

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA

CORSO DI LAUREA IN FARMACIA

TESI SPERIMENTALE DI LAUREA

Caratterizzazione del miele mediante spettroscopia di fluorescenza front-face ed elaborazione chemiometrica delle matrici di eccitazione-emissione.

Relatore: Prof.ssa Monica Casale

Candidata: Cecilia Pestarino

Anno accademico:2025/2026

Introduzione

Il miele rappresenta uno degli alimenti naturali di maggiore interesse sia dal punto di vista nutrizionale sia sotto il profilo economico e commerciale. Le sue caratteristiche chimico-fisiche e sensoriali dipendono da numerosi fattori, tra cui la specie botanica di origine del nettare, l'area geografica di produzione, le condizioni climatiche e le pratiche apistiche adottate. Per questo motivo, la determinazione dell'origine botanica e geografica costituisce un aspetto fondamentale per la valorizzazione del prodotto, la tutela delle produzioni di qualità e il contrasto alle frodi alimentari.

Negli ultimi anni, l'interesse verso metodologie analitiche rapide, affidabili e non distruttive per la caratterizzazione del miele è cresciuto notevolmente. In questo contesto, la spettroscopia di fluorescenza, associata all'elaborazione chemiometrica dei dati, rappresenta un approccio particolarmente promettente, in quanto consente di ottenere informazioni dettagliate sulla composizione del campione attraverso l'analisi della sua risposta spettrale. Le matrici di eccitazione-emissione (Excitation-Emission Matrices, EEM), elaborate mediante opportuni strumenti chemiometrici, permettono infatti di individuare differenze tra campioni apparentemente simili e di sviluppare modelli per la loro classificazione.

L'analisi svolta nel presente lavoro di tesi sperimentale si inserisce nell'ambito di un progetto di ricerca sviluppato in collaborazione con l'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, finalizzato allo sviluppo di procedure analitiche innovative per la caratterizzazione di campioni di miele italiano e straniero. L'obiettivo principale del progetto è valutare l'efficacia dell'integrazione tra spettroscopia di fluorescenza e analisi chemiometrica per l'identificazione dell'origine botanica e della provenienza geografica dei campioni.

Nello specifico, il presente lavoro è stato finalizzato all'acquisizione e all'analisi delle matrici di eccitazione-emissione di un insieme di campioni di miele, con lo scopo di individuare le caratteristiche spettrali maggiormente correlate alla loro origine. Durante l'attività sperimentale sono state acquisite le matrici di eccitazione-emissione relative a 54 campioni di miele. La maggior parte dei campioni apparteneva alle varietà di acacia e castagno; dal punto di vista della provenienza geografica, 36 campioni erano di origine italiana, mentre i restanti provenivano da Paesi esteri.

I dati sperimentali ottenuti sono stati successivamente elaborati mediante tecniche chemiometriche. Nell'ambito del presente lavoro di tesi, l'attenzione è stata rivolta esclusivamente all'analisi esplorativa dei dati attraverso l'applicazione dell'Analisi delle Componenti Principali (Principal Component Analysis, PCA). Tale approccio ha consentito di investigare la struttura del dataset, evidenziare eventuali raggruppamenti naturali tra i campioni e valutare la presenza di relazioni tra le caratteristiche spettrali e l'origine botanica e geografica del miele. L'analisi mediante PCA ha inoltre permesso di individuare le principali fonti di variabilità presenti nei dati, fornendo informazioni preliminari utili per la successiva interpretazione dei risultati.

Sommario

Introduzione	2
1. <i>Il miele: composizione, proprietà e adulterazione.</i>	5
1.1 Composizione chimica del miele.....	7
1.2 Caratteristiche fisiche	10
1.3 Proprietà terapeutiche e nutrizionali	12
1.4 Applicazioni nella medicina	14
1.5 Miele adulterato.....	16
2. <i>Fluorescenza e spettrofluorimetria: strumentazione, effetti ottici e trattamento multivariato dei dati</i>	18
2.1 Fluorescenza	18
2.2 Spettrofluorimetro.....	21
2.3 Spettri di emissione ed eccitazione	24
2.4 Matrici di emissione-eccitazione (EEMs).....	25
2.5 Bande indesiderate negli spettri: errori da evitare	27
3. <i>Tecniche chemiometriche</i>.....	30
3.1 Analisi delle componenti principali	31
3.2 Pretrattamenti	34
4. <i>Parte sperimentale</i>	36
4.1 Campionamento.....	37
4.2 Procedura sperimentale	41
4.3 Strumentazione e Software	46
4.4 Risultati e discussione	48
5. <i>Conclusioni</i>.....	60
<i>Bibliografia</i>	62

1. Il miele: composizione, proprietà e adulterazione.

Il presente capitolo offre una panoramica approfondita sul miele. Il Decreto Legislativo 179/2004 definisce il miele come "la 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 che esse bottinano trasformano, combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare". [1]

Il legislatore ha inoltre provveduto a definire in modo puntuale le diverse tipologie di miele riconosciute, classificandole in base all'origine della materia prima, al metodo di produzione e di estrazione, nonché alla destinazione d'uso del prodotto.

In relazione all'origine, il miele può essere distinto in:

- miele di fiori o miele di nettare, ottenuto esclusivamente dal nettare delle piante;
- miele di melata, prodotto prevalentemente a partire da sostanze secrete da insetti succhiatori, appartenenti all'ordine degli Emitteri, presenti su parti vive delle piante, oppure da secrezioni provenienti direttamente da parti vegetali vive.[1]

In funzione del metodo di produzione e/o di estrazione, il legislatore individua ulteriori categorie:

- Miele di favo, costituito da miele immagazzinato dalle api in celle opercolate di favi di nuova costruzione o in sottili fogli cerei ottenuti esclusivamente da cera d'api, privi di covata, e commercializzato in favi interi o in porzioni;
- Miele con pezzi di favo o sezioni di favo nel miele, nel quale sono presenti uno o più frammenti di favo immersi nel miele;
- Miele scolato, ottenuto per scolatura dei favi disopercolati non contenenti covata;

- Miele centrifugato, ricavato mediante centrifugazione dei favi disopercolati e privi di covata;
- Miele torchiato, prodotto attraverso la pressione dei favi non contenenti covata, senza ricorrere a riscaldamento oppure con riscaldamento moderato, comunque non superiore a 45 °C;
- Miele filtrato, ottenuto mediante un processo di filtrazione che consente l'eliminazione di sostanze organiche o inorganiche estranee, con conseguente rimozione significativa dei granuli pollinici.

Infine, in base alla destinazione d'uso, viene definito il miele per uso industriale, ossia un prodotto idoneo all'impiego come ingrediente in altri alimenti destinati a successiva trasformazione. Tale tipologia di miele può presentare caratteristiche non conformi al consumo diretto, quali gusto o odore anomali, l'avvio di processi fermentativi, effervescenza o alterazioni dovute a surriscaldamento. [1]

1.1 Composizione chimica del miele

Il miele è un prodotto naturale ad elevata concentrazione di zuccheri semplici, principalmente fruttosio e glucosio, che risultano immediatamente a disposizione dell'organismo umano. A differenza del saccarosio gli zuccheri del miele non necessitano di processi digestivi preliminari. [3]

La produzione del miele avviene a partire dal nettare floreale o dalla melata, raccolti dalle api e sottoposti a un processo di trasformazione biochimica mediante l'aggiunta di enzimi secreti dalle ghiandole ipofaringee [2]. Durante tale processo si verifica una progressiva riduzione del contenuto di acqua e una modificazione della composizione chimica del substrato iniziale, con incremento della concentrazione zuccherina e formazione di acidi organici e altri composti secondari.

Dal punto di vista compositivo, il miele è costituito prevalentemente da carboidrati (75–80%), seguiti dall'acqua (16,6–18,5%). Le restanti frazioni comprendono acidi organici, sali minerali e sostanze azotate organiche. Vitamine, composti aromatici e altri costituenti minori sono presenti in concentrazioni inferiori.

Il contenuto di acqua rappresenta un parametro qualitativo di primaria importanza, in quanto influisce direttamente sulla conservabilità del prodotto. Valori elevati favoriscono processi fermentativi, mentre contenuti troppo bassi compromettono la lavorabilità del miele a causa della ridotta solubilità degli zuccheri. [4]

Il profilo glucidico del miele è altamente complesso. Glucosio e fruttosio rappresentano circa il 75% degli zuccheri totali e per questo motivo determinano le caratteristiche fisiche del prodotto. Un'elevata concentrazione di fruttosio favorisce la permanenza in fase liquida, mentre

un alto contenuto di glucosio è responsabile della tendenza alla cristallizzazione. Oltre ai monosaccaridi, sono presenti numerosi disaccaridi e oligosaccaridi, generati dall'azione enzimatica dell'invertasi o derivanti direttamente dal nettare. La composizione di questi zuccheri minori è utile ai fini della caratterizzazione botanica del miele, poiché varia in funzione della specie vegetale di origine. [4]

Il miele è caratterizzato da un'acidità totale, espressa in milliequivalenti per chilogrammo, che varia indicativamente tra 10 e 60, il pH del miele è tipicamente tra 3.2 e 4.5, e contribuisce, insieme all'elevata pressione osmotica, alla stabilità microbiologica del miele. Tale acidità è attribuibile alla presenza di diversi acidi organici, tra cui l'acido gluconico, quantitativamente predominante, prodotto dall'ossidazione del glucosio catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi.

Il contenuto di sostanze minerali è generalmente compreso tra 0,02% e 1%. Il potassio rappresenta l'elemento predominante, seguito da altri macro e microelementi quali sodio, calcio, magnesio, fosforo, ferro, manganese e rame. La composizione minerale è strettamente correlata all'origine geografica e botanica del miele e influenza anche il colore, con mieli chiari generalmente più poveri di minerali rispetto a quelli scuri. [4]

La frazione proteica del miele è quantitativamente limitata (circa 0,2–0,3%) ed è costituita principalmente da amminoacidi liberi, tra cui la prolina, e da enzimi. Gli enzimi, in larga parte di origine animale, svolgono un ruolo fondamentale nella trasformazione del nettare e rappresentano un indicatore di freschezza del prodotto, dato che la loro attività tende a diminuire nel tempo. Tra i principali enzimi si annoverano l'invertasi, la glucosio-ossidasi e la diastasi.

Il contenuto vitaminico del miele è modesto e comprende esclusivamente vitamine idrosolubili, quali la vitamina C e alcune vitamine del gruppo B, presenti in concentrazioni dell'ordine di pochi mg/kg. Tali vitamine derivano principalmente dal polline presente nel miele. [4]

Tra i costituenti minori rivestono particolare importanza le sostanze fenoliche, responsabili in larga misura dell'attività antiossidante e delle caratteristiche organolettiche del miele. Questi composti possono fungere da marker chimici dell'origine botanica. Sono inoltre presenti numerosi composti volatili che contribuiscono all'aroma. La 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF) rappresenta un indicatore di invecchiamento e di esposizione a trattamenti termici, poiché si forma a seguito della degradazione degli zuccheri in ambiente acido. [4] [5]

Eventuali sostanze indesiderate di origine vegetale possono essere presenti solo in tracce e non rappresentano un rischio significativo per la salute.

1.2 Caratteristiche fisiche

Il miele è una sostanza le cui caratteristiche fisiche dipendono dalla sua composizione chimica, la quale può variare da un miele ad un altro. Le principali caratteristiche fisiche che andremo ad approfondire sono: igroscopicità, indice di rifrazione e capacità di cristallizzazione. Per quanto riguarda la conducibilità elettrica possiamo specificare che questa capacità è correlata alla quantità di Sali minerali presenti nella composizione, più è alta questa quantità maggiore sarà la conducibilità elettrica. Infine, valuteremo anche colore, viscosità e conducibilità termica.

L'igroscopicità è la capacità di assorbire o cedere molecole d'acqua presenti nell'ambiente circostante. Questa capacità è tipica del miele per l'elevata presenza di zuccheri, i quali favoriscono questo meccanismo. Il miele idealmente dovrebbe essere conservato in un ambiente che non superi il 60% di umidità per evitare che ci sia una variazione della composizione di partenza, poiché al di sopra di queste condizioni il fruttosio assorbirà molto velocemente le molecole d'acqua presenti nell'ambiente.

L'indice di rifrazione è strettamente correlato alla quantità di acqua presente nella composizione e quindi all'igroscopicità del miele. Nel miele liquido diminuendo la quantità di acqua aumenta l'indice di rifrazione.

Un altro parametro strettamente legato alla quantità di acqua è la densità: questo parametro aumenta al diminuire della quantità d'acqua presente nel composto.

La capacità di cristallizzazione è un parametro molto importante ed è un fenomeno che si realizza a determinate temperature, le quali permettono la precipitazione degli zuccheri presenti nella composizione del miele, solitamente si ritiene che la temperatura ideale per la cristallizzazione sia di 14°C, mentre al di sotto dei 5°C e al di sopra dei 25°C questo fenomeno non avviene. In questo processo si passa da una forma amorfa ad una forma cristallina; nel caso

in cui la formazione di questi cristalli si verifichi in poco tempo la dimensione dei cristalli sarà ridotta, d'altro canto se il passaggio in questa forma avviene lentamente il cristallo avrà dimensioni più elevate. Un parametro importante che bisogna tenere in considerazione è il rapporto tra fruttosio e glucosio: più è alto questo rapporto maggiore è il tempo che impiegherà il miele a cristallizzare, al contrario se questo rapporto è basso e quindi si ha un contenuto molto elevato di glucosio rispetto al fruttosio si avrà maggiore propensione alla cristallizzazione.

