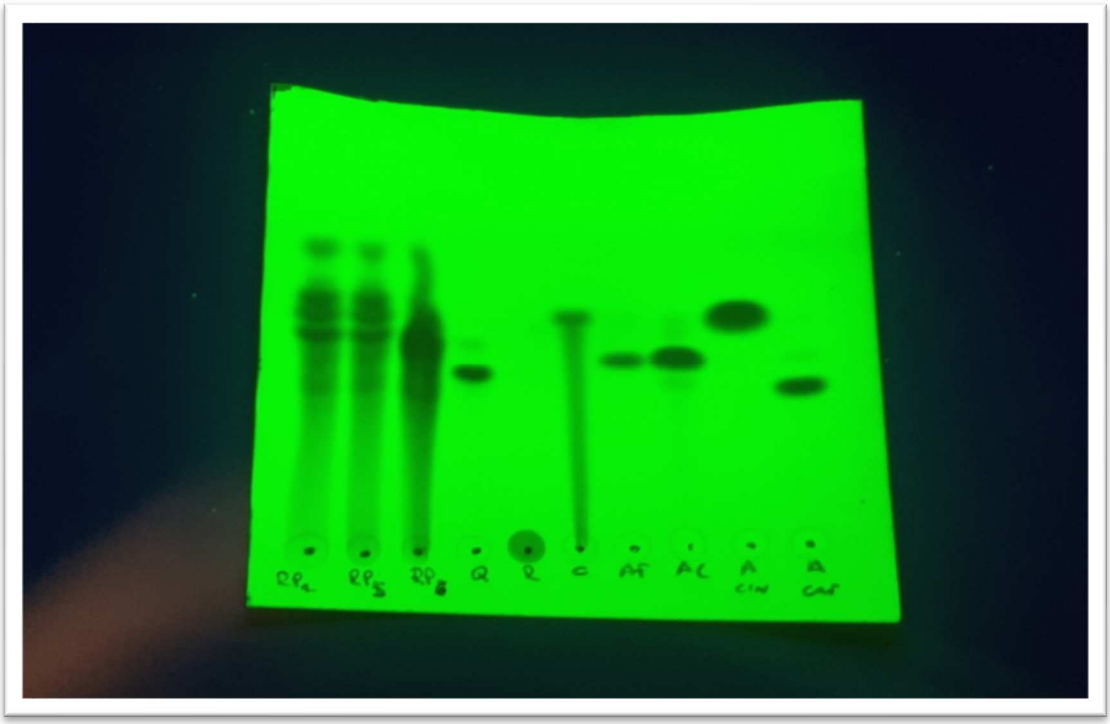


Figura 4.4: TLC dei campioni di propoli di pianura pianura P1-P6, R=rutina, C= crisina, AF= acido ferulico, AC=acido m-cumarico, ACin=acido t-cinnamico, ACaf= acido caffeico

4.4. Analisi NMR

I grezzi ottenuti sono stati analizzati mediante spettroscopia NMR. I profili ^{1}H NMR dei campioni analizzati risultano essere complicati per la presenza di numerosi picchi risuonanti tra 1 e 13.5 ppm. I campioni risultano essere molto simili tra loro, i segnali principali associabili ai metaboliti secondari caratterizzanti l'estratto risultano essere presenti sia nei campioni di pianura che in quelli di montagna, in alcuni campioni si può notare un rapporto quantitativo leggermente differente. Segnali diagnostici relativi a gruppi fenolici chelati, tipici di flavonoidi, o gruppi idrossilici di funzioni carbossiliche sono evidenziabili a campi bassi tra 12.0 e 13.3 ppm. Il fenilestere dell'acido caffeico, noto con il nome di CAPE, acronimo del nome del composto in inglese, non sembra essere presente dato che non si rilevano i segnali delle unità metileniche risuonanti a 2.95 e 4.32 ppm. Nelle figure 4.5-4.8 si riportano gli spettri ^{1}H NMR e le relative espansioni a bassi campi per i campioni A5 e P4.

