

## Un confronto nazionale ed internazionale sulla qualità del miele



Squadrone Stefania

SS Contaminanti Inorganici IZSPLV  
*stefania.squadrone@izsto.it*

Il miele è per definizione l'alimento che le api (*Apis mellifera*) producono partendo dal nettare dei fiori o dalle secrezioni di parti vive di piante, che raccolgono, trasformano, combinano con sostanze proprie e depongono nei loro favi (*Council Directive 74/409/EEC*).



La composizione del miele dipende in primo luogo **dalle specie botaniche presenti** nel territorio; **la provenienza geografica** ha pertanto una notevole importanza sulla qualità del prodotto

I requisiti di etichettatura del miele sono indicati nella *direttiva 2014/63/EU*; l'etichetta deve specificare:



- la nazione di origine
- se il prodotto è una miscela di mieli provenienti da più di un Paese della UE
- se è di derivazione extra-comunitaria



## *Direttiva 2001/110/UE (consolidata 2014)*



le denominazioni possono essere completate da indicazioni che fanno riferimento:

- ❖ — all'origine floreale o vegetale,
- ❖ — all'origine regionale, territoriale o topografica, se il prodotto proviene interamente dall'origine indicata



## Ricerca corrente 20C16 Ministero della Salute

- Determinazione del profilo elementare del miele tramite la quantificazione degli **elementi in traccia** (circa 1-3% della composizione del miele)
- e delle **terre rare (REEs) o lantanidi** data la loro stretta correlazione con la composizione geochimica del suolo (possibile marker territoriale, caratterizzazione geografica)





## Determinazione elementi in traccia (ICP-MS)

n.23

Ag, Al, As, Be, Bi, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, In, Ga, Mn, Mo, Ni, Pb,  
Sb, Se, Sn, Tl, V, U e Zn (LOQ 0,010 mg/kg)

## Determinazione lantanidi/rare earth elements (REEs) (ICP-MS)

n.16

La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Yb, Tm, Lu, Y e Sc  
(LOQ 0,001 mg/kg)

## Perché si determinano elementi in traccia

- **non essenziali:** nessuna funzione biologica, possibilità di esercitare danni cellulari in caso di esposizione anche a bassi livelli,

Ag, Al, As, Be, Bi, Cd, In, Ga, **Pb**, Sn, Tl, V, U

- **essenziali:** coinvolti in diversi processi fisiologici e cofattori di enzimi importanti come quelli coinvolti nel sistema di difesa cellulare contro lo stress ossidativo (rame, manganese, selenio, zinco)

Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn

## Perché si determinano le terre rare

- Le terre rare non si rinvengono isolate allo stato naturale ma i minerali che li contengono sono costituiti da più elementi (lantanidi e ad altri metalli)
- Circa il 95% delle terre rare sono contenute nei minerali **bastnasite e monazite.**
- Nonostante il loro nome, questi elementi non sono così rari nell'ambiente naturale, relativamente abbondanti sulla crosta terrestre, ad esempio il **cerio, l'ittrio, il neodimio sono più diffusi del piombo**





## REEs (lantanidi/terre rare)

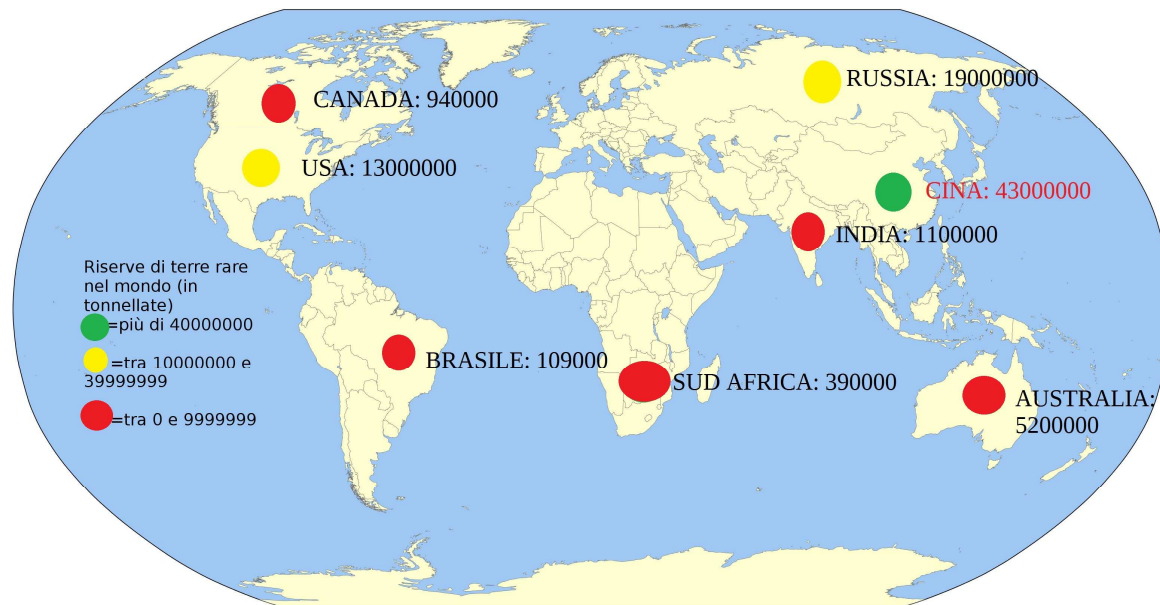
sono un gruppo di 17 elementi  
suddivisi in base al peso atomico

1																	18	
1	H																He	
2	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
3	Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Al	Si	P	S	Cl	Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6	Cs	Ba	Lanthanides	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
7	Fr	Ra	Actinides															
			Lanthanides	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
				La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu

- **LREE (5 elementi leggeri):** lantanio (La), cerio (Ce), praseodimio (Pr), neodimio (Nd), samario (Sm)
- **HREE (9 elementi pesanti):** europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb), disprosio (Dy), olmio (Ho), erbio (Er), tulio (Tm), itterbio (Yb), lutezio (Lu), **+ ittrio (Y) e scandio (Sc)**

REEs utilizzati in applicazioni industriali (**elettronica, energia nucleare, metallurgia, medicina, produzione di computer**) e in alcuni paesi (come la Cina) per l'impiego in **additivi** nella formulazione di **fertilizzanti e mangimi**