Il colore del miele può variare naturalmente da un giallo molto chiaro ad un arancione molto scuro, fino ad arrivare ad un nero intenso. I componenti che possono influire maggiormente sulla colorazione sono i Sali minerali e alcuni pigmenti vegetali, inoltre è importante sottolineare che anche l'origine botanica e la conservazione del prodotto hanno un ruolo fondamentale.

La viscosità di una sostanza è la misura della resistenza di un fluido allo scorrimento, causata dall'attrito. Nel caso specifico del miele la viscosità è molto alta per cui scorrerà molto lentamente. La temperatura spesso influisce su questo parametro: se aumenta la temperatura, la viscosità diminuirà.

Per quanto riguarda la conducibilità termica il miele è noto per essere un materiale che presenta una bassa conducibilità termica, per questo motivo bisogna prestare attenzione poiché è probabile che fornendo calore gli strati più esterni arrivino a temperature elevate, mentre quelli più interni rimangano freddi. [6]

1.3 Proprietà terapeutiche e nutrizionali

Il miele è una sostanza ricca di proprietà terapeutiche e nutrizionali.

Possiede un'attività antinfiammatoria dovuta alla presenza di flavonoidi che agiscono inibendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie e riducendo le attività delle COX-1 e COX-2. Il miele agisce anche come lenitivo e per questo motivo viene specialmente utilizzato così com'è o inserito all'interno di formulazioni utili nei casi di irritazione della gola e tosse, quali sciroppi o soprattutto caramelle.

Il miele manifesta anche un'azione antibatterica e antiossidante grazie alla presenza di perossido di idrogeno, flavonoidi e polifenoli. Può contribuire alla prevenzione sia dall'invecchiamento cellulare sia da malattie cardiovascolari, neurologiche e infiammatorie. [7]

Inoltre, è in grado di agire positivamente sulla flora batterica come prebiotico grazie alla presenza di oligosaccaridi, per cui può essere un valido alleato per ritrovare l'equilibrio del microbiota. Può essere utile anche per trattare il reflusso gastroesofageo, andando a lenire le mucose irritate dai succhi gastrici. [8] [9]

Il sistema immunitario è un altro target delle proprietà benefiche del miele; infatti, questo aiuta a rafforzare le difese immunitarie e quindi ad accelerare la guarigione di tosse, raffreddore e mal di gola.

Esistono numerose tipologie di miele e alcune sono più indicate per specifici bisogni:

il miele di tiglio è spesso consigliato in casi di stress e per conciliare il sonno, solitamente si consiglia un cucchiaino prima di andare a dormire.

Il miele di acacia è più indicato come dolcificante naturale, perché ha le caratteristiche ottimali che gli consentono di rimanere in forma liquida più a lungo rispetto ad altre tipologie.

I mieli di eucalipto o timo vengono solitamente utilizzati in caso di irritazione delle vie respiratorie, grazie alle proprietà decongestionanti ed espettoranti.

Infine, il miele di castagno possiede una spiccata attività antiossidante e si sostiene possa avere un'attività positiva sulla circolazione sanguigna. [9]

Logicamente il consumo di miele non può essere eccessivo poiché ha un'elevata densità energetica. Un consumo moderato è generalmente raccomandato (circa 20 g/giorno, ossia 2 cucchiaini colmi). [10]

Non bisogna sottovalutare anche l'utilizzo esterno nella cosmetica, il miele viene inserito nei prodotti cosmetici con lo scopo di idratare e purificare. Nei prodotti per capelli spesso viene impiegato per renderli brillanti e lucenti grazie alla sua capacità di assorbire l'umidità. Il miele è inserito anche in diverse creme idratanti e possedendo un'azione antibatterica viene anche consigliato nei casi di acne.[9]

1.4 Applicazioni nella medicina

Alla luce delle molteplici proprietà e dei benefici documentati in letteratura, il miele ha trovato applicazione anche in ambito medico, fin dall'antichità, in diversi contesti che saranno oggetto di analisi nel presente sottocapitolo. Il miele che viene utilizzato a scopo terapeutico in ambito sanitario si ottiene sottoponendolo a raggi gamma in modo che avvenga la sterilizzazione e bisogna assicurarsi che abbia un'azione antibatterica standard. [14]

Uno dei primi contesti clinici che prenderemo in esame è l'impiego del miele come strategia nella prevenzione della mucosite nel paziente sottoposto a radioterapia. La mucosite è uno stato patologico caratterizzato da un danno, non associato alla chirurgia, delle barriere mucose che porta a irritazione, eritemi fino ad arrivare a ulcerazioni del cavo orale o delle vie respiratorie. È molto importante sottolineare che purtroppo questo tipo di complicanza risulta molto frequente e limitante nei pazienti che si sottopongono a radio-chemioterapia. Per questi motivi si sono condotti trial clinici in cui si è cercato di utilizzare il miele come prevenzione per questa condizione sfruttando le sue attività antinfiammatorie e antibiotiche. Questi studi hanno portato a risultati soddisfacenti ovviamente associando l'impiego del miele ad una adeguata educazione alimentare e igienica.[11]

Un altro caso interessante è quello che riguarda l'utilizzo del miele per curare ustioni della pelle, si è notata una diminuzione del tempo medio di guarigione rispetto ad un trattamento con Sulfadiazina d'argento e una diminuzione di cicatrici ipertrofiche. Questo studio ha evidenziato un duplice vantaggio nell'impiego del miele rispetto al trattamento antibiotico, in quanto risulta essere un'opzione più economica e, al contempo, consente di non aggravare la già rilevante problematica dell'antibiotico-resistenza evitando il ricorso agli antibiotici.[12]

A questo proposito si è utilizzato il miele medico anche per la guarigione di lesioni croniche, le quali rappresentano un reale problema soprattutto per complicanze infettive. Si è potuto

osservare dopo dieci giorni di trattamento la transizione della lesione dalla fase infiammatoria a quella proliferativa. Al centocinquesimo giorno dall'avvio della terapia, la ferita appariva completamente risolta, con cicatrizzazione consolidata e senza evidenza di recidive. Nel complesso, l'impiego di miele medicale, in associazione con medicazioni avanzate, si è rivelato efficace nella gestione di una lesione infetta. Il caso clinico evidenzia come un approccio integrato, fondato su adeguata detersione, antisepsi e trattamento topico con dispositivi avanzati, soprattutto in presenza di colonizzazione batterica o di processi infiammatori non responsivi alla terapia antibiotica sistemica, possa costituire un'opzione terapeutica alternativa nella pratica clinica. [13]

Una patologia sempre più diffusa nella popolazione anziana sono le ulcere venose degli arti inferiori, uno studio ha voluto approfondire l'utilità del miele per migliorarne la guarigione nelle persone che ne soffrono. L'ulcera viene descritta come una lesione profonda della cute dovuta all'infiammazione e necrotizzazione del tessuto, questa condizione causa molto dolore, disabilità e isolamento sociale. Per queste ragioni possono impattare notevolmente in modo negativo la vita di tutti i giorni, creando nelle persone un certo disagio e un possibile stato depressivo. Gli anziani sono la classe più colpita poiché le cause che provocano queste lesioni si riscontrano maggiormente in questa fascia di età. Nel 75% dei casi sono dovute ad un'insufficienza venosa cronica, il 20% delle ulcere periferiche è dovuto ad un'insufficienza arteriosa e il 5% da una rilevante ustione. L'applicazione del miele sulle ferite, si è dimostrata molto facile da eseguire, sia dai pazienti stessi sia da un parente senza specifiche competenze. [14]

1.5 Miele adulterato

Il miele adulterato è una problematica da non sottovalutare, poiché come sappiamo il miele è riconosciuto come una sostanza che può portare molteplici benefici al corpo, ma se venisse adulterato potrebbe agire in modo opposto. Quindi è molto importante al giorno d'oggi riuscire a evitare che venga messo in commercio un prodotto non genuino, grazie a maggiori controlli nel mercato.

Si è cercato di capire quali fossero degli indicatori validi per riconoscere un miele adulterato da uno naturale e da alcuni studi si è riuscito a estrapolare ciò che può aiutare questa distinzione.

I primi parametri che vengono presi in considerazione sono: la quantità totale di composti fenolici e antiossidanti. Nel miele adulterato il contenuto di antiossidanti è maggiore, mentre il contenuto di composti fenolici risulta essere inferiore rispetto a un miele genuino.

Un composto che è risultato abbastanza affidabile per verificare l'autenticità del miele è l'amminoacido prolina. Questo perché si è notato un quantitativo medio nettamente differente: nel miele naturale si aggira intorno ai $202.2 \pm 26.1 \text{ mg/kg}$, mentre in quello adulterato è di $71.1 \pm 21.6 \text{ mg/kg}$.

Gli ultimi parametri interessanti sono alcuni minerali come il potassio, il calcio, il magnesio e il fosforo, questi sono presenti in quantità inferiori in un miele adulterato.

L'adulterazione è un processo che prevede la modifica della qualità intrinseca del prodotto e può essere effettuata in due diversi modi: indirettamente o direttamente.

Quando parliamo di adulterazione indiretta del miele ci riferiamo alla modificazione dell'alimentazione delle api che prevede la somministrazione di sciroppi zuccherini, anche detti mangimi per api, in modo da aumentare la produzione di miele.

D'altro canto, quando parliamo di adulterazione diretta il processo prevede l'aggiunta di alcune sostanze direttamente al miele prodotto, come per esempio acqua, zuccheri, sciroppi zuccherini o altri mieli di qualità inferiore utili ad aumentarne la gradevolezza.

I composti maggiormente utilizzati in questi processi di adulterazione sono: lo zucchero di canna, sciroppo di mais, zucchero di palma, zucchero invertito, sciroppo di riso e sciroppo di inulina.[15]

Quando invece si introduce un maggior quantitativo di acqua il rischio è quello che possa aumentare la probabilità e la velocità di proliferazione batterica all'interno del miele; quindi, si mette a rischio la salute del consumatore, il quale purtroppo non possiede gli strumenti per distinguere un miele adulterato da uno genuino.

2. Fluorescenza e spettrofluorimetria: strumentazione, effetti ottici e trattamento multivariato dei dati

La tecnica di spettroscopia di fluorescenza è considerata una delle più emergenti, utilizzata in molteplici campi della chimica, tra cui la chimica analitica. In questo capitolo andremo ad approfondire quelle che sono le fondamenta su cui si basa questa procedura e lo strumento utilizzato. Inoltre, citeremo i metodi statistici multivariati e visioneremo quelli che sono gli errori indesiderati.

2.1 Fluorescenza

La fluorescenza è un fenomeno che si riesce ad apprezzare quando una sostanza ha la capacità di assorbire radiazione elettromagnetica e riemetterla a lunghezza d'onda maggiore.

In questo processo le molecole che compongono la sostanza vengono eccitate tramite una radiazione incidente che determina la promozione di un elettrone a uno stato energetico più esterno e quindi con un'energia maggiore. Quando l'elettrone eccitato torna spontaneamente allo stato fondamentale, fenomeno che si verifica generalmente dopo pochi nanosecondi, avviene l'emissione di una radiazione di lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella incidente. Questa radiazione che viene emessa è proprio quella che viene rilevata e che caratterizza la sostanza per la sua fluorescenza.

La spettroscopia di fluorescenza consente di eseguire un'analisi non solo quantitativa, attraverso la misura dell'intensità dell'emissione, ma anche qualitativa, proprio perché le diverse molecole emettono lunghezze d'onda differenti.

Quando si utilizza questa tecnica è importante assicurarsi che la sostanza in esame sia a temperatura ambiente e non sia calda, altrimenti le molecole disperderebbero energia in calore e la fluorescenza potrebbe ridursi. Inoltre, è consigliato analizzare molecole con meno forme di

risonanza possibili, quindi nel loro stato più rigido possibile, in questo modo viene esaltata la fluorescenza.

Nella spettroscopia di fluorescenza si sfrutta questa proprietà delle sostanze per andare a rilevare e quantificare, in modo particolarmente sensibile, concentrazioni anche irrisorie di analita. Tutto ciò può essere realizzato a costi relativamente contenuti e utilizzando strumentazioni semplici.

Questa tecnica offre una sensibilità elevata anche per il fatto che solo particolari molecole possiedono questa capacità di fluorescenza naturalmente; d'altro canto, molecole che non possiedono questa proprietà intrinseca possono essere rese fluorescenti mediante derivatizzazione con reagenti fluorescenti.

I fluorofori sono molecole che presentano nella maggior parte dei casi anelli aromatici o più in generale strutture coniugate, le quali consentono agli elettroni π -greco di delocalizzarsi e ciò rende maggiormente realizzabile l'assorbimento dell'energia luminosa, consentendo anche la stabilizzazione degli stati eccitati. Possono essere di due tipi o fluorofori sintetici come la rodamina, la fluoresceina, la cianina e alcuni derivanti da borondifluoridi; oppure possiamo avere molecole naturali quali: triptofano, tirosina e fenilalanina. Queste molecole, chiamate anche cromofori fluorescenti, possono essere impiegate come traccianti, marcatori o sensori per numerose applicazioni in campo medico, biochimico e ambientale; devono però essere tenuti in considerazione alcuni fattori: stabilità fotonica, la compatibilità biologica o chimica con l'ambiente circostante, la lunghezza d'onda di eccitazione/emissione e l'efficienza quantica ossia il rapporto tra i fotoni emessi e quelli assorbiti.