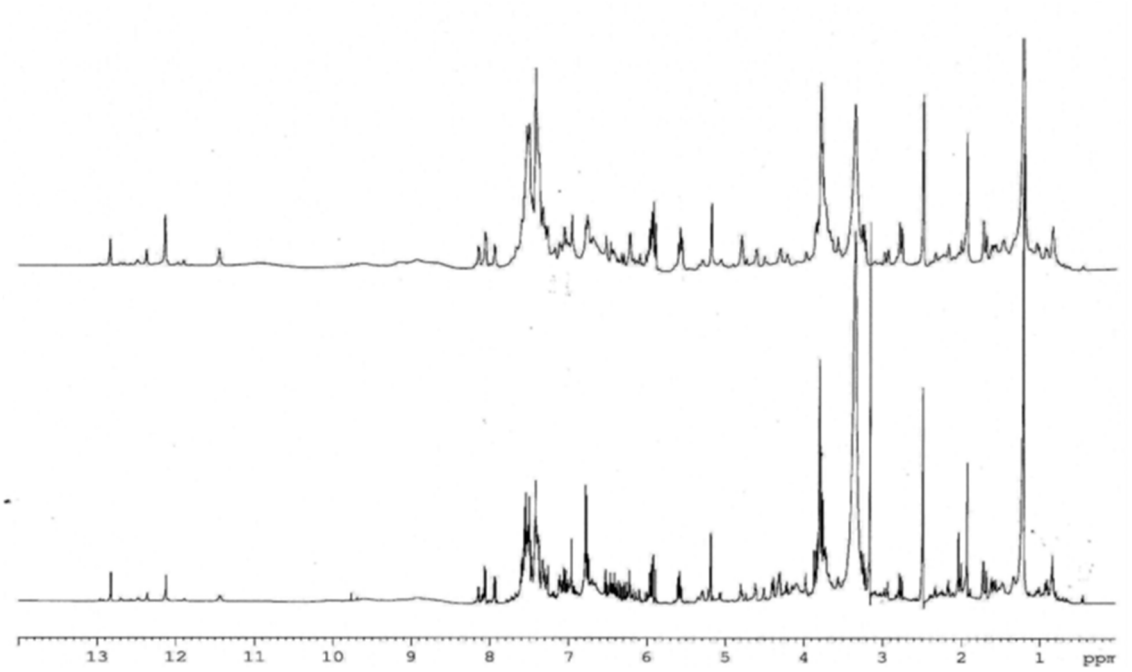


Figura 4.5: Spettri ^{1}H NMR in DMSO-d6 dell'estratto P4 in alto e A5 in basso

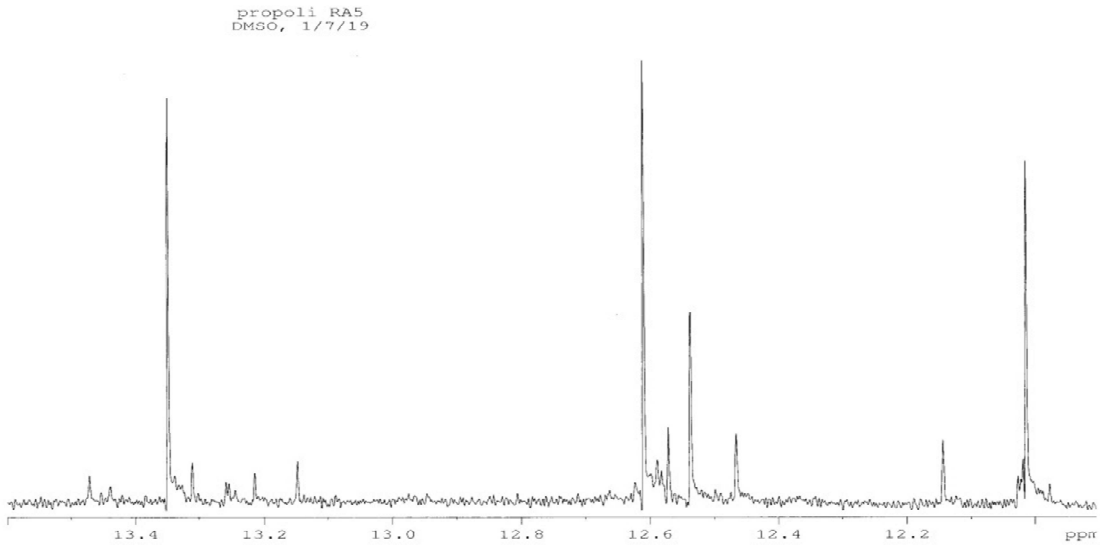


Figura 4.6: Espansioni NMR zona spettrale tra 11.9 e 13.6 ppm per l'estratto A5

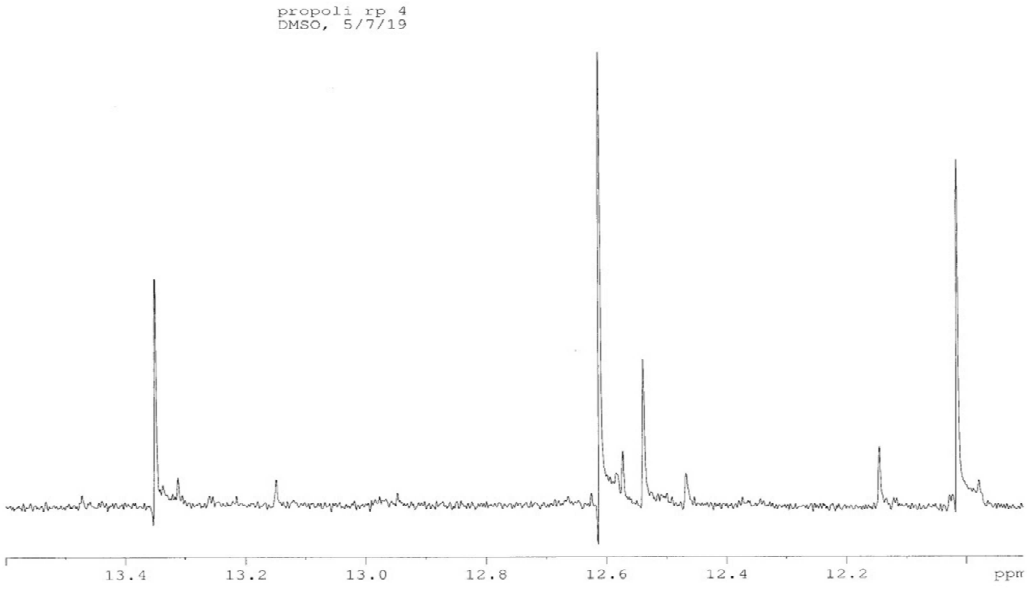


Figura 4.7: Espansioni NMR zona spettrale tra 11.9 e 13.6 ppm per l'estratto P4

Dall'analisi dei principali segnali NMR, in confronto con i dati di letteratura (Papotti et al., 2010), si possono identificare nei due campioni pinocembrina, crisina, galangina, pinobanschina-3-O-acetato e pinostrobina. Altri composti come acidi fenolici, pinobaschina, Kaenferide, apigenina sono presenti come componenti minoritari. Rutina e quercetina non risultano presenti in entrambi gli estratti. Si possono inoltre evidenziare specifiche risonanze attribuibili a esteri del glicerolo come 1,3-di-p-coumaril-2-acetil-glicerolo e 1,3-diferulil-p-coumarato per la presenza di segnali risuonanti nella zona tra 4.2-5.3 ppm, un'area dello spettro ricca di segnali sovrapposti e segnali singoletti dei gruppi acetilici a 2.05 ppm. La presenza di gruppi acetilici è stata confermata nello spettro 1^3C (Figura 4.8) che mostra risonanze tra 160 e 170 ppm per il carbonio quaternario e i gruppi metilici a 19.7 e 21.9 ppm. In questo spettro la presenza del glicerolo è confermata per i segnali nella zona 63-71 ppm.

