

JESSICA FIORI
GIORGIA SERRA
ANNA GLORIA SABATINI

Istituto Nazionale di Apicoltura - Via di Saliceto 80
40128 Bologna - Italia

PAOLA ZUCCHI

Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università di Bologna
Via S. Giacomo 9 - 40126 Bologna - Italia

RENZO BARBATTINI
FEDERICA GAZZIOLA

Dipartimento di Biologia applicata
alla Difesa delle Piante - Università di Udine
Via delle Scienze 208 - 33100 Udine - Italia

Analisi con HPLC di destrine in mieli di melata di *Metcalfa pruinosa* (Say)

Dextrins HPLC analysis in *Metcalfa pruinosa* (Say) honeydew

SUMMARY

In August and September 1997 near Udine (North-east Italy) 29 samples of *Metcalfa pruinosa* honeydews were collected on *Fraxinus ornus* L., *Acer campestre* L., *Cornus sanguinea* L., *Rubus ulmifolius* L., *Platanus hybrida* L., *Ailanthus altissima* Desf. The colours of samples were from light yellow to brown. Honeydews and several honeydew honeys of metcalfa were analyzed with Fiehe gravimetric method and HPLC to evaluate the natural presence of dextrins. In both groups were observed peaks in dextrin zone. It is thus demonstrated that these substances naturally occur in honeydew and that they are not a sign of adulteration. The AA. also compared dextrin of metcalfa honeydew collected by several plant species: differences in oligosaccharides compositions among honeydew honeys, nectar multifloral honeys and fir honeydews have been found.

SOMMARIO

Nella zona di Udine, nei mesi di agosto e settembre 1997, sono stati raccolti 29 campioni di melata prodotta da *Metcalfa pruinosa* su piante di *Fraxinus ornus* L., *Acer campestre* L., *Cornus sanguinea* L., *Rubus ulmifolius* L., *Platanus hybrida* L., *Ailanthus altissima* Desf. Le melate presentavano variabilità di colore dal giallo chiaro al marrone. Queste ultime, insieme ad un ampio numero di mieli di melata di metcalfa, sono stati analizzati utilizzando il saggio di Fiehe (metodo gravimetrico) e con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) per valutare la naturale presenza in destrine. In entrambi i gruppi di campioni sono stati osservati picchi nella regione delle destrine, dimostrando così come tali sostanze siano presenti naturalmente nelle melate e non siano frutto di sofisticazioni. Inoltre si sono comparate le destrine presenti in melate di metcalfa raccolte su piante di specie diverse, e si sono evidenziate differenze nella composizione degli oligosaccaridi tra mieli di melata di metcalfa, mieli di nettare millefiori e mieli di melata di abete.

INTRODUZIONE

Metcalfa pruinosa (Say), rincoto omottero appartenente alla famiglia dei Flatidi, è una cicalina originaria di alcune regioni dell'America settentrionale e centrale, introdotta accidentalmente in Italia da circa 20 anni. Il primo rinvenimento è avvenuto infatti nel 1979 nei dintorni di Treviso (Zangheri e Donadini, 1980).

Dal 1979 il flatide si è diffuso nella maggior parte delle regioni italiane. Attualmente la sua presenza è stata segnalata in quasi tutta l'Italia e in alcuni stati confinanti (Gazziola *et al.*, 1999). La rapidità di diffusione del fitomizo è probabilmente da mettere in relazione anche con la sua caratteristica polifagia: può infatti infestare numerose specie erbacee, arbustive e arboree, sia spontanee che coltivate (Sillani *et al.*, 1997/1998).

Caratteristica di *M. pruinosa* è un'abbondante produzione estiva di melata la quale viene raccolta dalle api che ne ottengono un caratteristico miele.

L'importanza apistica di questo raccolto riguarda soprattutto le aree dell'Italia nord-orientale dove, durante l'estate, scarseggiano altre sorgenti mellifere ed è così possibile ottenere produzioni di miele di

melata di *M. pruinosa* particolarmente puro.

Le caratteristiche di composizione di questo tipo di miele sono state studiate fin dalla sua comparsa sul mercato (Barbattini *et al.* 1991, 1992a, 1992b; Persano Oddo *et al.*, 1991).