Ad oggi è anche possibile creare sonde fluorescenti sensibili alla temperatura, alla presenza di specifiche molecole, alla presenza di ioni metallici o a variazioni di pH; per realizzarle si utilizzano fluorofori detti "intelligenti".

Una volta che l'analisi è terminata si ottengono gli spettri di fluorescenza, i quali contengono informazioni molto difficili da interpretare visivamente poiché sono dati complessi e multidimensionali. Per questo motivo ci si avvale dell'analisi multivariata la quale impiega tecniche statistiche avanzate per l'elaborazione di dati.

2.2 Spettrofluorimetro

Lo strumento essenziale per registrare lo spettro di emissione fluorescente di una sostanza è lo spettrofluorimetro. Questo dispositivo consta di diverse parti come mostrato in figura 2.2.1: una sorgente di luce (S), un primo monocromatore di eccitazione (M1), uno spazio apposito dove inserire il campione che dovrà essere sottoposto all'analisi (C), un monocromatore di emissione (M2) e un rivelatore (R).

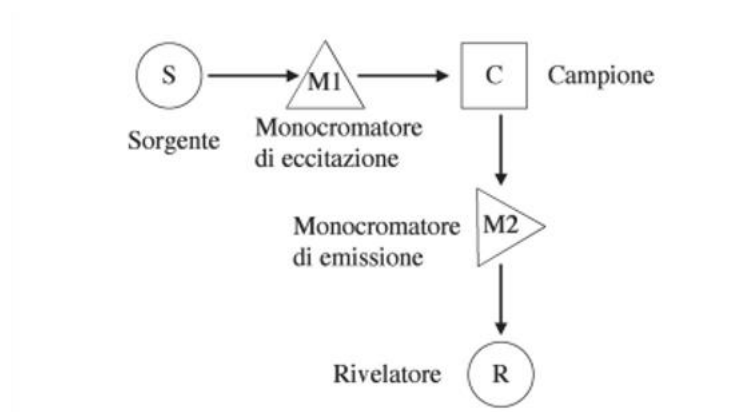


Figura 2.2.1 schema a blocchi di uno spettrofluorimetro [16]

Nell'analisi dei campioni con la fluorescenza possiamo decidere di lavorare in due modi: uno viene chiamato “right angle” e l'altro “front face”.

La differenza basilare tra queste due modalità è l'angolo di incidenza della luce sul campione. Se utilizziamo l'impostazione “right angle” l'accessorio che si monta consente una misurazione con un angolo di 90° e solitamente questo metodo si predilige quando il campione è una soluzione preferibilmente poco torbida.

Nel caso in cui il campione sia un solido o una soluzione molto torbida e densa, si predilige l'utilizzo “front face” il quale consente di cambiare l'angolatura e solitamente si utilizza un angolo di 45° , perché permette di catturare la luce emessa più efficacemente, poiché l'analisi di questo tipo di campione risulta più complicata.

La sorgente di luce è il primo elemento chiave per la realizzazione del fenomeno, questa può essere una lampada a xeno o alogena e può; emettere uno spettro luminoso nell'ultravioletto che irradia il campione consentendone l'eccitazione, può avere un fascio continuo o pulsato. Logicamente la potenza della radiazione che colpisce il campione è proporzionale alla potenza della fluorescenza che si andrà a creare.

Il primo monocromatore (M1) ha il ruolo di selezionare la lunghezza d'onda o il range di eccitazione che è stato stabilito specificatamente per la tipologia di campione che si sta analizzando. Una volta che il campione è stato eccitato si andrà a verificare il fenomeno della fluorescenza ed emetterà una specifica lunghezza d'onda che verrà selezionata dal secondo monocromatore (M2).

Infine, abbiamo il rivelatore, il quale va ad amplificare la radiazione di fluorescenza grazie a un fotomoltiplicatore.

Il fotomoltiplicatore è un dispositivo estremamente sensibile, in grado di rilevare anche singoli fotoni. Esso è costituito da un tubo a vuoto contenente un fotocatodo rivestito con materiale fotosensibile, il quale emette elettroni quando viene colpito dalla radiazione entrante.

Il processo di moltiplicazione elettronica avviene mediante l'applicazione di un campo elettrico ed è articolato in una serie di stadi successivi, generalmente dell'ordine di una decina, che consentono un'amplificazione significativa del segnale.

La sensibilità dei fotomoltiplicatori, che rappresentano componenti fondamentali negli strumenti di spettrofluorimetria, dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione entrante. Ne consegue che la risposta del dispositivo non è uniforme sull'intero intervallo spettrale.

Per questo motivo, i produttori realizzano fotomoltiplicatori caratterizzati da differenti curve di risposta, ciascuna ottimizzata per specifici intervalli di lunghezze d'onda, così da permettere la selezione del dispositivo più idoneo in funzione delle esigenze dell'indagine spettroscopica.

La marcata dipendenza della sensibilità dalla lunghezza d'onda, unitamente, seppur in misura minore, alla non perfetta linearità del monocromatore di emissione, costituisce la principale causa per cui gli spettri di emissione ottenuti sperimentalmente non risultano del tutto corretti.

Di conseguenza, qualora si renda necessario confrontarli con spettri acquisiti in condizioni sperimentali differenti, è opportuno applicare specifici fattori di correzione strumentale.

2.3 Spettri di emissione ed eccitazione

Per ottenere uno spettro di emissione devo assicurarmi di irradiare il campione con un fascio di luce che abbia una lunghezza d'onda o un range di eccitazione corrispondente a una regione dello spettro in cui l'analita in questione assorbe. Inoltre, devo assicurarmi che il monocromatore di emissione sia configurato con un range di lunghezze d'onda in cui è possibile registrare l'intensità della luce emessa. Tracciando l'intensità dei fotoni emessi in funzione della lunghezza d'onda si produce uno spettro di emissione.

Tutto questo procedimento dovrebbe dipendere solo dal campione, dalla lampada utilizzata e da quanta luce facciamo passare, quindi dall'apertura delle fenditure.

In realtà una volta ottenuto lo spettro di emissione grazie all'intervento finale del fotomoltiplicatore, si devono tenere in considerazione vari limiti: alcuni già citati nel paragrafo precedente tra cui la sensibilità differente tra un fotomoltiplicatore ed un altro; altri invece come la corrente di buio, ossia una sorta di rumore di fondo dovuto alla registrazione di un segnale anche quando in realtà non arriva luce.

Questi limiti possono portare alla realizzazione di uno spettro falsato con picchi di massimo di emissione spostati o di forma diversa. Per evitare ciò solitamente si utilizzano metodi di calibrazione.

2.4 Matrici di emissione-eccitazione (EEMs)

In una matrice EEM vengono riportate quelle che sono le intensità di fluorescenza di un campione in funzione delle lunghezze d'onda di emissione ed eccitazione, in sintesi risulta essere un insieme di dati tridimensionale. Quindi indiscutibilmente riesce ad essere una valida rappresentazione per tutti i dati raccolti in uno studio di campioni che contengono numerosi elementi fluorescenti.

Logicamente per facilitare l'interpretazione di questi grafici è richiesta un'elaborazione in cui si utilizzano solitamente metodi statistici multivariati.

Tra i metodi chemiometrici maggiormente utilizzati troviamo PARAFAC, che scompone i dati in matrici più semplici e riesce così a sfruttare tutte e tre le dimensioni, e la PCA ossia l'analisi delle componenti principali che lavora su due dimensioni; pertanto, l'array tridimensionale deve prima essere 'srotolato' (unfolding).

Ogni fluoroforo è identificativo per la sua fluorescenza, come se fosse "un'impronta digitale", infatti a seconda della posizione del picco riusciamo a individuare una specifica molecola e a seconda dell'intensità del picco riusciamo a sapere anche la quantità di quella molecola all'interno del campione.

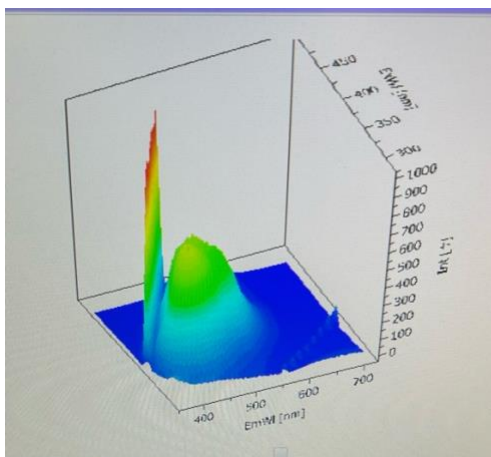


Figura 2.4.1 rappresentazione tridimensionale di una matrice EEM

2.5 Bande indesiderate negli spettri: errori da evitare

Quando si fa un'analisi in cui si ottengono le matrici EEM bisogna tenere in considerazione che la difficoltà primaria sarà quella di definire a priori parametri spettroscopici ottimali tali da prevenire la comparsa di bande spurie, ovvero segnali che non riflettono la reale luminescenza del campione analizzato. Tale problematica è riconducibile a diversi fenomeni, tra cui l'effetto Rayleigh, l'effetto Raman e l'effetto "inner filter".

L'effetto Rayleigh è dovuto a una diffusione della luce incidente in direzioni differenti. Le cause solitamente sono due, o la presenza di molecole in soluzione oppure un'interfaccia che si può creare tra le pareti della cella e la soluzione o fra le pareti e l'aria. Il problema di questo fenomeno è che si registra una banda nello spettro che però non fornisce alcuna informazione utile nell'analisi del campione per cui si preferisce eliminare questo segnale.

Come possiamo apprezzare nelle figure 2.5.1 e 2.5.2, l'effetto Rayleigh è facilmente identificabile, poiché risulta essere una banda diagonale che è visibile quando le due lunghezze d'onda, quella di eccitazione e quella di emissione coincidono (Rayleigh di primo ordine); a volte può comparire nello spettro anche a lunghezze d'onda di emissione che sono circa il doppio rispetto a quelle di eccitazione (Rayleigh di secondo ordine).

Una situazione che si può verificare è che questo segnale errato si registri in un'area dello spettro in cui abbiamo il segnale reale; in questo caso è opportuno modificare le condizioni sperimentali. Questo scattering di Rayleigh risulta particolarmente evidente quando il campione che stiamo analizzando ha una bassa concentrazione o un basso rendimento quantico.

Per ridurre l'effetto negativo di questo fenomeno sull'analisi si possono rimuovere le regioni della matrice interessate da questo scattering, oppure rimuovere direttamente dalla matrice quelli che sono i valori relativi alla zona in cui si registrano questi segnali. Logicamente questi

accorgimenti si possono attuare solo se non si eliminano informazioni significative del campione in analisi.

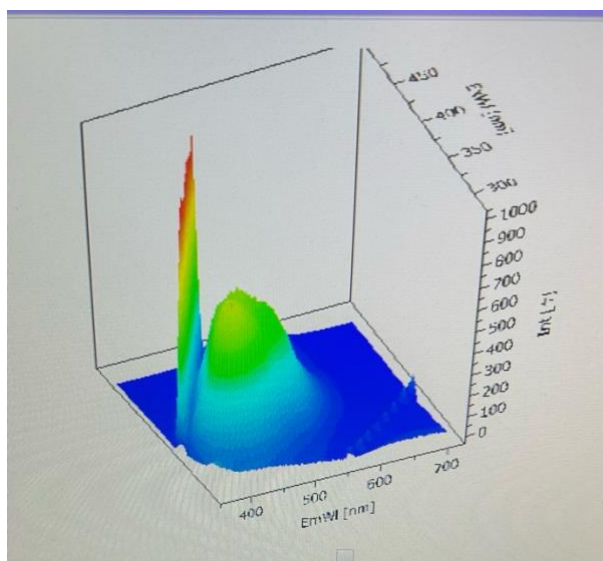


Figura 2.5.1 rappresentazione dell'effetto Rayleigh

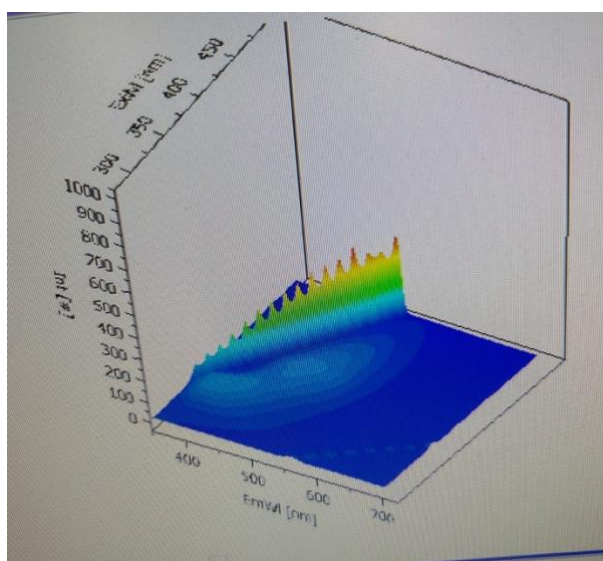


Figura 2.5.2 rappresentazione dell'effetto Rayleigh

L'effetto Raman è un tipico errore che si registra quando si discioglie il campione in un solvente, poiché viene generato dall'interazione tra la luce che si usa per irradiare il campione e le molecole del solvente.