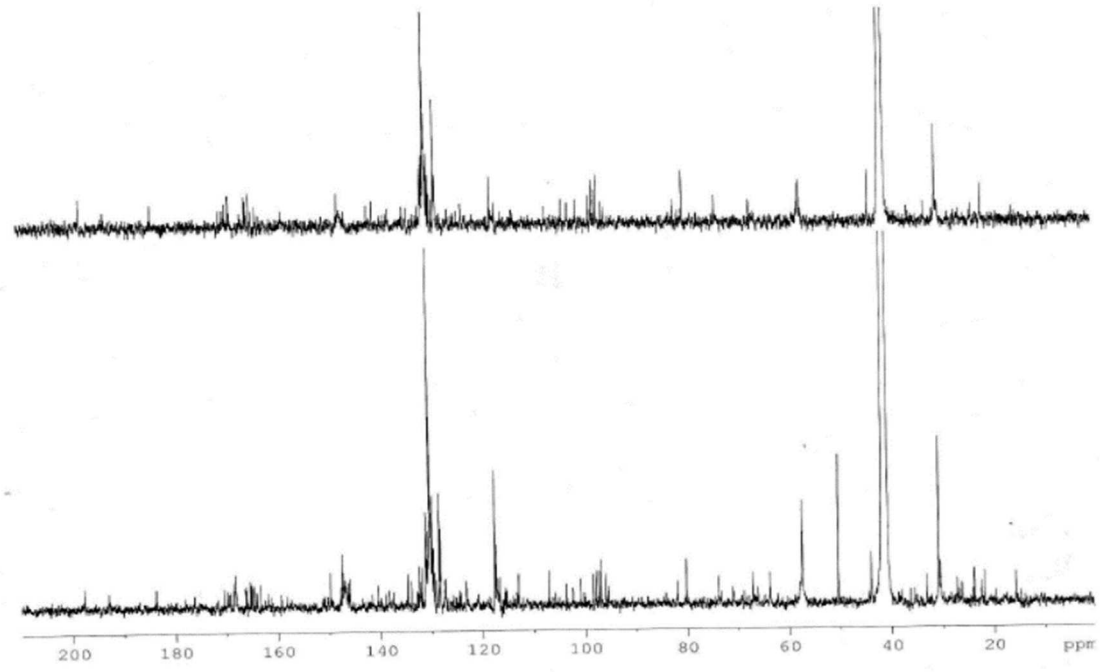


Figura 4.8: Spettri ^{13}C NMR in DMSO-d6 dell'estratto P4 in alto e A5 in basso

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le analisi svolte sui campioni di propoli derivanti dall'Appennino e dalla pianura hanno dimostrato che la composizione della propoli varia a seconda della vegetazione, del clima, della stagione e delle condizioni ambientali. Entrambe le propoli hanno caratteristiche simili ma si differenziano per alcune peculiarità.

Grazie all'utilizzo di specifiche analisi si è potuto valutare le componenti della propoli.

Si è dimostrato come la resa in balsamo maggiore in montagna rispetto alla pianura, in quanto in alta quota sono presenti più resine balsamiche. Come già accennato, questo probabilmente succede perché le api trovano più resine balsamiche in alta quota mentre in pianura producono una propoli più cerosa per isolare termicamente l'alveare soprattutto dal caldo. L'umidità è risultata sempre molto bassa, perché la propoli ha una funzione di materiale isolante e disinfettante che deve durare a lungo nell'alveare.

Le analisi spettrofotometriche sono servite per la quantificazione delle sostanze presenti e in questo caso hanno evidenziato come nella propoli prodotta più in quota sia maggiore la presenza di fenoli, flavoni e flavonoli rispetto alla propoli di pianura anche se non in maniera significativa.

L'attività antiossidante invece è risultata pressoché simile in entrambe le tipologie di propoli con un leggera percentuale maggiore nella propoli di pianura.

Nelle analisi TLC e NMR evidenziano caratteristiche simili fra i campioni dove si nota la presenza di flavonoidi e acidi fenolici come ad esempio crisina, acido pinocembrina, acido ferulico e acido m-cumarico. Di particolare interesse è la presenza di esteri di glicerolo con acidi fenolici, i componenti sono evidenziati per la presenza di segnali caratteristici all'NMR.