**EMERGING  
CONTAMINANTS**



## EMERGING CONTAMINANTS

- ✓ **ittrio** (batterie ricaricabili)
- ✓ **lantanio** (lenti ottiche di alta qualità, lenti fotografiche, pulenti per vetri)
- ✓ **neodimio** (condensatori ceramici)
- ✓ **promezio** (batterie per orologi, strumenti per teleguida missilistica)
- ✓ **samaro** (laser in vetro, schermo neutronico)
- ✓ **europio** (barre di controllo dei reattori nucleari)
- ✓ **gadolinio** (costituente dei chips nella memoria dei computer)
- ✓ **terbio** (per i raggi-X, magneti, memorie ottiche dei computer, componenti degli hard disk, leghe magnetiche),
- ✓ **tulio** (utilizzato per la costruzione di apparecchiature per raggi X e di laser),
- ✓ **lutezio** (batterie ricaricabili, usi medici)

**"XI CONVEGNO DEL CENTRO APISTICO REGIONALE. Asti, 28 ottobre 2021**

I REEs sono spesso utilizzati come traccianti naturali di processi biogeochimici e studiati per valutare la tracciabilità e l'autenticità alimentare:

**correlazione tra gli elementi chimici presenti nel suolo, nella  
pianta e nel frutto  
e nel miele?**

i lantanidi possono essere di ausilio  
nell'identificare la provenienza geografica  
del miele?



## Ricerca corrente 20C16

Elementi in traccia e REEs  
in **miele italiano**

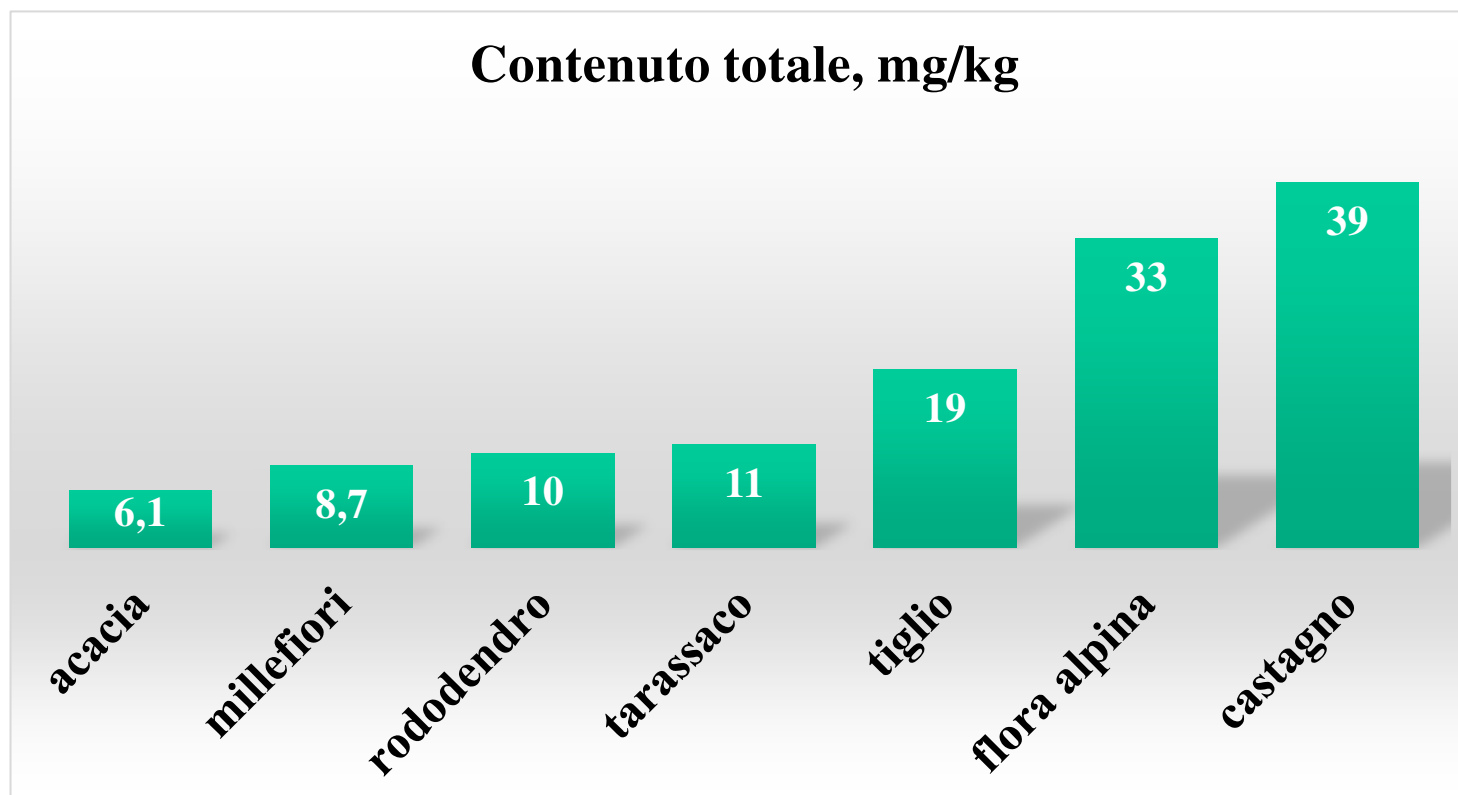
di diverse tipologie  
da **4 regioni italiane**