Si è così rilevato che i parametri ritenuti idonei a definire un miele di melata fornivano dati rispondenti. Inoltre alcuni parametri fisico-chimici hanno fornito valori che possono ritenersi caratterizzanti del prodotto in questione. Tuttavia, alcuni di essi si sono frequentemente collocati al di fuori dei limiti definiti dalle normative in vigore per i mieli di melata (Legge n. 753 del 12 ottobre 1982): è il caso del contenuto in zuccheri e in acidità (Barbattini *et al.*, 1991). Tale caratteristica ha evidentemente posto dei problemi di ordine commerciale; in particolare la scarsa presenza di monosaccaridi e l'elevato contenuto in polisaccaridi hanno posto dei dubbi sulla stessa genuinità del miele. Tale situazione ha indotto ad un approfondimento relativo alla composizione di questo miele (Held e Vorwohl, 1994; Held *et al.*, 1998).

Nel presente lavoro numerosi mieli di melata di *M. pruinosa* e diversi campioni

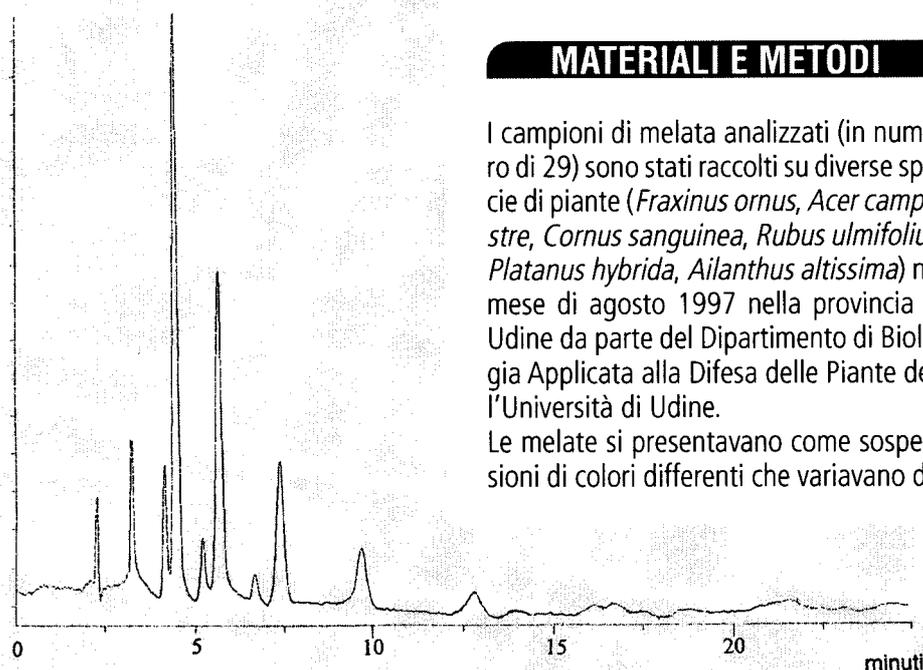


Fig. 1 - Cromatogramma di uno standard di destrine tipo III proveniente da amido di mais.

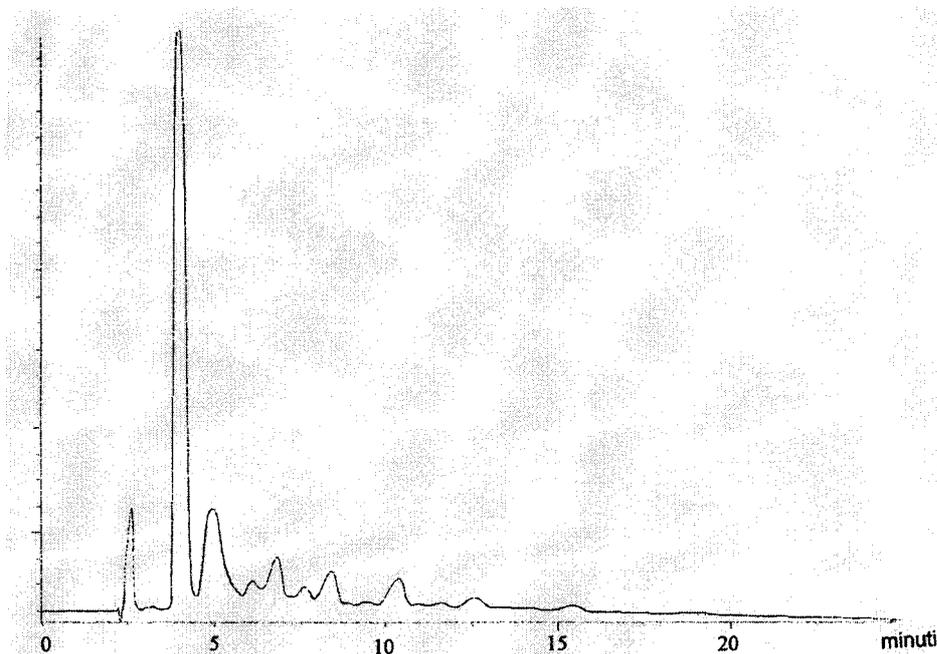


Fig. 2 - Cromatogramma di melata prodotta su *Platanus hybrida* L.