La propoli resta una delle matrici naturali più complesse, la cui efficacia è direttamente correlata alla sua variabilità, che a sua volta è legata alla vegetazione intorno alle arnie. Le api scelgono le gemme da cui raccogliere il materiale per difendere e isolare l'arnia con la propoli.
In conclusione, si può confermare che la scelta del luogo di produzione della propoli è molto importante per ottenere un prodotto di maggiore qualità. La propoli di collina è risultata con caratteristiche qualitative superiori a quelle di pianura per il tipo di vegetazione presente e per le caratteristiche ambientali complessive che si trovano sull'Appennino. La propoli è inoltre un prodotto apistico secondario da valorizzare che potrebbe rappresentare un'importante integrazione, per le sue caratteristiche qualitative, nelle attività apistiche, e in generale agricole, montane.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alì, A. (1997). La propoli: chimica, farmacologia e terapia. Edizione Pianta medica, Perugia, Italia.
- Bogdanov, S. (2012). Propolis: composition, health, medicine: a review. Bee Product Science editor.
- Bogdanov, S., Bankova, V. (2012). The propolis book. Bee hexagon. Bee Product Science editor.
- Bonvehí, J. S., & Coll, F. V. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*(5), 529-532.
- Boukraâ, L., Abdellah, F., & Ait-Abderrahim, L. (2013). Antimicrobial properties of bee products and medicinal plants. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. URL: http://www. formatex. info/microbiology4/vol2. html (дата обращения: 20.05. 2017)*.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, *73*, S1-S6.
- Cherbuliez, T., Domerego, R., Ed. 2006. Curarsi con tutti i prodotti delle api. Edito Edizioni Red
- Cottica, S. M., Sabik, H., Antoine, C., Fortin, J., Graveline, N., Visentainer, J. V., Britten, M. (2015). Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT-Food Science and Technology*, *60*(1), 609-614.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., Campo Fernandez, M., Marquez Hernandez, I., Rosado, A., & Rastrelli, L. (2007). Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC− PDA, HPLC− MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(18), 7502-7509.
- Escriche, I., & Juan-Borrás, M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, *106*, 834-841.

- Farnley. (2003). Propoli – L'antibiotico naturale. Macro-edizioni
- Ghisalberti, E.L. (1979). Propolis—review. *BeeWorld*, *60*, 59– 84.
- Giupponi, L., Pentimalli, D., Manzo, A., Panseri, S., Giorgi, A. (2017). Effectiveness of fine root fingerprinting as a tool to identify plants of the Alps: results of preliminary study. *Plant Biosystems*, *152*, 464-473.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(4), 1220-1234.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of ethnopharmacology*, *64*(3), 235-240.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*.
- Lubert de l'Hoste, E., Crivelli, A. (1982). L'ape al servizio della salute. Ed. 2 Casa Editrice Maccari, Parma, Italia.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, Springer Verlag, 1995, 26 (2), pp.83-99.
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcıa-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*, *74*(2), 105-112.
- Mejanelle, P., Bleton, J., Goursaud, S., & Tchapla, A. (1997). Identification of phenolic acids and inositols in balms and tissues from an Egyptian mummy. *Journal of Chromatography a*, *767*(1-2), 177-186.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., & Antunes, M. D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of

propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(12), 3418-3423.

- Papotti, G., Bertelli, D., Plessi, M., & Rossi, M. C. (2010). Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. *International journal of food science & technology*, *45*(8), 1610-1618.
- Propolis – monografia – www.fao.org/docrep/w0076e/w.0076e14.htm 2001
- Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L. M., Breyer, H., & Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(13), 2363-2370.
- Sangalli, A. (1990). Propolis. *Ape Nostra Amica*, *12*(4), 16-25.
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, KH., Reichling, J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Anal Chim Acta* 635:115-120
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of ethnopharmacology*, *133*(2), 253-260.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of ethnopharmacology*, *99*(1), 69-73.
- da Silva, R. O., Andrade, V. M., Rêgo, E. S. B., Dória, G. A. A., dos Santos Lima, B., da Silva, F. A., ... & Gomes, M. Z. (2015). Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *Journal ofethnopharmacology*, *170*, 66-71.
- Speciale propoli. (1991). La propoli. Origine, composizione, attività biologica. *Natura n°9, 3-8.*

- Stevens, J. F., Hart, H. T., & Wollenweber, E. (1995). The systematic and evolutionary significance of exudate flavonoids in Aeonium. *Phytochemistry*, *39*(4), 805-813.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, *2013*.
- Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de Las Heras, B., Delporte, C. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of ethnopharmacology*, *168*, 37-44.
- Villanueva, V. R., Barbier, M., Gonnet, M., & Lavie, P. (1970). Les flavonoides de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine. *Ann Inst Pasteur*, *118*(1), 84-87.

7. SITOGRAFIA

- www.chimicare.org
- www.chimicaonline.it
- www.fao.org
- www.flavonine.com
- www.pianetachimica.it
- www.prodalricerche.it