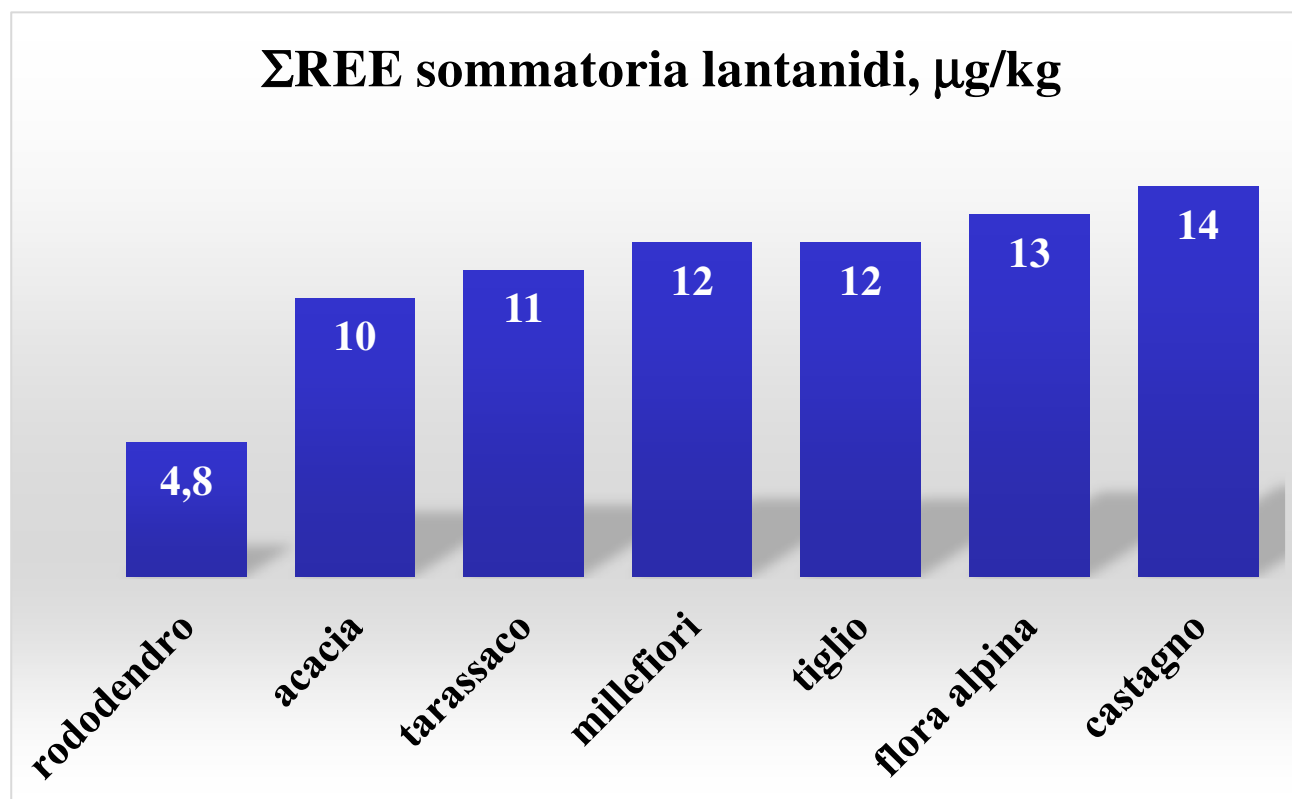
## RISULTATI

Elementi in traccia in **miele italiano** di diverse tipologie  
(Piemonte)



## RISULTATI

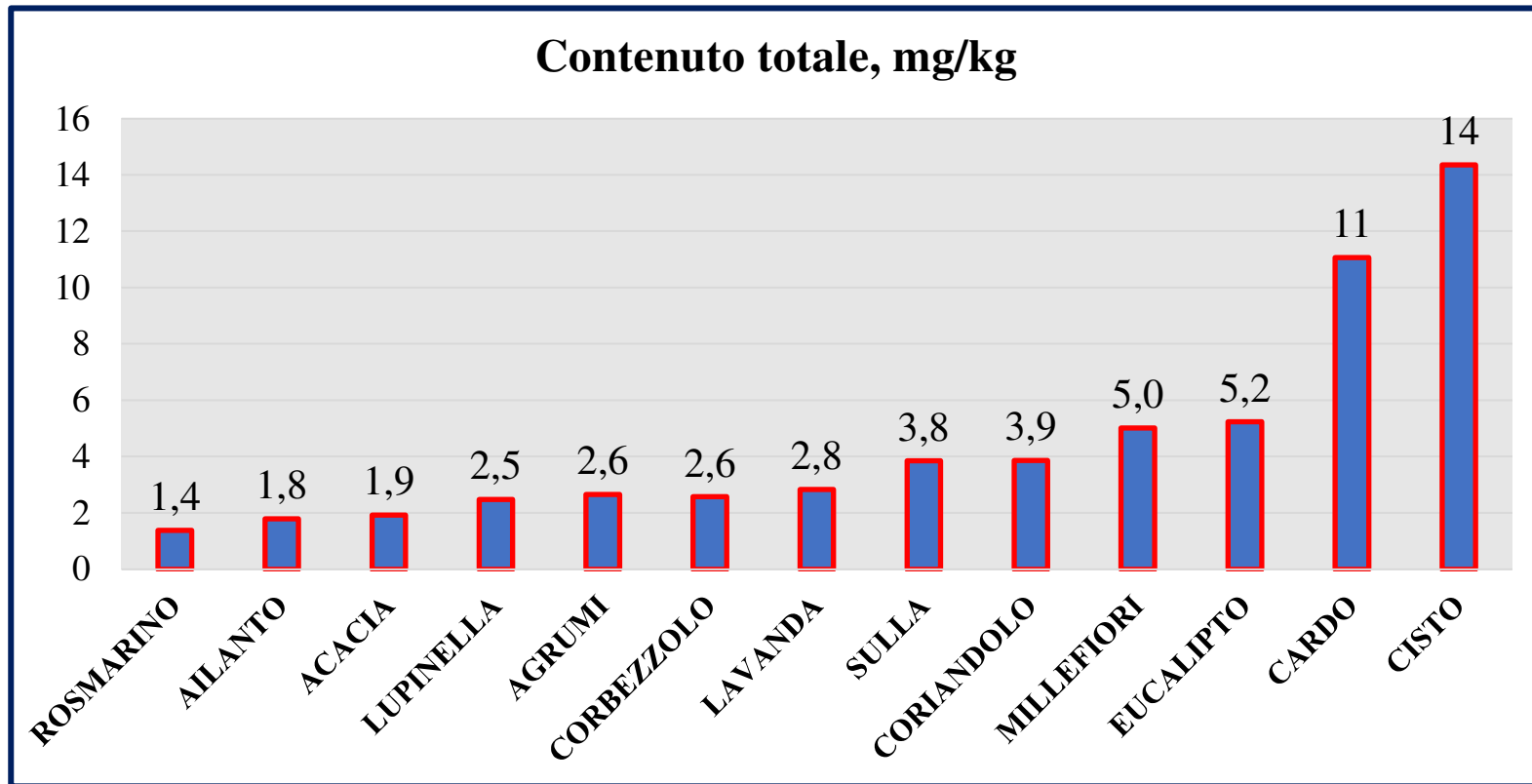
lantanidi in **miele italiano** (Piemonte)