In questa interazione, una piccola frazione dell'energia della luce viene trasferita ai moti vibrazionali delle molecole del solvente. Di conseguenza, la radiazione diffusa (ossia quella che viene “riemessa” dal sistema) presenta una lunghezza d'onda diversa rispetto a quella della radiazione incidente.

Per ciascun solvente, la differenza di energia tra la luce incidente e quella diffusa rimane costante, anche se può variare la lunghezza d'onda assoluta. Questo implica che la posizione della banda Raman dipende dalla lunghezza d'onda di eccitazione utilizzata: cambiando quest'ultima, la banda si sposta. Al contrario, nel caso della vera emissione, la posizione della banda resta invariata.

Pertanto, quando in uno spettro compare una banda energeticamente vicina alla lunghezza d'onda di eccitazione, è necessario verificare se si tratti di una banda Raman. Questa verifica può essere effettuata in due modi: registrando lo spettro del solo solvente, per controllare se la banda è presente anche in assenza del campione; oppure variando la lunghezza d'onda di eccitazione e osservando se la posizione della banda cambia, confermando così la sua natura Raman.

Infine, si deve considerare anche un altro problema, quello che viene definito “*Inner filter effect*”. Questo fenomeno è frequentemente presente in soluzione ad alta concentrazione; poiché il fascio di eccitazione viene parzialmente assorbito dal campione e solo la parte di soluzione più vicina alla sorgente luminosa è quella che emette fluorescenza. Al contrario, la zona più interna emetterà una fluorescenza più debole, perciò, si registrerà un segnale basso. Per evitare questa tipologia di problematica si consiglia di diluire il campione.

3. Tecniche chemiometriche

La chemiometria è una scienza della chimica che studia l'applicazione di metodi matematici e statistici ai dati chimici e nacque circa alla fine degli anni 90. I padri fondatori sarebbero stati Svante Wold e Bruce Kowalski, i quali nel 1972 hanno coniato la parola “chemometrics”.

Negli ultimi decenni, lo sviluppo di strumenti analitici sempre più avanzati ha portato a un aumento significativo sia della quantità sia della complessità dei dati prodotti nei laboratori di ricerca. In questo scenario, la chemiometria si è affermata come uno strumento indispensabile per organizzare, interpretare e rappresentare in modo efficace le informazioni sperimentali.

Grazie al suo carattere multidisciplinare, essa consente di mettere in evidenza relazioni non immediatamente visibili, semplificare dataset complessi riducendone la dimensionalità e costruire modelli predittivi affidabili. In questo modo, la chemiometria fornisce un supporto fondamentale nei processi decisionali, sia nell'ambito delle analisi chimiche sia nelle attività di controllo qualità.

La chemiometria interviene in più fasi del processo analitico, interviene nel campionamento per scegliere i campioni più adatti da analizzare, interviene nella fase di ottimizzazione della metodologia analitica (experimental design), così da ottimizzare la procedura analitica per fare il numero minore e significativo di esperimenti analitici.

Gli obiettivi principali di questa disciplina sono: estrarre la massima informazione utile disponibile dai dati che si hanno a disposizione spesso descritti da molte variabili e poi fornirne una rappresentazione grafica per agevolare la comprensione del risultato di questa analisi.

3.1 Analisi delle componenti principali

Nel contesto dell'analisi multivariata, la rappresentazione grafica dei dati costituisce uno strumento fondamentale per l'interpretazione delle informazioni. Tuttavia, all'aumentare del numero di variabili, come frequentemente avviene in ambito chimico-analitico, la visualizzazione diretta dei dati diventa complessa. In questo scenario trova applicazione l'Analisi delle Componenti Principali (Principal Component Analysis, PCA), una delle tecniche esplorative più rilevanti della chemiometria.

La PCA ha come obiettivo principale l'esplorazione dei dati e la riduzione della dimensionalità, consentendo di rappresentare sistemi complessi in uno spazio a dimensionalità ridotta senza perdere informazione significativa. Tale approccio si basa sull'ipotesi che la varianza contenga informazione rilevante sulla struttura dei dati, analizzare la dispersione dei campioni equivale quindi a comprendere la struttura informativa del sistema.

I dati vengono generalmente organizzati in una matrice, in cui le righe rappresentano i campioni e le colonne le variabili misurate. Affinché la PCA sia efficace, è fondamentale che il dataset presenti una certa variabilità: in assenza di questa variabilità tra i campioni, non è possibile estrarre struttura informativa. Non è tanto il numero di campioni a essere determinante, quanto piuttosto la variabilità e la rappresentatività del campionamento.

Dal punto di vista statistico, la variabilità dei dati può essere descritta attraverso la varianza e la covarianza. La varianza misura la dispersione dei singoli campioni rispetto alla media, mentre la covarianza, parametro bivariato, descrive il grado di variazione congiunta tra coppie di variabili. Il coefficiente di correlazione, derivato dalla covarianza, fornisce una misura normalizzata compresa tra -1 e 1; tuttavia, l'utilizzo di varianza e covarianza consente di mantenere un legame diretto con le unità di misura originali, aspetto particolarmente rilevante in ambito chimico.

Queste informazioni sono raccolte nella matrice di varianza-covarianza, una matrice quadrata e simmetrica, in cui le varianze sono disposte lungo la diagonale principale e le covarianze nelle restanti posizioni. Tale matrice rappresenta il punto di partenza per l'applicazione della PCA.

La PCA può essere interpretata come una rotazione dello spazio delle variabili originarie, finalizzata a individuare nuove variabili latenti, dette componenti principali. Queste non sono direttamente misurate, ma derivano da combinazioni lineari delle variabili originali e rappresentano strutture sottostanti ai dati. Le componenti principali presentano tre caratteristiche fondamentali: sono ortogonali tra loro (e quindi non correlate), sono combinazioni lineari delle variabili originali e sono ordinate in modo tale da spiegare una quantità decrescente di varianza.

La prima componente principale (PC1) è costruita in modo da catturare la massima varianza possibile; la seconda (PC2), ortogonale alla prima, descrive la massima quota di varianza residua, e così via. Questo ordinamento consente una compressione dell'informazione: spesso poche componenti sono sufficienti a descrivere gran parte della variabilità del sistema.

Il numero massimo di componenti principali è pari al rango della matrice dei dati, che dipende dal numero di campioni e variabili. Tuttavia, nella pratica, si calcola un numero limitato di componenti (tipicamente una decina) e si selezionano solo quelle realmente informative.

L'applicazione della PCA porta alla definizione di due matrici principali: la matrice degli score e la matrice dei loadings. Gli score rappresentano le coordinate dei campioni nel nuovo spazio delle componenti principali, mentre i loadings descrivono il contributo delle variabili originali alla costruzione delle componenti. In termini geometrici, i loadings corrispondono al coseno dell'angolo tra variabili e componenti: valori elevati in valore assoluto indicano un forte contributo, mentre il segno indica il tipo di correlazione (diretta o inversa).

L'interpretazione dei risultati si basa sull'analisi congiunta di score e loadings. In particolare, il biplot consente di rappresentare simultaneamente campioni e variabili in un unico grafico, facilitando la comprensione delle relazioni tra essi.

Un ulteriore strumento utile è lo scree plot, che riporta la varianza spiegata in funzione del numero di componenti principali. L'analisi della curva consente di individuare il punto in cui si verifica un cambiamento significativo di pendenza (elbow), indicando il numero ottimale di componenti da considerare. Le componenti precedenti a tale punto sono generalmente quelle che contengono l'informazione più rilevante.

In conclusione, la PCA rappresenta uno strumento fondamentale per l'esplorazione dei dati multivariati, permettendo non solo di ridurre la dimensionalità del sistema, ma anche di individuare le variabili responsabili delle principali strutture osservate, fornendo così una chiave interpretativa dei fenomeni sottostanti.

3.2 Pretrattamenti

I pretrattamenti dei dati rappresentano il primo step dell'analisi e, sebbene possano apparire semplici, devono essere eseguiti in modo accurato per garantire l'affidabilità dei risultati. Essi si distinguono in pretrattamenti applicati per riga e per colonna della matrice dei dati.

I pretrattamenti per riga, ovvero per ciascun campione, sono impiegati quando il segnale analitico presenta fenomeni di deriva o rumori indesiderati. In questi casi, l'obiettivo è quello di eliminare oscillazioni non significative che potrebbero compromettere l'interpretazione dei dati. La trasformazione SNV (Standard Normal Variate) rappresenta un pretrattamento applicato per riga, particolarmente utile per correggere le alterazioni del segnale dovute allo slittamento della linea di base e ai fenomeni di scattering.

Tale procedura consiste in una normalizzazione degli spettri: per ciascun campione, a ogni valore di assorbanza viene sottratta la media della riga e il risultato viene successivamente diviso per la deviazione standard della stessa riga. In questo modo si riducono le variazioni non informative legate a effetti fisici indesiderati, migliorando la comparabilità tra i campioni e l'interpretabilità dei dati.

I pretrattamenti per colonna, invece, vengono applicati a ciascuna variabile e risultano generalmente indispensabili. Essi si suddividono principalmente in centraggio e autoscaling.

Il centraggio consiste nel sottrarre, a ciascun valore, la media della corrispondente variabile. Applicato all'intera matrice dei dati, questo procedimento equivale a traslare l'origine degli assi nel baricentro della distribuzione dei dati, facilitando così l'analisi delle relazioni tra variabili.

L'autoscaling include il centraggio ma aggiunge un ulteriore passaggio: ogni valore viene diviso per la deviazione standard della variabile. Mentre il centraggio dovrebbe essere sempre effettuato, l'autoscaling è particolarmente utile quando le variabili presentano diversa natura o

scala di misura. In tali situazioni, esso consente di attribuire uguale importanza a tutte le variabili, evitando che quelle con valori numericamente più elevati dominino l'analisi. [17]

4. Parte sperimentale

La prima fase della sperimentazione ha previsto una approfondita analisi della letteratura scientifica disponibile, finalizzata all'individuazione delle condizioni operative più idonee per l'analisi dei campioni di miele mediante spettroscopia di fluorescenza.

Inizialmente sono stati esaminati diversi studi riguardanti l'applicazione della fluorescenza su campioni di miele, al fine di comprendere le metodologie impiegate e identificare i parametri sperimentali più appropriati.

Innanzitutto, abbiamo notato che la maggior parte dei lavori effettuati su questo tipo di matrice erano stati svolti utilizzando la modalità di acquisizione front-face, per cui ci siamo concentrati su questi articoli specifici per capire i vari parametri impostati.

Successivamente la nostra attenzione si è focalizzata su un articolo in particolare in cui veniva utilizzato il nostro stesso strumento [18]; questo ha consentito di ricavare informazioni utili per l'impostazione iniziale del metodo analitico e il settaggio dello strumento.

Sono quindi state effettuate prove preliminari utilizzando due campioni di miele commerciali, rispettivamente di acacia e di castagno, non inclusi tra quelli destinati all'analisi finale. Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati definiti un intervallo di emissione compreso tra 350 e 700 nm e un intervallo di eccitazione compreso tra 280 e 500 nm. Inoltre, sono state impostate le fessure (slit) sia di eccitazione che emissione a 10 nm, è stato applicato un filtro con trasmittanza dell'1% (1%T) ed è stato selezionato un valore di gain medio.

Tali condizioni sperimentali si sono dimostrate ottimali per avere un segnale completo e abbastanza intenso da poter consentire un'elaborazione dei dati affidabile.

4.1 Campionamento

Il materiale oggetto di analisi comprendeva una quantità nota di mieli che differivano tra loro sia per origine botanica che per origine geografica.

Complessivamente, sono stati forniti dall'Università di Modena e Reggio Emilia 148 campioni di miele. Di questi, 89 erano di origine italiana e 41 di provenienza estera. Inoltre, erano presenti alcuni campioni classificati come “non regolari” e altri identificati come “sciroppi”, inclusi nello studio per ampliare il confronto tra diverse tipologie di prodotti.

Per quanto riguarda la provenienza, oltre che dall'Italia, i mieli stranieri provenivano in maggioranza dalla Cina, Spagna, Ungheria, Turchia.



Figura 4.1.1 Campioni

Nell'ambito del presente lavoro di tesi sono stati analizzati complessivamente, 54 campioni, in duplicato, elencati nella tabella sottostante [Tab.1].