di melata sono stati analizzati utilizzando il saggio di Fiehe (metodo gravimetrico) e la cromatografia liquida in alta pressione (HPLC) per valutare la naturale presenza di destrine nella melata prodotta da *M. pruinosa* e nel miele che ne deriva.

MATERIALI E METODI

I campioni di melata analizzati (in numero di 29) sono stati raccolti su diverse specie di piante (*Fraxinus ornus*, *Acer campestre*, *Cornus sanguinea*, *Rubus ulmifolius*, *Platanus hybrida*, *Ailanthus altissima*) nel mese di agosto 1997 nella provincia di Udine da parte del Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante dell'Università di Udine.

Le melate si presentavano come sospensioni di colori differenti che variavano dal

giallo chiaro al marrone ed erano ricche di impurità.

Per quanto si riferiva ai campioni di miele, questi (in numero di 44) avevano un colore uniforme dall'ambra scuro fino quasi al nero, mentre, riguardo lo stato fisico, alcuni di essi erano liquidi, altri erano cristallizzati, altri presentavano una lenta cristallizzazione.

Tutti i campioni (mieli e melate), analizzati in HPLC, sono stati preventivamente sottoposti al saggio di Fiehe sia allo scopo di avere una prima risposta sulla presenza di destrine, sia per concentrare gli oligosaccaridi che, in questo modo, sono stati separati dalla restante soluzione e analizzati in HPLC. I campioni di mieli in quantità di 0,7-0,8 g e le melate in quantità di 0,5 g sono stati addizionati di alcune gocce di acido cloridrico concentrato, diluito 1:10 e di etanolo al 99,8% in volume circa dieci volte maggiore del campione acidificato (1-5 mL).

Il precipitato è stato centrifugato a 2.970 rpm, separato dal surnatante, quindi ripreso con acqua bidistillata (1 mL circa). Infine la soluzione così ottenuta è stata filtrata (filtri Nylon Acrodisc 13 mm da 0,45 μ m) e analizzata mediante tecnica HPLC.

Le soluzioni di destrine e zuccheri standard sono state preparate secondo due procedure per essere analizzate in fase diretta (Held *et al.* 1998) e in fase inversa.

In fase diretta le destrine tipo III da amido di mais (Sigma), sono state solubilizzate in una soluzione di acetonitrile e acqua (65/35) a caldo, centrifugate (2.970 rpm), quindi il surnatante è stato recuperato e analizzato. Lo standard di zuccheri, con un numero di unità di monosaccaridi definita, era costituito da una soluzione di fruttosio, glucosio, saccarosio, maltosio e melezzitiosio (Sigma) in acetonitrile e acqua (65/35).

Secondo la procedura in fase inversa le

destrine di tipo I da amido di mais (SIGMA) sono state solubilizzate in acqua a caldo, centrifugate, quindi il surnatante è stato recuperato ed iniettato in HPLC. Lo standard degli zuccheri era costituito da una soluzione di fruttosio, maltosio, melezzitiosio e maltotetrosio in acqua.

Le soluzioni ottenute dai campioni di melata e di miele preparate come sopra descritto, sono state iniettate in HPLC Milton Roy CM 4000 con pompa binaria, equipaggiata di iniettore Rheodyne modello 7125 con loop da 20 μ L. È stato utilizzato un rivelatore a indice di rifrazione non termostato (Milton Roy) connesso ad un integratore Maxima 820 (attenuazione 4). Le condizioni di lavoro in fase diretta hanno previsto l'utilizzo di una colonna Spherisorb Ammino 3 μ m (250x4,0 mm) con una fase mobile composta da acetonitrile e acqua (65/35%), un flusso di 1 mL/min, una temperatura di 35°C e una durata della corsa di 25' (Vratnyp *et al.* 1983). Per la fase inversa si è utilizzata una colonna Tracer kromasil 5 μ m (150x4,6 mm) con una fase mobile consistente in acqua al 100%, un flusso

di 0,8 mL/min, una temperatura di 32°C e una durata della corsa di 15'.