## RISULTATI

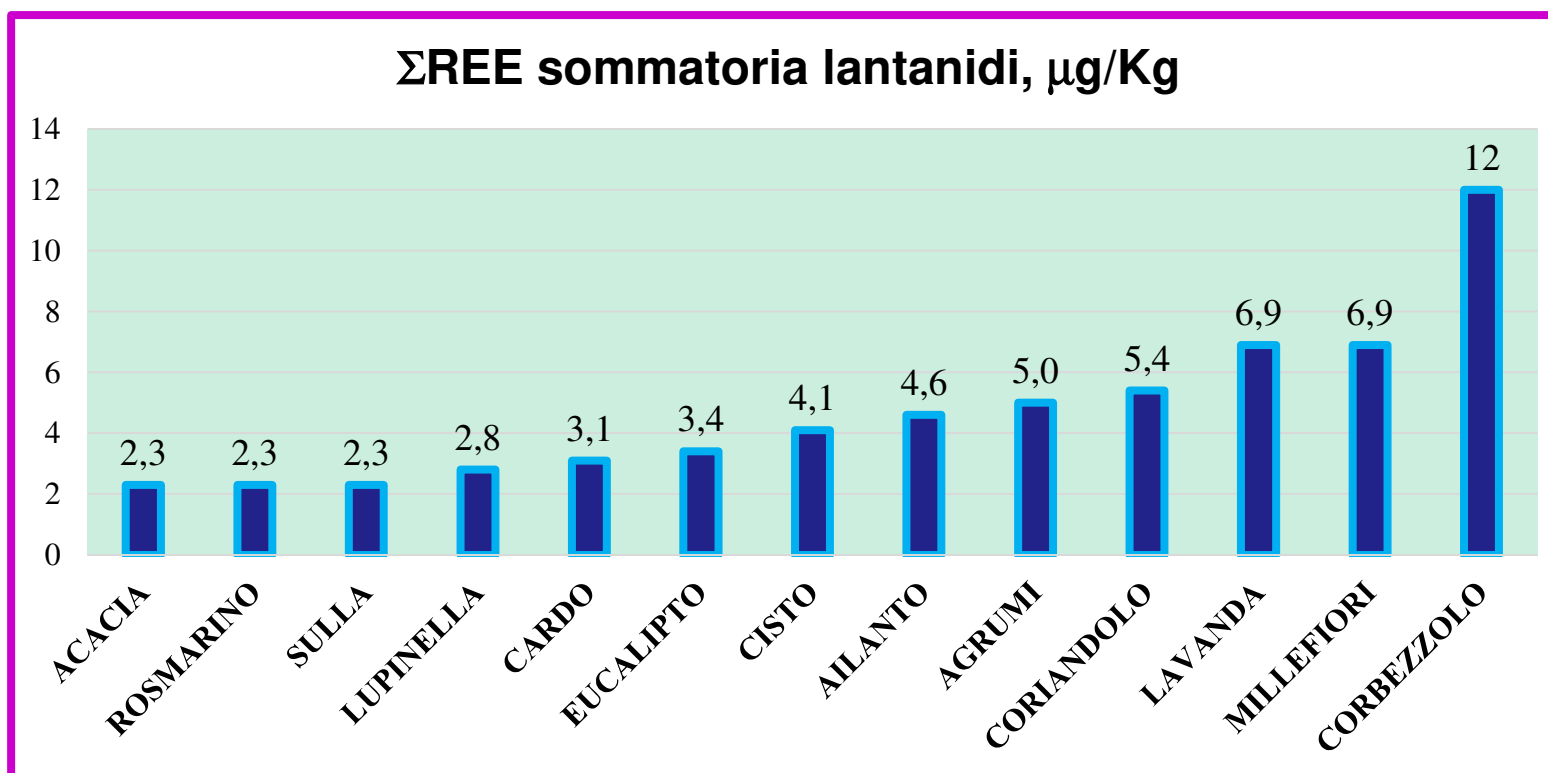
### Elementi in traccia in **miele italiano**

(da Abruzzo, Molise, Sardegna)



## RISULTATI

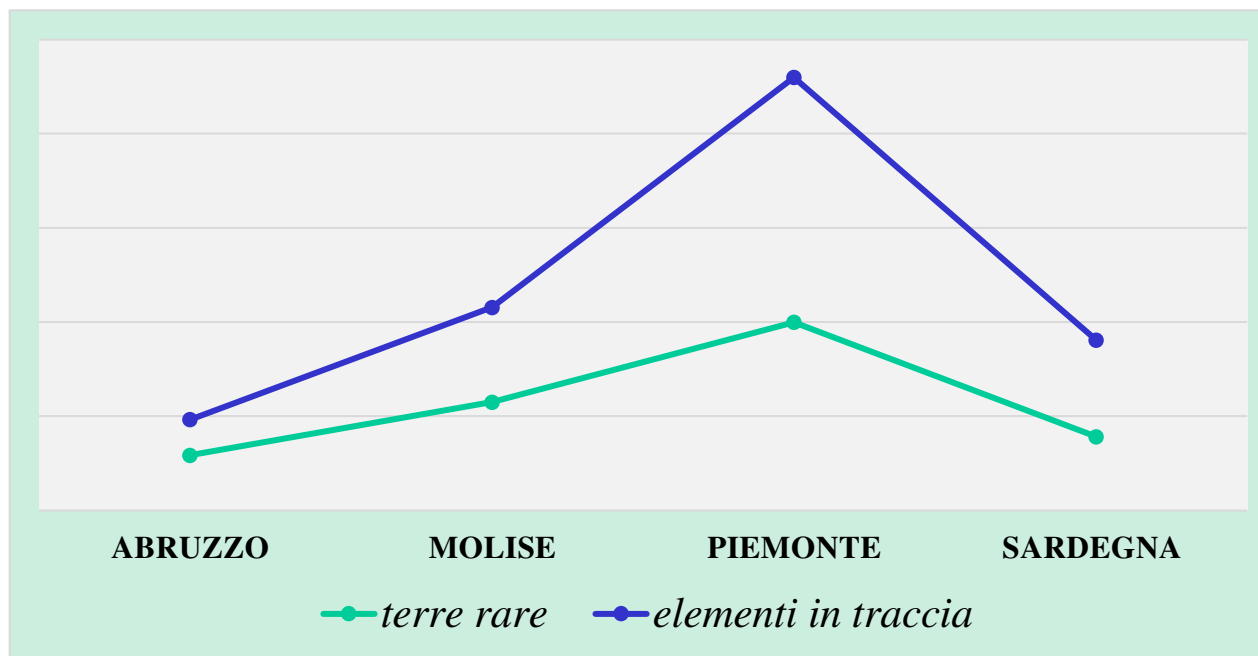
lantanidi in **miele italiano** di diverse tipologie  
(da Abruzzo, Molise, Sardegna)





## RISULTATI

elementi in traccia e lantanidi in miele italiano



	ABRUZZO	MOLISE	PIEMONTE	SARDEGNA	
terre rare	2,9	5,8	<b>10</b>	3,9	µg/kg
elementi in traccia	1,9	5,0	<b>13</b>	5,1	mg/kg