Origine geografica	Origine Botanica	Numero del campione
Italiano	Acacia	3I
Italiano	Acacia	5I
Italiano	Acacia	10I
Italiano	Acacia	NR1
Italiano	Acacia	NR13
Italiano	Acacia	33I
Italiano	Acacia	60I
Italiano	Agrumi	NR5
Italiano	Agrumi	55I
Italiano	Agrumi	13I
Italiano	Castagno	16I
Italiano	Castagno	45I
Italiano	Castagno	23I
Italiano	Castagno	46I
Italiano	Castagno	47I
Italiano	Castagno	6I
Italiano	Castagno	6C
Italiano	Castagno	25I
Italiano	Castagno	3C
Italiano	Castagno	7C
Italiano	Castagno	29I

Italiano	Castagno	15C
Italiano	Castagno	39I
Italiano	Castagno	24C
Italiano	Castagno	22I
Italiano	Castagno	61I
Italiano	Castagno	20C
Italiano	Castagno	53I
Italiano	Castagno + Tiglio	41I
Italiano	Eucalipto	1I
Italiano	Melata	27I
Italiano	Millefiori	40I
Italiano	Millefiori	59I
Italiano	Sciroppo	SZ2
Italiano	Tiglio	36I
Italiano	Tiglio	24I
Straniero	Acacia	25S
Straniero	Acacia	1S
Straniero	Acacia	29S
Straniero	Acacia	22S
Straniero	Acacia	11S
Straniero	Acacia	39S
Straniero	Agrumi	6S
Straniero	Lavanda	14S
Straniero	Millefiori	35S

Straniero	Millefiori	37S
Straniero	Millefiori	10S
Straniero	Millefiori	28S
Straniero	Millefiori	NR2
Straniero	Millefiori	23S
Straniero	Millefiori	15S
Straniero	Millefiori	16S
Straniero	Timo Bianco	5S
Straniero + italiano	Acacia	MIX1

Tabella 1: elenco campioni analizzati, nella terza colonna la lettera I indica i campioni italiani, la lettera S quelli stranieri, la lettera C quelli italiani partecipanti a un concorso, la sigla NR indica i mieli “non regolari” e la sigla SZ indica “sciropo zuccherino”.

4.2 Procedura sperimentale

Alcuni dei campioni ricevuti presentavano fenomeni di cristallizzazione; si è pertanto reso necessario valutare una fase preliminare di pretrattamento finalizzata alla dissoluzione dei cristalli di zucchero. Una parte della sperimentazione è stata quindi dedicata allo studio del possibile effetto del trattamento in bagno a ultrasuoni sulle caratteristiche dei campioni di miele. In particolare, è stato necessario verificare che tale trattamento non determinasse modifiche nella composizione del miele, così da garantire l'affidabilità e la solidità dei risultati ottenuti nelle successive fasi sperimentali.

A tale scopo sono stati analizzati due mieli commerciali di diversa origine botanica (Millefiori e Castagno). Per ciascun campione sono state effettuate tre acquisizioni sul miele tal quale e tre acquisizioni dopo il trattamento in bagno a ultrasuoni per 30 minuti a una temperatura di circa 50 °C. Tutte le repliche sono state eseguite in modo indipendente.

In aggiunta, è stato analizzato un campione commerciale di miele di Acacia sottoposto a condizioni sperimentali più severe, aumentando sia la temperatura sia il tempo di esposizione al bagno a ultrasuoni oltre i 50 minuti, al fine di valutare l'eventuale insorgenza di alterazioni anche in condizioni di trattamento più intensive.

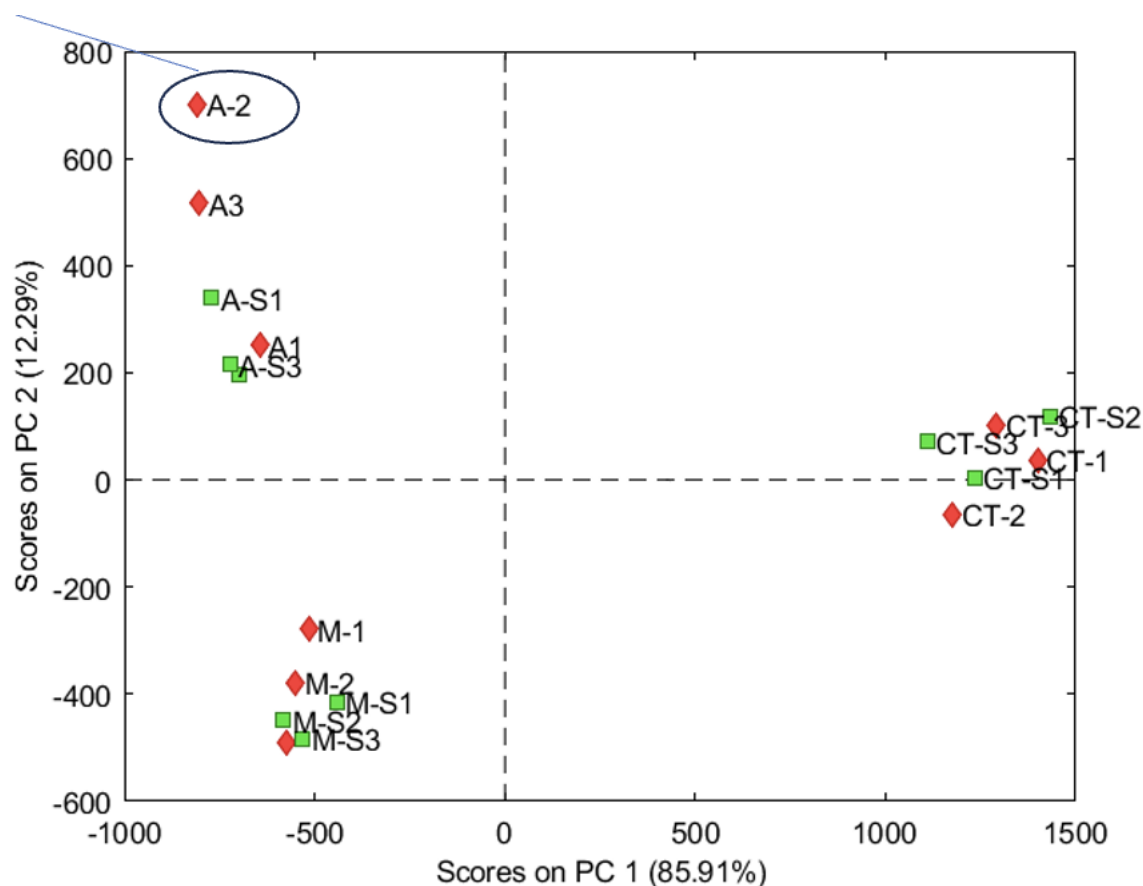


Figura 4.2.1 Score plot dei tre mieli commerciali analizzati prima e dopo sonicazione.

In questo grafico vediamo le repliche dei tre mieli: quelle di Acacia indicate con la lettera A, quelle di castagno indicate con la sigla CT e quelle di Millefiori indicate con la lettera M. Sono presenti sia le acquisizioni dopo il trattamento con il bagno a ultrasuoni indicate con la lettera S prima del numero identificativo della replica, che le acquisizioni senza trattamento (indicate analogamente ma senza la S). L'obiettivo è evidenziare come le repliche di ciascun campione di miele si raggruppino strettamente nello spazio delle PCs indipendentemente dal fatto che il campione sia stato sottoposto o meno a sonicazione, poichè questo indicherebbe che il trattamento di sonicazione non determina variazioni apprezzabili nel profilo analitico del miele e, pertanto, non influenza l'esito dell'analisi. Le prime componenti descrivono oltre il 90% della varianza e possiamo notare innanzitutto come i tre tipi di miele siano ben distinti nello spazio

l'uno dall'altro, ma quello che viene riportato all'attenzione in questo caso è il fatto che per le varie tipologie di miele le due acquisizioni per ogni replica cadono vicine (esempio: CT-3 e CT-S3) ad eccezione della replica A-2, la quale risulta più distante dalle altre perché la cuvetta presentava un evidente alone. Si è scelto volutamente di lasciare la cuvetta 'sporca' per valutare quanto una variazione nelle condizioni sperimentali potesse influire sul risultato.

Da questo confronto si vede che un piccolo errore nell'analisi introduce una variazione maggiore rispetto a quella indotta dalla sonicazione.

Pertanto, è stato possibile affermare che variabilità introdotta dal trattamento ad ultrasuoni sia assimilabile e non distinguibile a quella dovuta al normale errore sperimentale.

Una volta verificato che il riscaldamento con ultrasuoni non determinava cambiamenti nel miele, abbiamo proceduto a selezionare i soli campioni di miele liquido e trasparente, che sono stati analizzati senza sonicazione.

La procedura consisteva nel riempire la cuvetta apposita, senza alcun trattamento precedente, e in seguito inserirla all'interno dello strumento utilizzato per registrare le matrici EEM, all'interno del quale per l'acquisizione completa venivano impiegati circa venti minuti.



Figura 4.2.2 Riempimento delle cuvette.

L'unico accorgimento che si è scelto di seguire era l'acquisizione della matrice di uno standard di rodamina all'inizio di ogni giornata, così da avere un riscontro sulla funzionalità dello strumento nel momento in cui si passava all'analisi dei dati ottenuti.

Una volta che lo strumento aveva terminato l'acquisizione, si estraeva la cuvetta e si puliva molto accuratamente con acqua calda, sapone e acetone; per poi passare al campione successivo.

Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato, per cui a fine mattinata si ottenevano sei matrici EEM, sette contando anche quella di riferimento dello standard.

Per quanto invece riguarda l'analisi dei campioni cristallizzati, prima delle misure, tali campioni sono stati sottoposti a sonicazione in bagno ad ultrasuoni al fine di favorire la dissoluzione della struttura cristallina e ottenere una matrice il più possibile omogenea.

Nella fase preliminare sono stati valutati anche altri metodi di trattamento, tra cui il riscaldamento in bagnomaria e il riscaldamento diretto mediante phon, ma tali opzioni non riuscivano a sciogliere completamente il reticolo cristallino interno.



Figura 4.2.3 Campioni a bagnomaria.

Un'ulteriore procedura valutata per la rimozione della frazione cristallizzata ha previsto l'impiego della centrifugazione, ma il risultato non è stato soddisfacente in quanto il miele rimaneva comunque opaco e con qualche microcristallo.

È per questo che, dopo aver avuto un confronto con l'Università di Modena, si è arrivati alla conclusione che il metodo ideale per il ripristino del miele allo stato iniziale era sottoporlo a un bagno ad ultrasuoni, il quale ha soddisfatto le aspettative: i campioni si sono sciolti omogeneamente.

I campioni che abbiamo sottoposto a questo procedimento sono stati pochi, il numero minimo indispensabile per arrivare ad ottenere un congruo set di dati utili per l'analisi delle componenti principali.

4.3 Strumentazione e Software

Le misure di fluorescenza sono state eseguite a temperatura ambiente utilizzando uno spettrometro a fluorescenza Perkin-Elmer LS55B (Waltham, MA, USA), dotato di lampada ad arco allo xeno da 150 W come sorgente di eccitazione. Le analisi sono state condotte utilizzando una cuvetta in quarzo 101-QS SUPRASIL® High-Precision Cells con cammino ottico di 10 mm, capacità interna di 3,50 mL e lunghezza del percorso ottico pari a 1 cm.

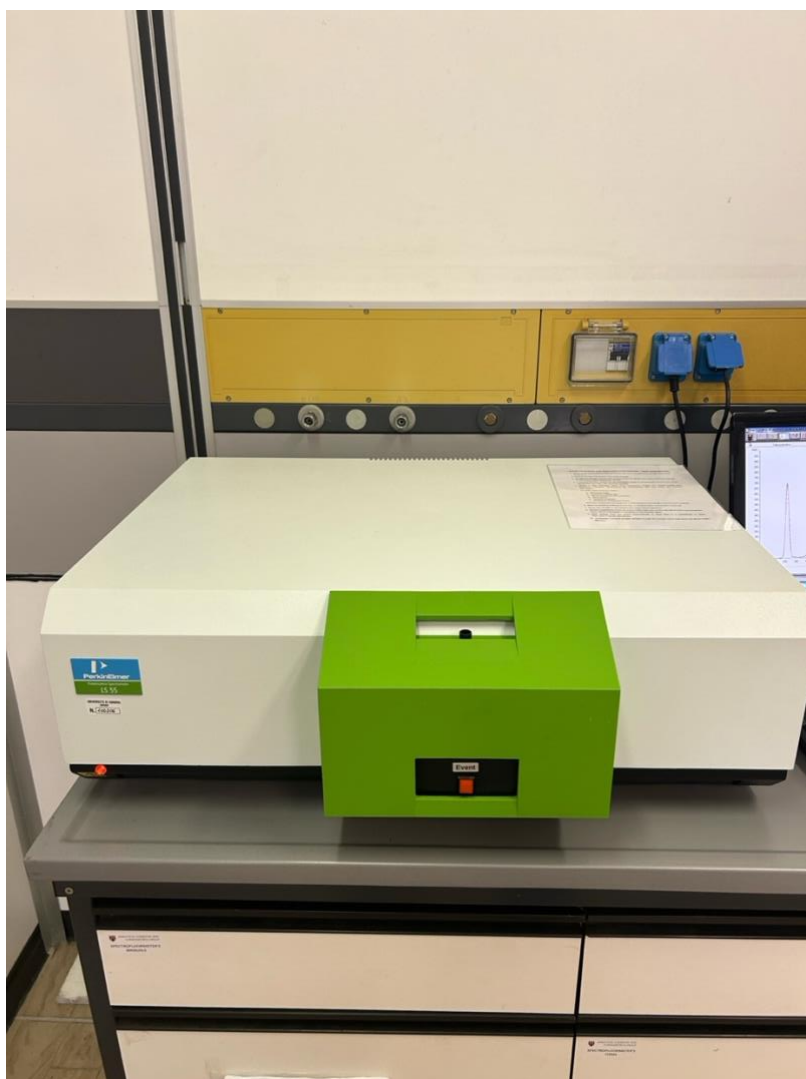


Figura 4.3.1 Spettrofotometro Perkin ElmerLS55

I segnali di fluorescenza sono stati registrati grazie al software BL studio; i dati poi sono stati elaborati utilizzando PLS_Toolbox (Eigenvector Research Inc., Manson, WA, USA).