RISULTATI

Tutti i campioni di melata sono risultati positivi al saggio di Fiehe, inoltre il precipitato, analizzato col metodo HPLC sia in fase diretta sia in fase inversa, ha mostrato picchi nella regione delle destrine. Esaminando una miscela di zuccheri standard (fase diretta) (Norman *et al.*, 1981; Shirley & Churms, 1990), si desume come i primi tre picchi di ciascun cromatogramma delle melate si riferiscano a mono-di e trisaccaridi, mentre i picchi successivi a oligosaccaridi con catena più lunga (fig. 1). Si può notare, inoltre, che melate raccolte su piante di diversa specie forniscono cromatogrammi diversi e quindi hanno una diversa composizione di destrine (fig. 2 e 3). Da questo si deduce anche che le melate di una stessa pianta hanno la medesima composizione in zuccheri.

I campioni di miele di melata di metcalfa sono stati preventivamente sottoposti ad analisi organolettica, fisico-chimica e microscopica al fine di valutare l'effettiva rispondenza all'origine. In seguito, i campioni di miele di melata di metcalfa sono stati analizzati utilizzando il metodo HPLC in fase diretta. Come si rileva dal relativo cromatogramma (fig. 4), i campioni hanno presentato una frazione destrinica consistente. Nello stesso modo, sono stati analizzati anche campioni di miele di melata di abete e di miele di nettare millefiori (fig. 5 e 6). Nei mieli di melata di abete è stata rilevata la presenza di una frazione destrinica, se pur meno consistente rispetto al miele di metcalfa, mentre i campioni di miele di nettare non hanno presentato picchi relativi alle destrine.

Dal confronto con i due metodi HPLC, emerge come quello in fase inversa risulti più semplice e permetta di avere corse più brevi. Il suo limite però è quello di avere una risoluzione peggiore dei picchi, che risultano più sovrapposti rispetto ai picchi ottenuti con la colonna ammino in fase diretta.