## RISULTATI

### elementi in traccia

	PIEMONTE	MOLISE	SARDEGNA	ABRUZZO
Al	1,9	0,80	0,26	0,11
As	0,021	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cd	0,011	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Co	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cr	0,15	0,039	0,014	0,012
Cu	0,37	0,16	0,37	0,15
Fe	1,7	4,0	2,0	0,81
Mn	2,6	0,22	0,50	0,14
Mo	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ni	0,13	0,047	0,062	0,048
Pb	0,061	0,016	<LOQ	<LOQ
Rb	5,4	0,22	0,28	0,17
Se	0,20	0,041	0,069	0,023
Sn	0,017	<LOQ	<LOQ	<LOQ
V	0,044	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Zn	0,90	0,16	1,5	0,42

## Ricerca corrente 20C16

sono stati selezionati mieli provenienti dai seguenti paesi extra europei:

Argentina, Brasile, Kazakistan, Messico, Macedonia, Montenegro,



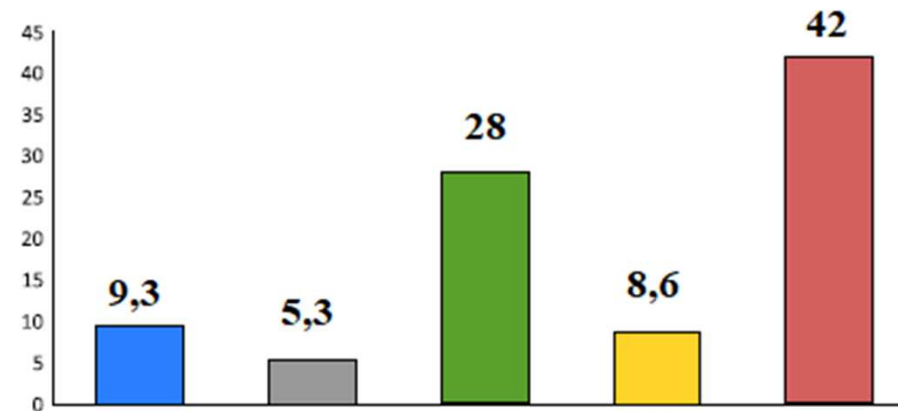
Russia



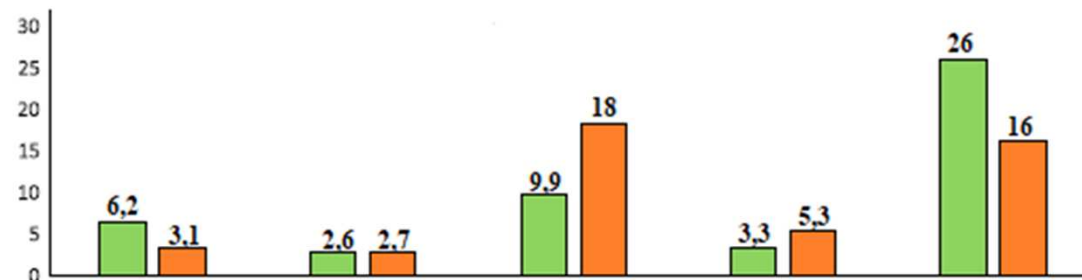
Tanzania



## Contenuto totale di elementi in traccia (mg/kg): confronto internazionale su miele millefiori



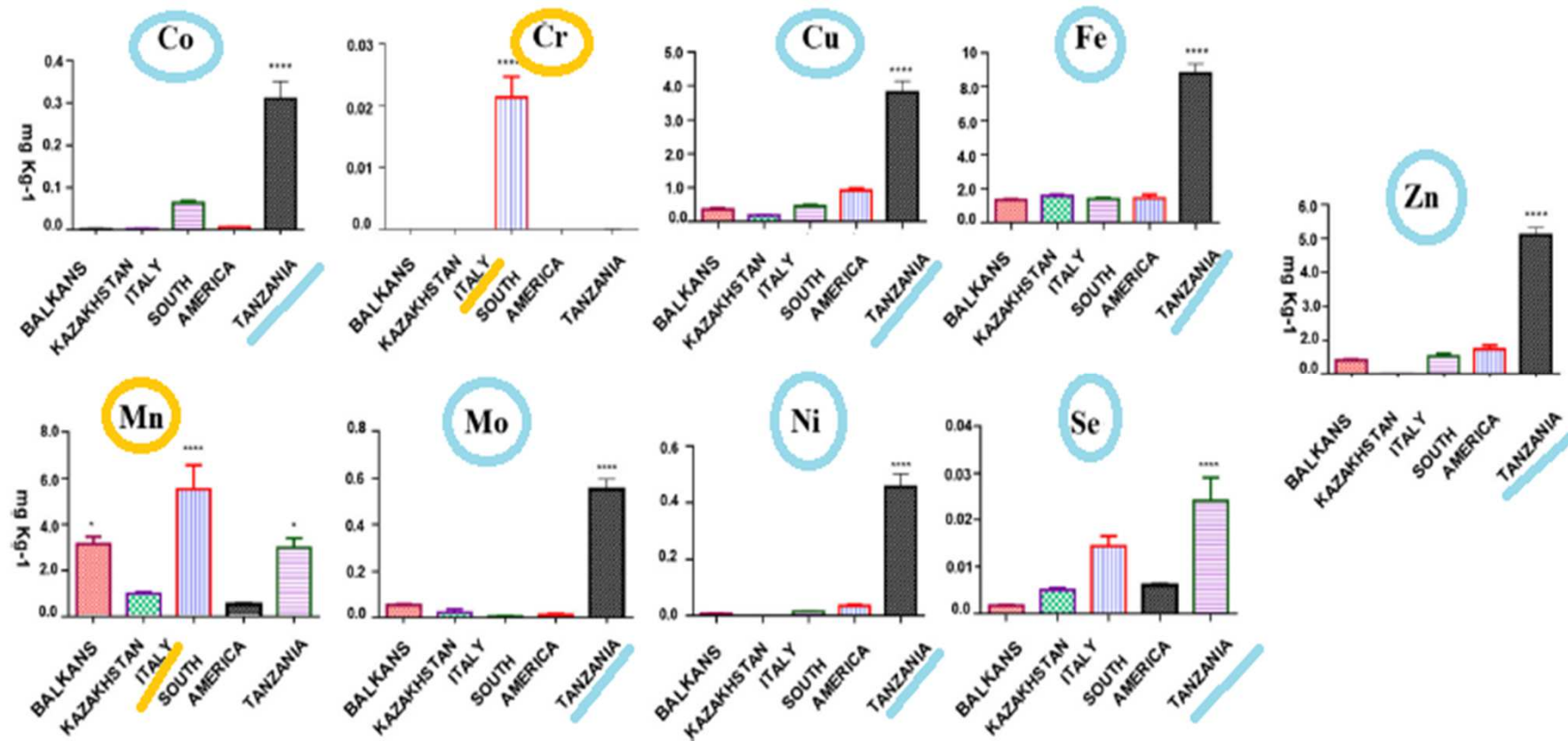