Una volta raccolti tutti i dati, si è proceduto all'elaborazione chemiometrica senza alcuna correzione preliminare. È stata eseguita l'analisi delle componenti principali (PCA) su dati "unfolded", applicando come pretrattamento il centraggio di colonna. L'unfolding è stato necessario per trasformare la matrice EEM tridimensionale in una matrice bidimensionale, rendendo possibile l'applicazione della PCA.

48

Il grafico sottostante riporta lo score plot nel piano della PC1 e PC3 per la distinzione botanica.

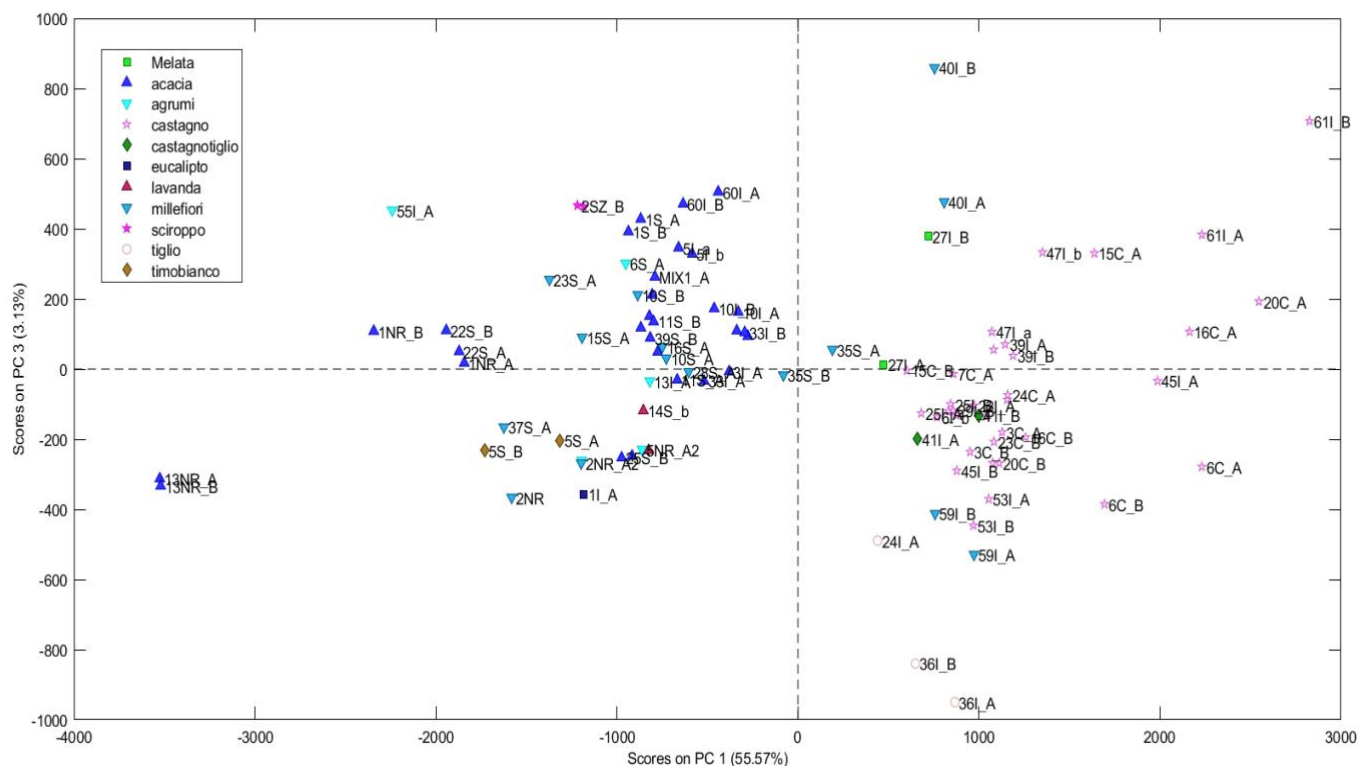


Figura 4.4.2 score plot PC1-PC3 per la distinzione botanica

Le prime due componenti principali (PC1 e PC2) spiegano complessivamente oltre il 90% della varianza totale. Il grafico degli scores evidenzia una parziale separazione tra le diverse specie botaniche, suggerendo la presenza di pattern discriminanti associati all'origine botanica dei mieli analizzati.

Il grafico seguente riporta lo score plot per la distinzione botanica, ma con focus specifico su acacia/castagno.

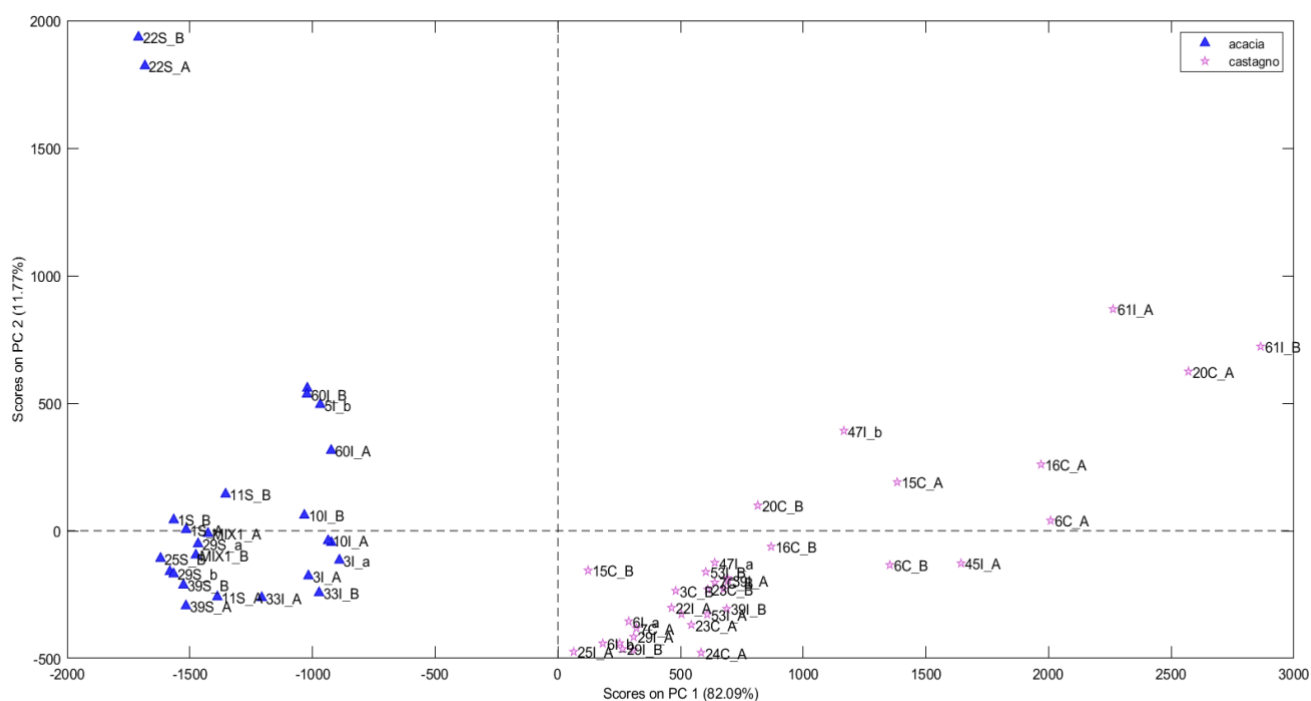


Figura 4.4.3 score plot PC1 PC2 distinzione tra acacia/ castagno.

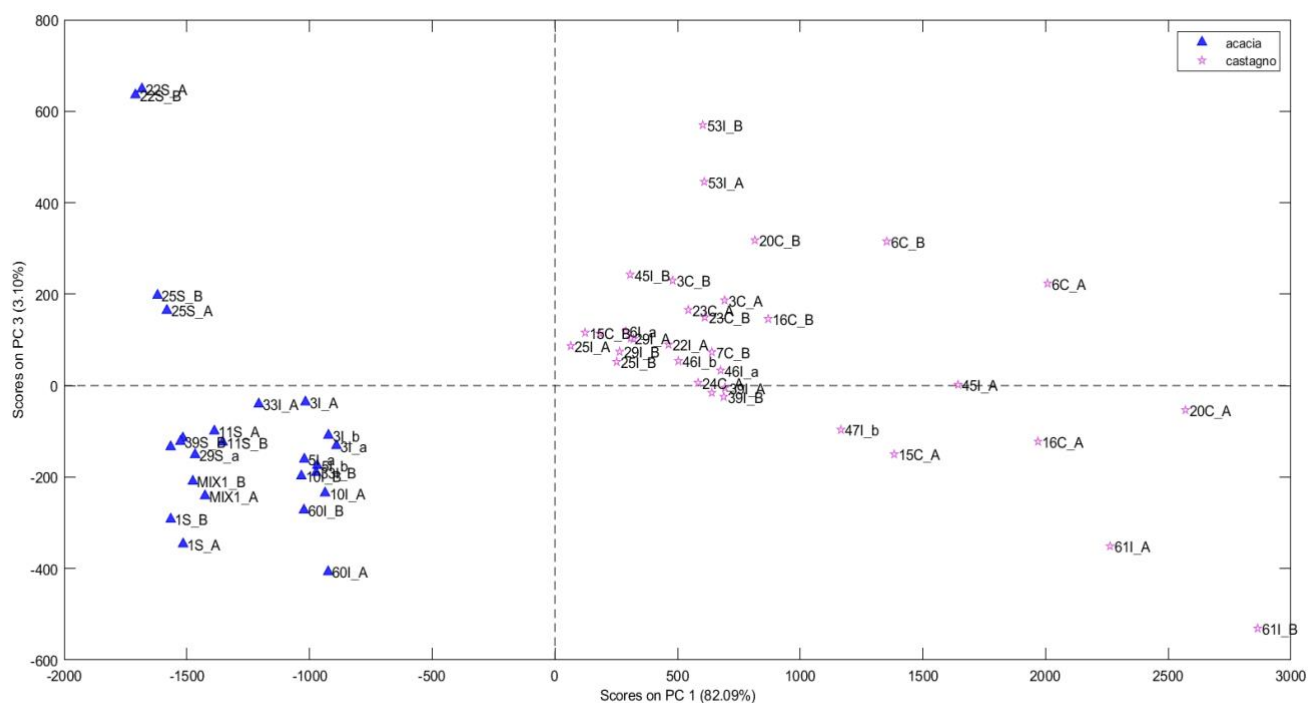


Figura 4.4.4 score plot PC1 PC3 distinzione tra acacia/ castagno

Abbiamo deciso di focalizzarci sulle due categorie di cui avevamo più campioni analizzati a disposizione per fare un confronto. Come possiamo vedere c'è una netta separazione delle due classi nello spazio delle PCS, soprattutto lungo PC1. Questo suggerisce la presenza di pattern precisi che influenzano la divisione di queste due tipologie di miele. Per comprendere nello specifico quali variabili fossero responsabili della distinzione tra queste due classi di miele, è stato realizzato anche un loading plot, selezionando due singole lunghezze d'onda di eccitazione rappresentative. Tali lunghezze d'onda sono state scelte in quanto ampiamente impiegate nella maggior parte degli studi presenti in letteratura per questo tipo di analisi. L'obiettivo era identificare le variabili che contribuiscono maggiormente alla netta separazione osservata tra le due classi di campioni.

Lunghezza d'onda d'eccitazione: 340nm

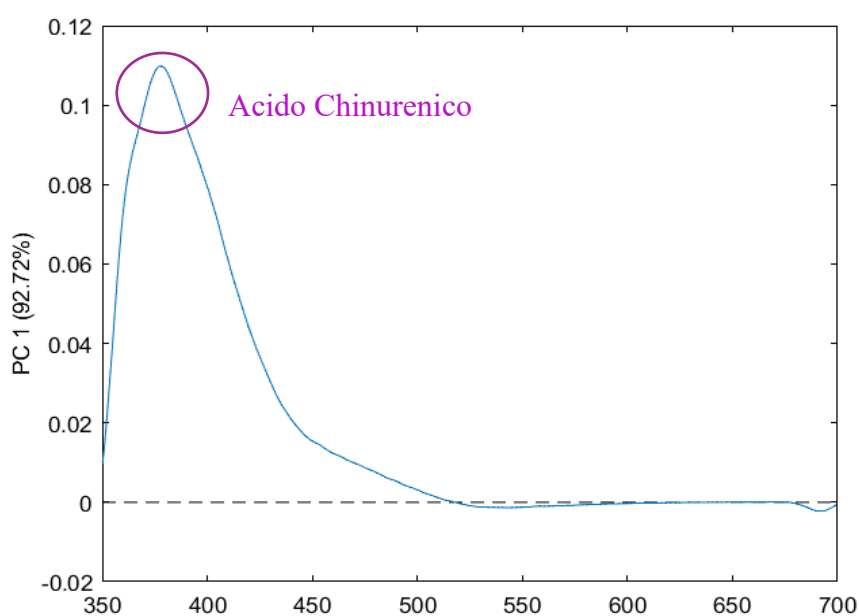


Figura 4.4.5 Loading plot selezionando la lunghezza d'onda di eccitazione di 350nm

Osservando il loading plot, si nota un picco di emissione intenso a circa 380 nm, ascrivibile all'acido chinurenico, considerato uno dei principali marcatori di autenticità del miele di castagno, trattandosi di un metabolita caratteristico associato a tale origine botanica, con note proprietà antinfiammatorie e neuroprotettive.