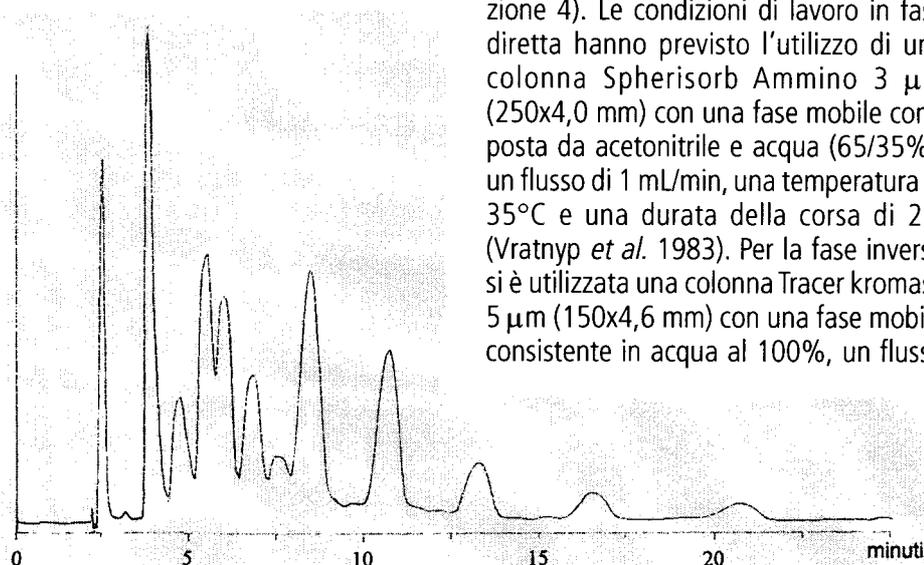


Fig. 3 - Cromatogramma di melata prodotta su *Rubus ulmifolius L.*

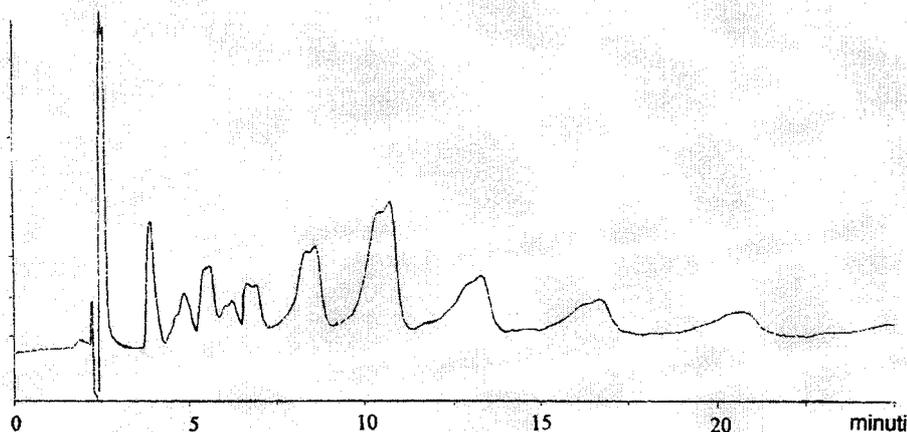


Fig. 4 - Cromatogramma di un miele di melata di *Metcalfa pruinosa Say.*

CONCLUSIONI

I mieli di melata e le melate hanno dato reazione positiva al saggio di Fiehe. I picchi delle destrine si sono osservati nelle

melate, nei mieli di melata di metcalfa e di abete ma non nei mieli di nettare millefiori. Questo dimostra come tali composti siano naturalmente presenti già nelle melate e non siano, quindi, un indice di adulterazione del miele da queste derivato.

Di particolare rilevanza, inoltre, è risultato il confronto della composizione destrinica tra campioni di melata prodotta su piante diverse. Si è infatti osservata una differente composizione in destrine, collegabile all'origine vegetale della melata. Ciò induce a supporre che alcune caratteristiche dei mieli di melata di metcalfa, quali lo stato fisico, spesso non uniforme, siano dovute alla diversa composizione in destrine della materia prima. Infine, è stato possibile evidenziare il differente contenuto in oligosaccaridi tra mieli di melata di metcalfa, mieli di melata di abete e mieli di nettare.

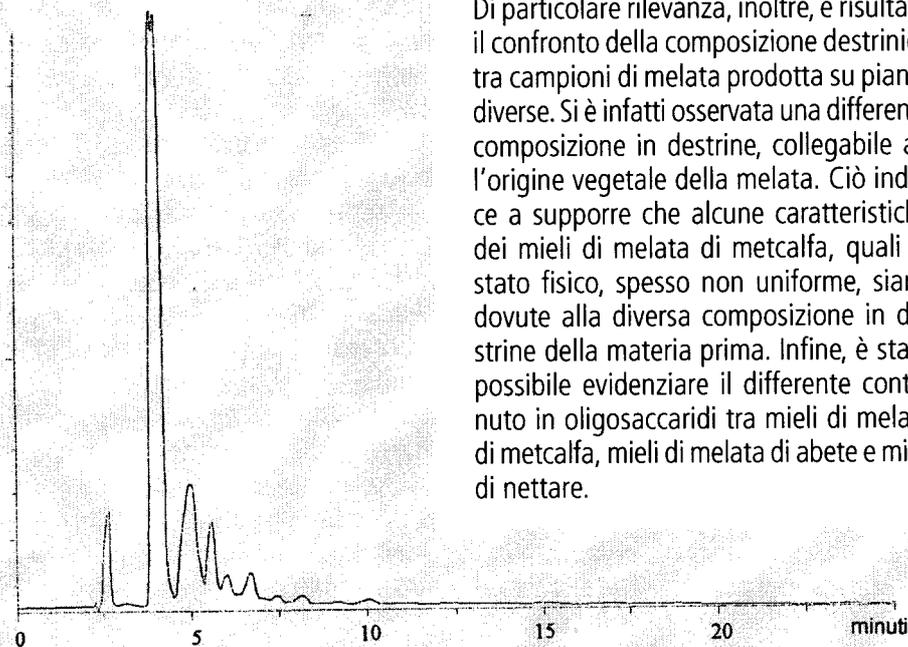


Fig. 5 - Cromatogramma di un miele di melata di abete.