**BALKANS KAZAKHSTAN ITALY SOUTH AMERICA TANZANIA**



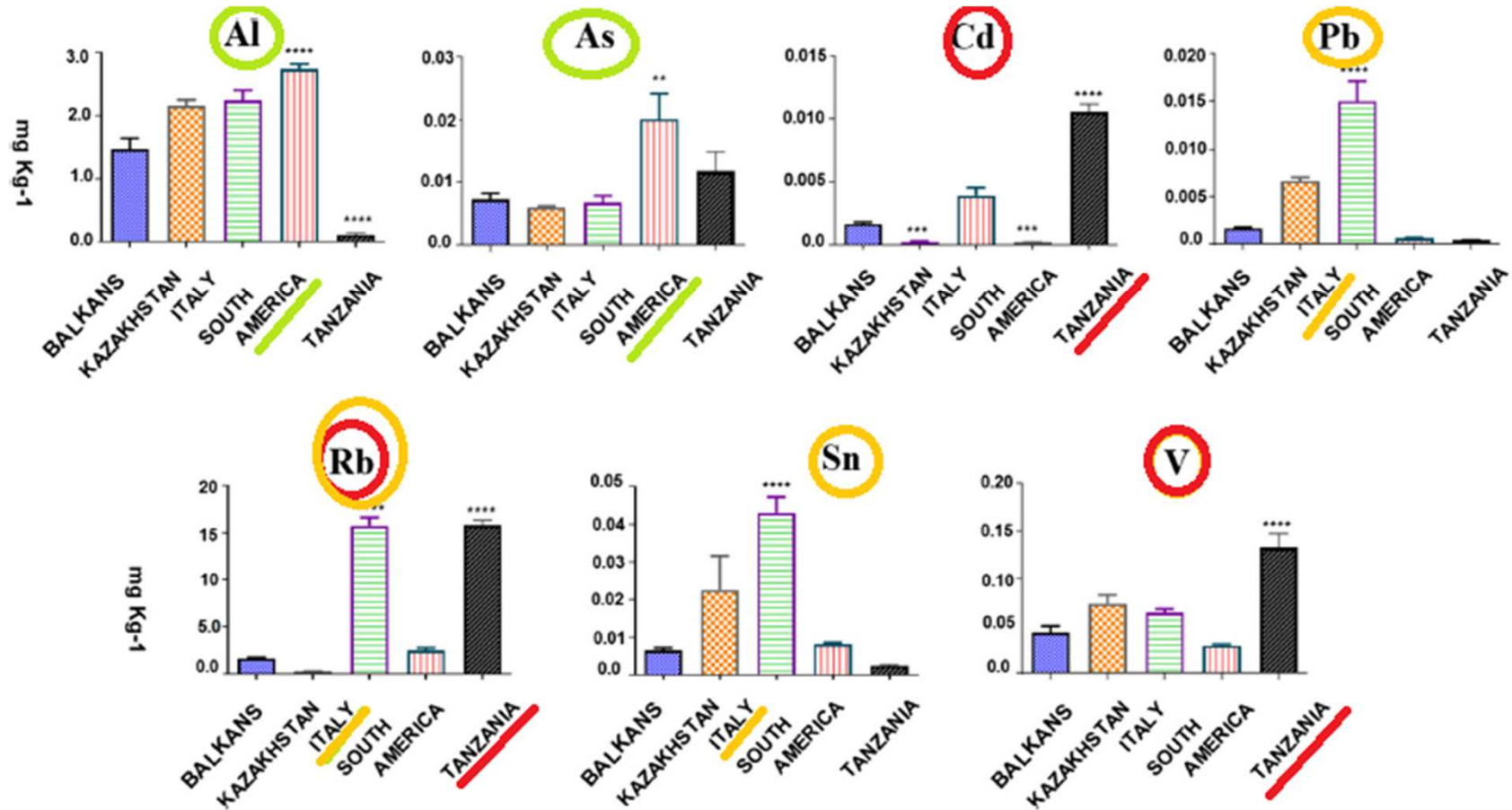
■ essential ■ non essential



## confronto internazionale METALLI ESSENZIALI

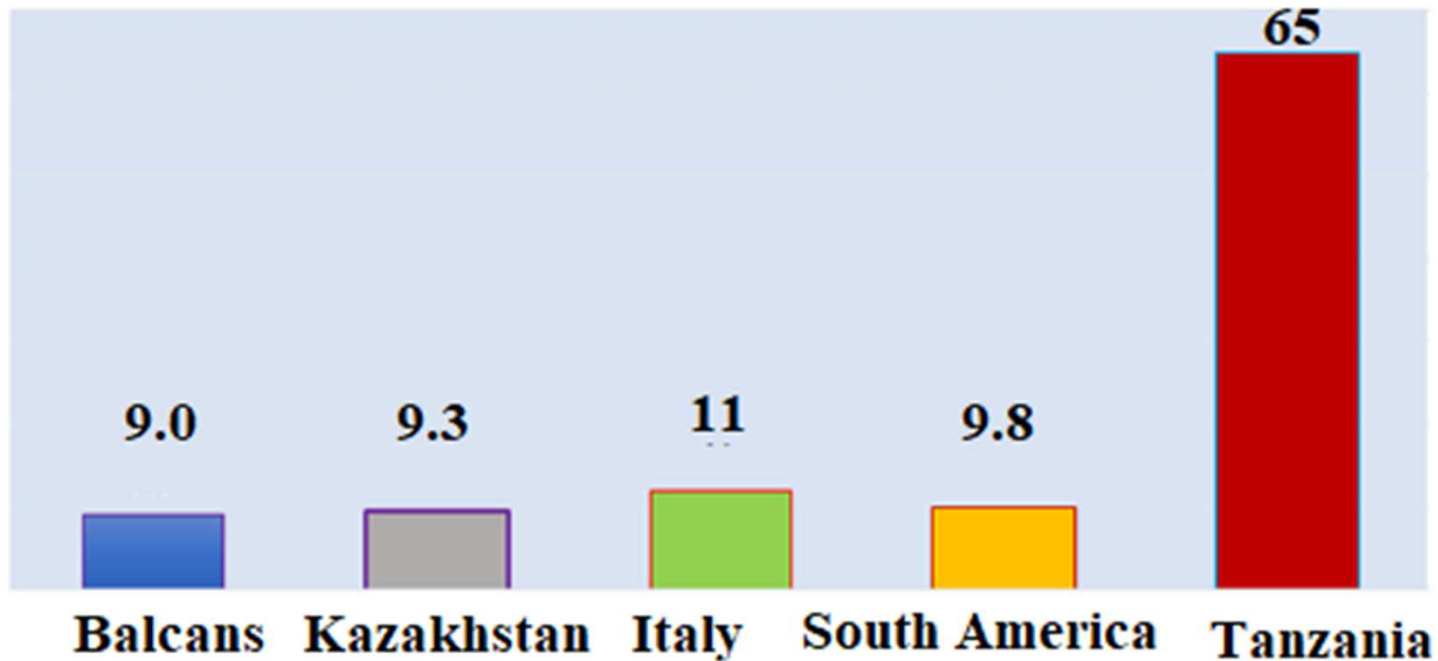


## confronto internazionale METALLI NON ESSENZIALI

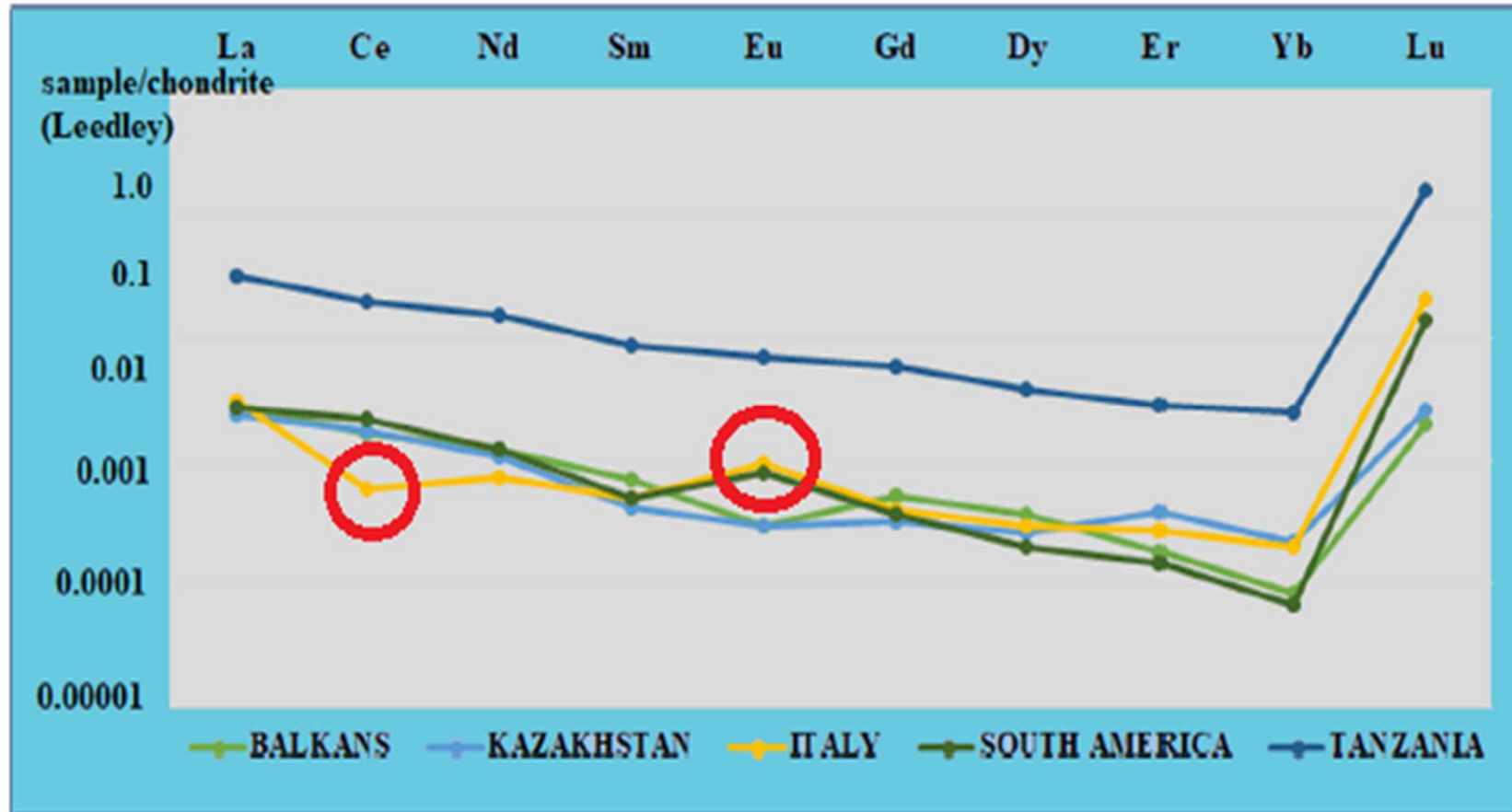




Contenuto totale di REEs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  
confronto internazionale isu miele millefiori



## Normalizzazione REEs: condrite di Leedey (Masuda 1975)





## Ricerca corrente 20C16 Metalli

- \* differenze significative nelle concentrazioni di elementi in traccia e di terre rare nel miele, legate al paese di origine

***Tanzania:*** contenuto più alto di elementi in traccia e REEs

***Balcani e Sudamerica:*** i valori più bassi

- \* in tutti i campioni concentrazioni molto basse o trascurabili di elementi noti per esercitare tossicità per gli esseri viventi, come arsenico, cadmio, e piombo.
- \* nessun campione ha superato i limiti massimi fissati per il Pb
- \* buon contributo di elementi essenziali alle proprietà nutritive del miele




Environmental Science and Pollution Research (2020) 27:12646–12657

<https://doi.org/10.1007/s11356-020-07792-7>

RESEARCH ARTICLE



## Trace elements and rare earth elements in honeys from the Balkans, Kazakhstan, Italy, South America, and Tanzania

Stefania Squadrone<sup>1</sup>  • Paola Brizio<sup>1</sup> • Caterina Stella<sup>1</sup> • Martino Mantia<sup>1</sup> • Sabina Pederiva<sup>1</sup> • Fulvio Brusa<sup>1,2</sup> • Paola Mogliotti<sup>1,2</sup> • Annalisa Garrone<sup>1,2</sup> • Maria Cesarina Abete<sup>1</sup>

## Ricerca corrente 20C16

### Analisi chemiometriche su mieli piemontesi

(**UNIUPO**, *elisa.robotti@uniupo.it*)

#### *Cosa è la chemiometria*

è un settore della chimica che studia l'applicazione dei metodi matematici o statistici ai dati chimici.