L'assenza di segnale fluorescente nell'intervallo 450–500 nm suggerisce inoltre la non significativa presenza di prodotti derivanti dalla reazione di Maillard. Tale evidenza potrebbe indicare che i campioni non hanno presumibilmente subito processi rilevanti di degradazione termica o di alterazione della matrice.

Lunghezza d'onda di eccitazione: 280nm

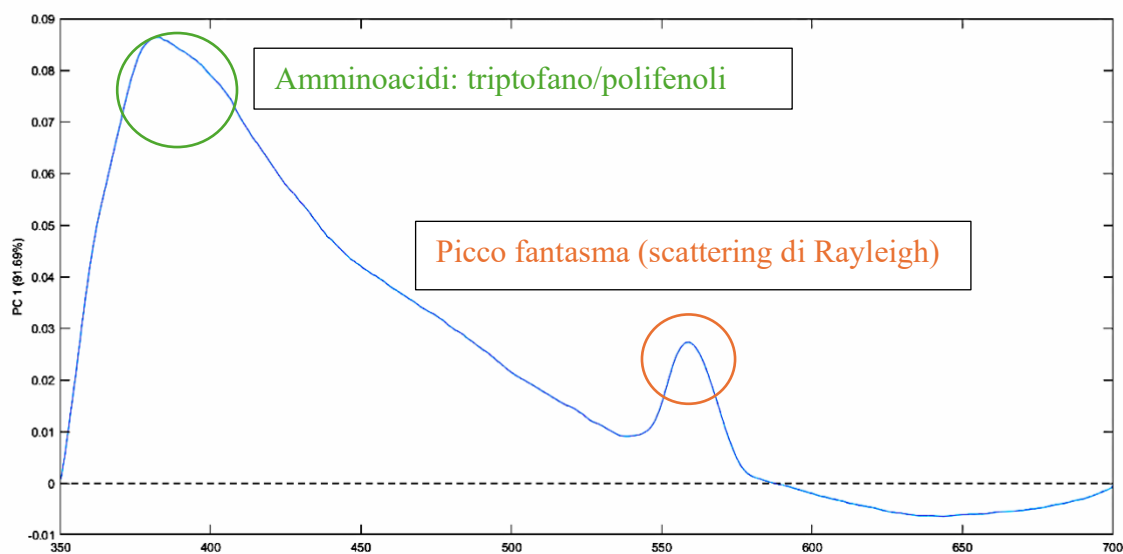
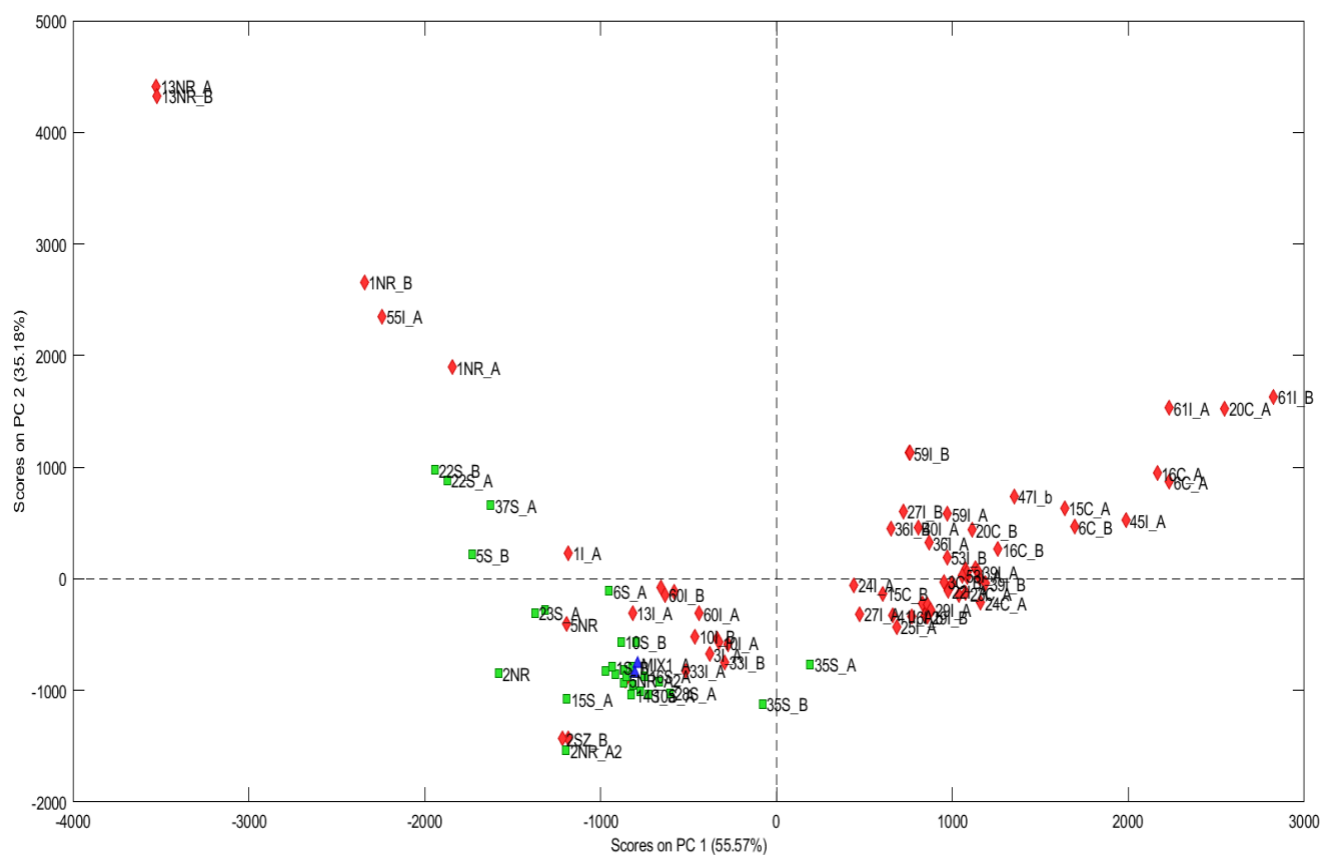


Figura 4.4.6 Loading plot selezionando la lunghezza d'onda di eccitazione di 280nm

Osservando il loading plot, si nota un picco di emissione a circa 380-400nm che indica la presenza di alcuni amminoacidi e polifenoli, tipici del miele di castagno come per esempio il triptofano, precursore dell'acido chinurenico.

Il picco “fantasma” osservato intorno a 560 nm è verosimilmente attribuibile a un artefatto strumentale legato alla diffusione di Rayleigh di secondo ordine. Tale fenomeno può manifestarsi in corrispondenza di lunghezze d'onda pari al doppio della lunghezza d'onda di eccitazione utilizzata. Nel caso specifico, il segnale rilevato intorno a 560 nm è compatibile con questo effetto, suggerendo quindi una sua origine strumentale piuttosto che un contributo reale della matrice analizzata.

Il grafico sotto mostra lo score plot per la distinzione geografica: i campioni italiani sono raffigurati in rosso e quelli stranieri in verde.



Score plot per la distinzione geografica togliendo i campioni non regolari e il 55I.

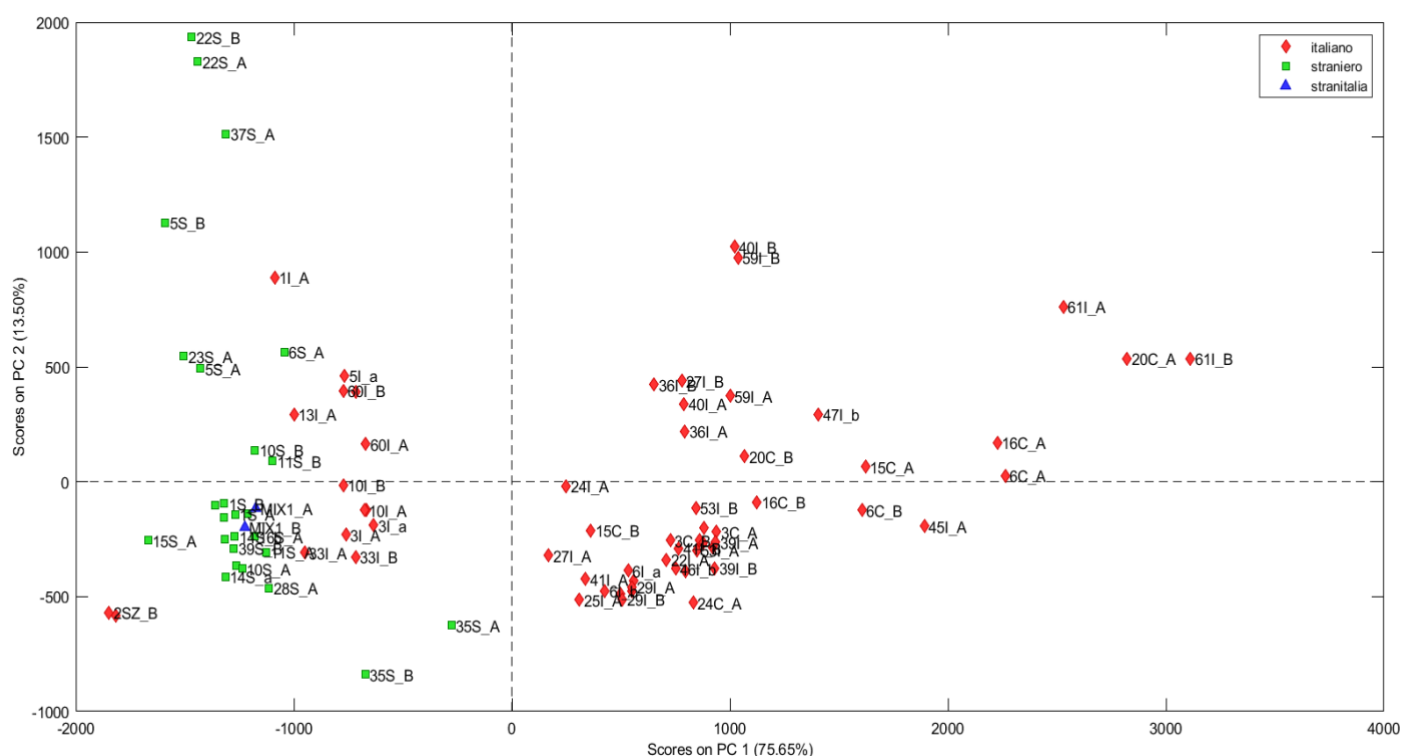


Figura 4.4.8 score plot PC1 PC2 per la distinzione geografica senza i mieli non regolari e il 55I

Il problema di queste rappresentazioni è il fatto che nonostante la distinzione tra mieli stranieri e italiani sia abbastanza netta sul piano, potrebbe essere dovuta non tanto all'origine geografica, ma sempre all'origine botanica; questo perché i mieli di castagno analizzati erano tutti italiani per cui non possiamo avere la certezza che il fattore botanico non influisca. Per ovviare a questa problematica e capire se si potesse fare una distinzione geografica abbiamo deciso di prendere in considerazione solo i mieli di acacia, in cui avevamo campioni sia stranieri che italiani.



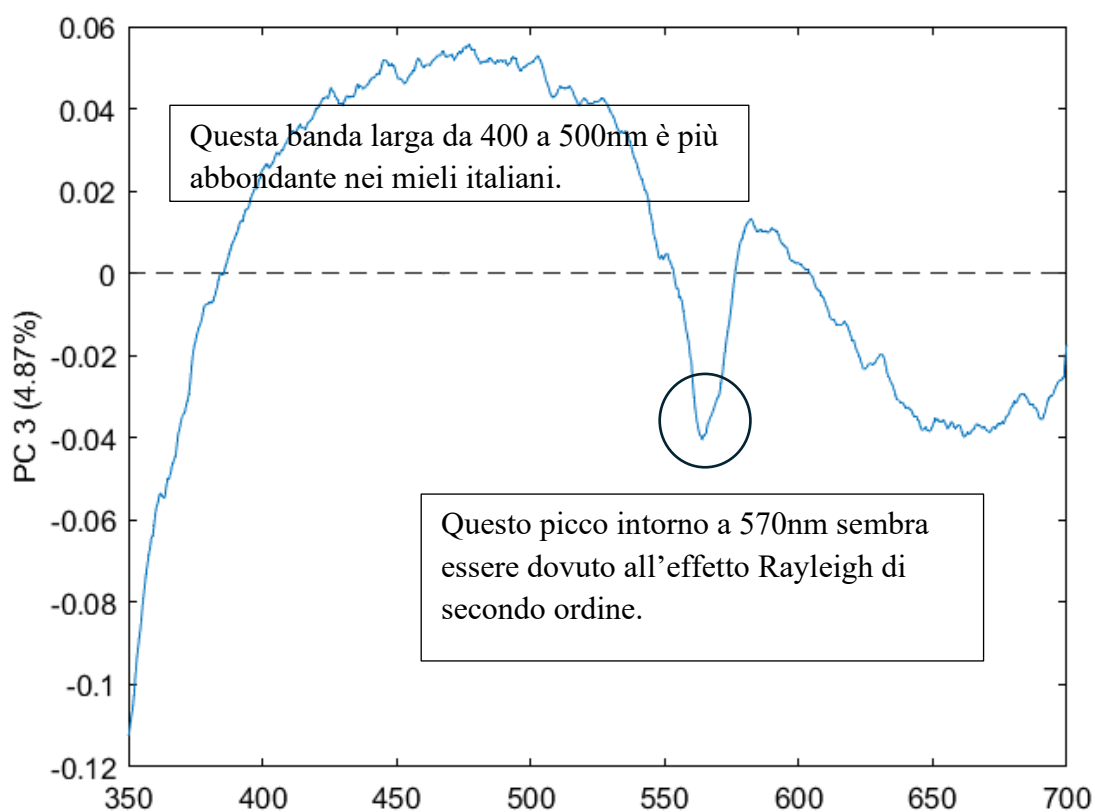


Figura 4.4.10 Loading plot lungo PC3 selezionando la lunghezza d'onda di eccitazione di 280nm

In questo grafico si nota una banda larga tra le lunghezze d'onda di 400 nm e 500 nm che racchiude tutte le variabili più abbondanti nei mieli italiani. Sulla destra, invece, possiamo osservare un picco alla lunghezza d'onda di circa 570 nm, che potrebbe essere dovuto all'effetto Rayleigh di secondo ordine. Per questo motivo abbiamo ripetuto l'elaborazione mantenendo la lunghezza d'onda di eccitazione a 280 nm e tagliando nello spettro di emissione la banda da 550 a 590 nm; i risultati non sono risultati significativamente differenti e pertanto non sono stati qui riportati.