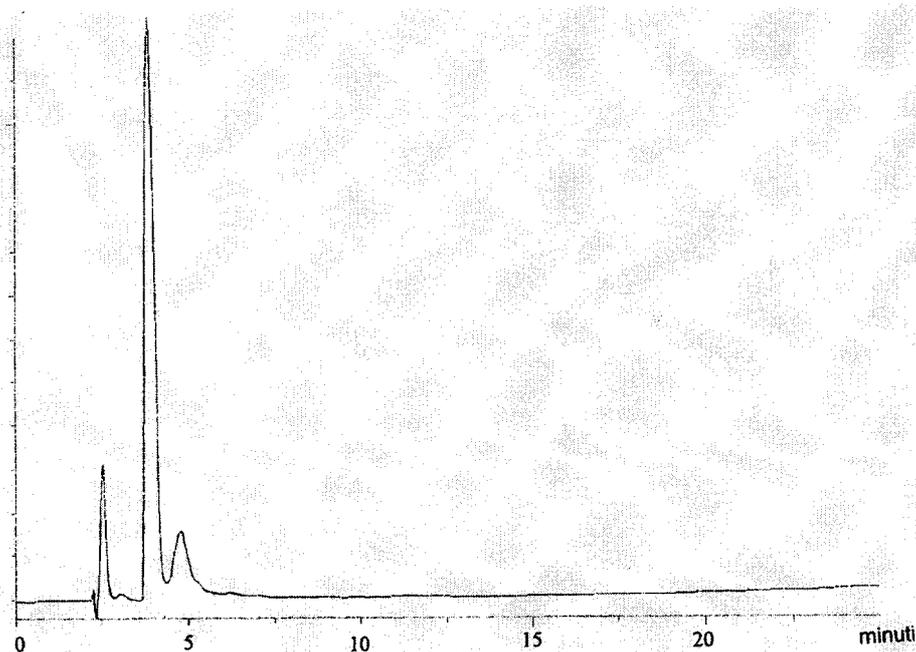


Fig. 6 - Cromatogramma di un miele di nettare.

Ricerca effettuata nell'ambito del progetto finalizzato AMA (Ape, Miele, Ambiente), finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole - contributo n. 48.

BIBLIOGRAFIA

- Barbattini R., Greatti M., Iob M., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Colombo R. - "Osservazioni su *Metcalfa pruinosa* (Say) e indagine sulle caratteristiche del miele derivato dalla sua melata". *Apicoltura* 7, 113-135, 1991.
- Barbattini R., Sabatini A.G., Greatti M., Marcazzan G.L. - "Diffusione di *Metcalfa pruinosa* (Say) in Friuli e produzione di mieli di melata". *Atti Con. Int. "Apilombardia 90"* in *Apicoltura e mieli di Lombardia*, 81-92, 1992a.
- Barbattini R., Greatti M., Iob M., Sabatini A.G., Marcazzan G.L., Colombo R. - "Interesse apistico di *Metcalfa pruinosa* (Say): produzione e caratteristiche chimico-fisiche del miele di melata". *L'apicoltore moderno*, 83 (1), 5-11, 1992b.
- Cheetham N.W.H., Sirimanne P. - "High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrate oligomers". *J. Chromatogr.*, 207, 439-444, 1981.
- Churms S.C. - "Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates". *J. Chromatogr.*, 500, 555-583, 1990. Review.
- Gazziola F., Sbrenna G., Barbattini R., Sabatini A.G. - "*Apis mellifera*, bottinatrice di melata di *Metcalfa pruinosa* e indagine sulle caratteristiche del miele derivato". *Atti VIII Congresso Nazionale A.I.S.A.S.P.*, Grugliasco, Torino, 8-10 settembre 1999 (in press).
- Held T., Zoratti M.L., Vorwohl G. - "Presenza naturale di destrine nella melata di *Metcalfa pruinosa* (Say) (Homoptera, Flatidae)". *L'apicoltore moderno* 1998 (in press).
- Held T., Vorwohl G. - "Naturliches Vorkommen von Dextrinen in Honigtauonighen von *Metcalfa pruinosa* (Say)". *Vortrag bei der AG-Tagung in Lunz am See, Kurzfassung, Apidologie* 25(5), 449-450, 1994.
- Persano Oddo L., Piazza M.G., Sabatini A.G. - "Schede di caratterizzazione del miele di tiglio e del miele di melata di *Metcalfa pruinosa*". *Apicoltura*, 7, 151-159, 1991.
- Sillani S., Barbattini R., Greatti M., Zoratti M.L. - "Il miele di melata di *Metcalfa pruinosa*". *Agribusiness Paesaggio & Ambiente*, 2 nn. 2-3 Supplemento 1997/1998.
- Vratnyp P., Coupek J., Vozka S., Hostomska Z. - "Accelerated reversed phase chromatography of carbohydrate oligomers". *J. Chromatogr.*, 254, 143-155, 1983.
- Zangheri S., Donadini P. - "Comparsa nel Veneto di un Omottero neartico: *Metcalfa pruinosa* (Say) (Homoptera, Flatidae)". *Redia* 63, 301-304, 1980.