Come ulteriore analisi, è stata selezionata la lunghezza d'onda di eccitazione pari a 340 nm e sono stati costruiti gli score e loading plot per la discriminazione su base geografica, mantenendo il focus sulla sola origine botanica dell'acacia.

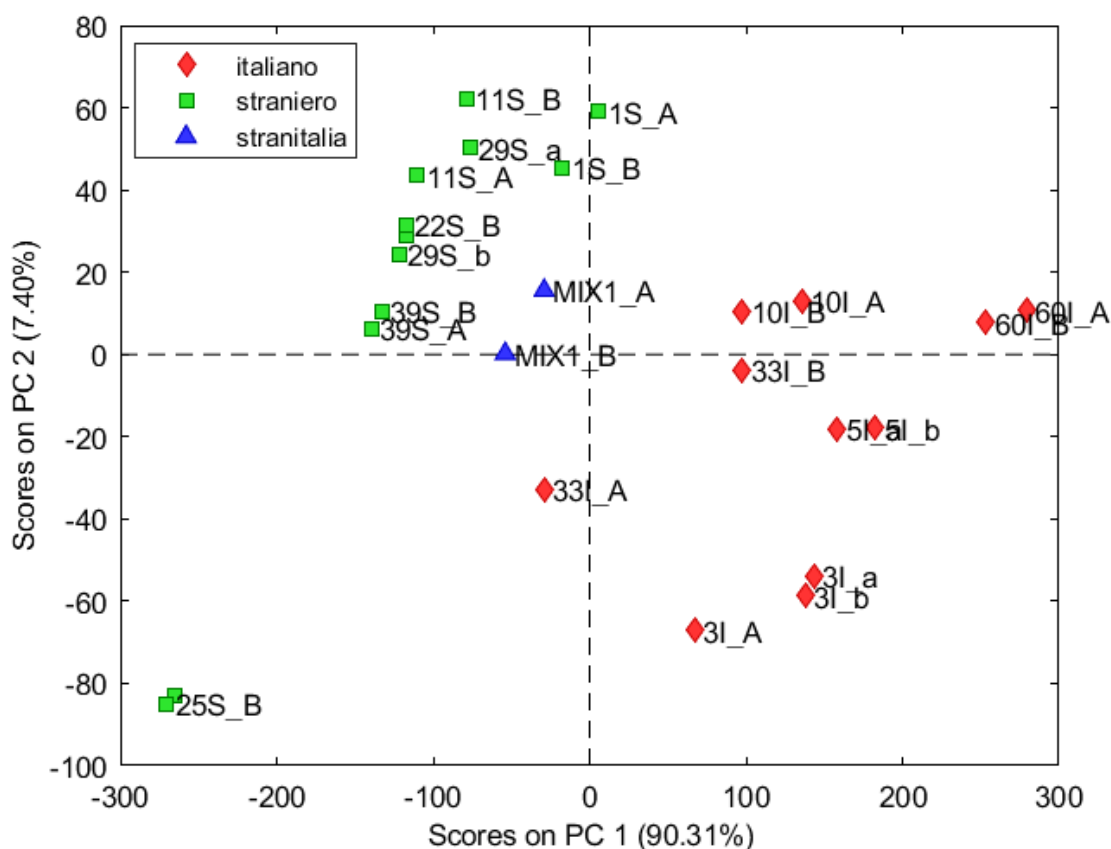


Figura 4.4.11 Score plot selezionando la lunghezza d'onda di eccitazione pari a 340nm per la discriminazione geografica.

La componente 1 in questo caso spiega il 90% della varianza e come possiamo vedere in figura, si ha una distinzione ottimale su questa componente tra i mieli stranieri (in verde) e i mieli italiani (in rosso).

Abbiamo eseguito anche il loading plot per cercare di capire cosa distinguesse così nettamente gli uni dagli altri.

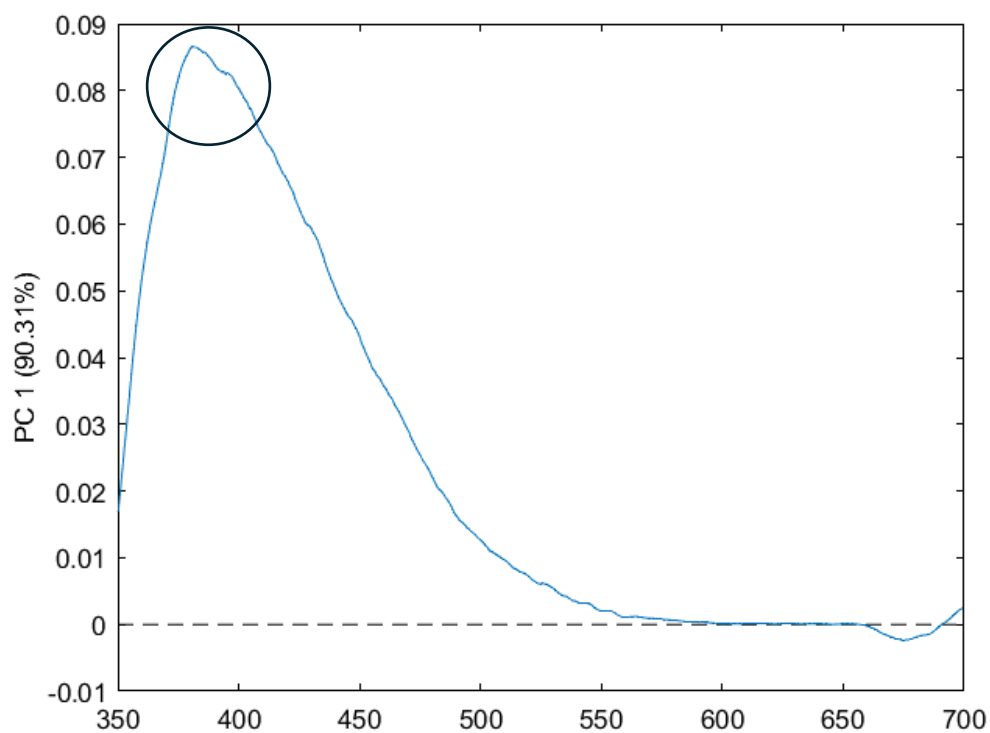


Figura 4.4.12 Loading plot lungo PC1 selezionando la lunghezza d'onda di eccitazione pari a 340nm.

Eccitando il miele a 340 nm, il segnale di emissione che si osserva intorno a 400 nm è tipicamente associato a fluorofori di natura fenolica, suggerendo quindi una maggiore presenza di tali composti nei mieli italiani analizzati.

5. Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha valutato il potenziale dell'analisi spettroscopica di fluorescenza mediante matrici di eccitazione-emissione (EEMs), associata ad approcci chemiometrici, come strumento per la discriminazione del miele in base all'origine botanica e geografica. I risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità della metodologia proposta di distinguere efficacemente alcune tipologie di miele, in particolare quelle di castagno e di acacia, confermando il potenziale informativo delle impronte spettrali di fluorescenza per la caratterizzazione del prodotto.

Sebbene i risultati siano stati complessivamente positivi, è opportuno sottolineare che il numero relativamente ridotto di campioni analizzati e l'elevata eterogeneità che caratterizza il miele costituiscono elementi che limitano la possibilità di estendere in modo definitivo le conclusioni ottenute. La complessa composizione chimica del miele, fortemente influenzata dall'origine botanica, dalle condizioni ambientali e dalle pratiche di produzione e conservazione, può infatti determinare variazioni nel segnale fluorescente che meritano ulteriori approfondimenti.

In particolare, futuri studi dovrebbero prevedere l'analisi di un numero più ampio e rappresentativo di campioni, al fine di poter poi sviluppare modelli predittivi robusti. Sarebbe inoltre utile valutare in modo sistematico l'effetto di fattori quali l'invecchiamento del prodotto, i trattamenti termici e le variazioni compositive naturali, così da comprendere più approfonditamente il loro impatto sulla risposta spettroscopica.

Inoltre, nel presente lavoro di tesi le matrici di emissione-eccitazione (EEM) sono state elaborate esclusivamente mediante analisi delle componenti principali (PCA), in quanto metodo chemiometrico esplorativo finalizzato alla valutazione preliminare delle principali variabili discriminanti.

In prospettiva futura, tali dati saranno ulteriormente analizzati mediante approcci chemiometrici avanzati, più adatti alla natura tridimensionale dei segnali acquisiti, quali i metodi multi-way, tra cui il PARAFAC (Parallel Factor Analysis), al fine di ottenere una modellizzazione più completa e robusta delle matrici EEM.

Nel complesso, i risultati ottenuti confermano che l'approccio basato sulla combinazione tra spettroscopia di fluorescenza EEM e analisi chemiometrica rappresenta una strategia promettente per la caratterizzazione e l'autenticazione del miele. Grazie alla rapidità di analisi, alla limitata preparazione del campione e al carattere non distruttivo della tecnica, questa metodologia potrebbe in futuro affiancare le procedure analitiche tradizionali nell'ambito del controllo qualità e della verifica dell'autenticità dei prodotti destinati al mercato.

Bibliografia

- [1] [Decreto Legislativo 179/2004](#)
- [2] Humanitas: <https://www.humanitas.it/enciclopedia/alimenti/carboidrati/miele/>
- [3] Regione Marche – Veterinaria e sicurezza alimentare: <https://veterinariaalimenti.sanita.marche.it/Articoli/762?CategoryName=Filiera-del-miele-e-dei-prodotti-dell%E2%80%99apiario>
- [4] Apicoltore italiano: <https://www.apicoltoreitaliano.it/index.php/Il-miele/119-tecniche-apistiche/344-composizione-del-miele>
- [5] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie: <https://www.izsvenezie.it/wp-content/uploads/2016/01/corso-tecnici-apistici-2016-marcazzan.pdf>
- [6] Determinazione dell'origine botanica del miele: <https://hdl.handle.net/20.500.12608/12644>
- [7] Le proprietà terapeutiche del miele <https://farmaimpresa.com/it/le-proprietate-terapeutiche-del-miele/>
- [8] Miele, i tanti benefici <https://www.alcenero.com/blogs/miele-futuro/miele-i-tanti-benefici?srsId=AfmBOoowwPtmsLM3ExP9-7sZg94I3WY8VP3r76J5PVlhOjTg8JV3B1n0>
- [9] Le mille proprietà e benefici del miele <https://www.santagostino.it/magazine/miele-proprietate/>
- [10] Miele e benessere <https://salvaleapi.org/magazine-apicoltura/le-proprietate-terapeutiche-del-miele/>
- [11] Bidello, N. Il miele come strategia alternativa per la prevenzione della mucosite nel paziente sottoposto a radioterapia. <https://hdl.handle.net/20.500.12608/20684>
- [12] BENZONI, A. Utilizzo del miele nelle ustioni: revisione di letteratura e case report. <https://thesis.unipd.it/bitstream/20.500.12608/57135/1/benzoni.alice.2011341.pdf>
- [13] DE COL, G. I. O. R. G. I. A. L'efficacia delle medicazioni a base di miele medicale nel processo di guarigione delle lesioni difficili. <https://hdl.handle.net/20.500.12608/77063>
- [14] <https://aris.supsi.ch/entities/publication/9c9ac148-2e0c-44e6-841c-5eef1a9f26a5>
- [15] https://thesis.unipd.it/retrieve/684d37db-5c39-4e7d-8d3e-55°98f00b9c1/Rambaldo_Elena.pdf
- [16] https://moodle2.units.it/pluginfile.php/590004/mod_resource/content/1/Appunti_Fluorescenza.pdf

[17] https://tesi.univpm.it/bitstream/20.500.12075/16480/1/DA_CONVERTIRE.pdf

[18] Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. Lea Lenhardt, Rasmus Bro, Ivana Zekovic, Tatjana Dramicanin, Miroslav D. Dramicanin.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614019001?via=ihub>