La International Chemometrics Society (ICS) ne da la seguente definizione: *la chemiometria è la scienza di relazionare le misure effettuate su un sistema o su un processo chimico allo stato del sistema via applicazione di metodi matematici o statistici.*





## Analisi delle Componenti Principali permette di...

- Valutare **correlazioni** tra le variabili
- **Visualizzare** efficacemente **gli oggetti**
- **Sintetizzare** la descrizione dei dati
- **Ridurre la dimensionalità** dei dati
- Ottenere macro-descrittore del sistema (**macrovariabili**)



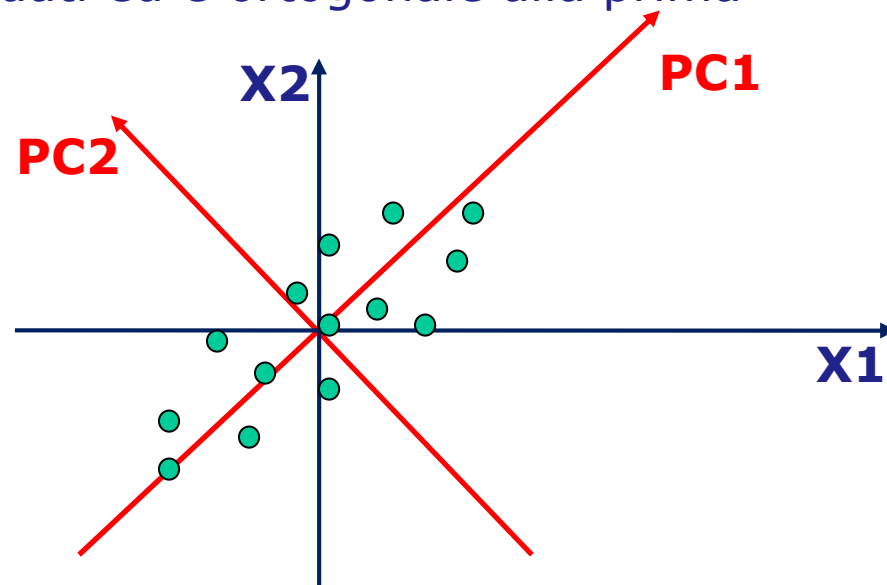
## Analisi delle Componenti Principali

### Rotazione del sistema di riferimento originale

**Prima componente (PC1):** giace lungo la direzione di massima varianza (informazione) dei dati

**Seconda componente (PC2):** giace lungo la direzione di massima varianza (informazione) residua dei dati ed è ortogonale alla prima

Le componenti successive portano via via una minore quantità di informazione (**rumore sperimentale**)



## ***Analisi delle Componenti Principali (PCA)*** **su mieli piemontesi**

Dataset: 90 campioni descritti attraverso 43 analiti (metalli), ciascuno dei quali rappresentato dalla concentrazione espressa in mg/kg

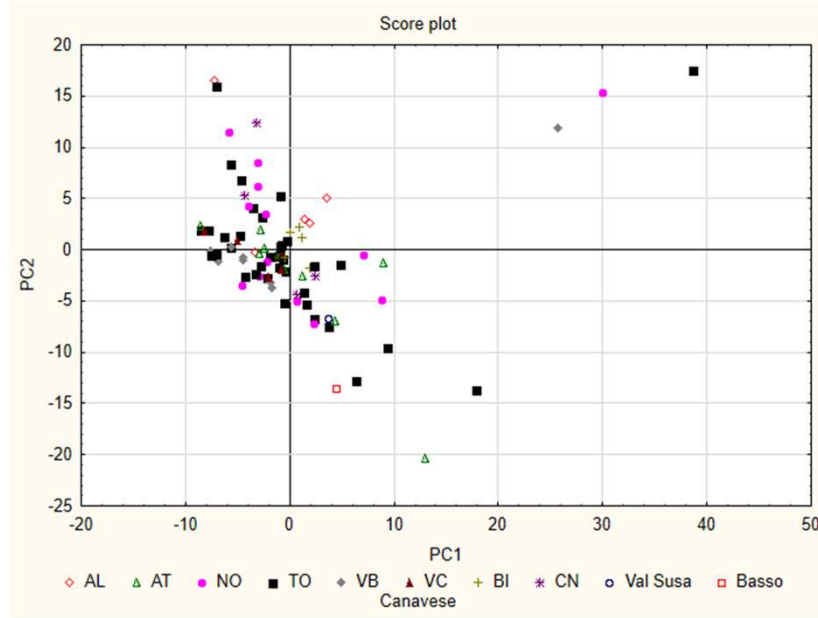
calcolati i rapporti di concentrazione di ciascun analita rispetto a tutti gli altri analiti eliminando le normalizzazioni per analiti che presentavano concentrazioni pari a zero

dataset finale: 90 campioni descritti da 413 variabili (rapporti di concentrazione) analizzato mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA)

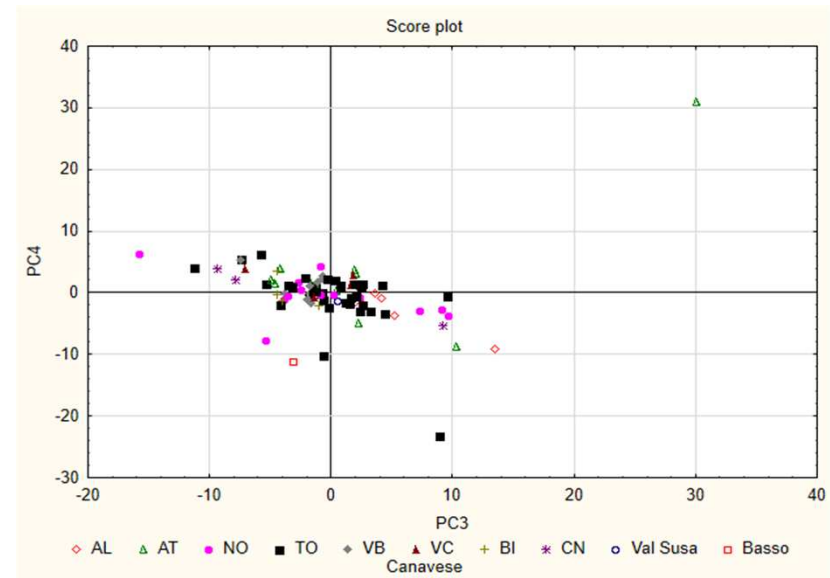


## Informazione sull'origine geografica

Score plot delle prime 4 PC: riporta i **campioni nello spazio delle PC**.  
Campioni identificati in base all'origine geografica

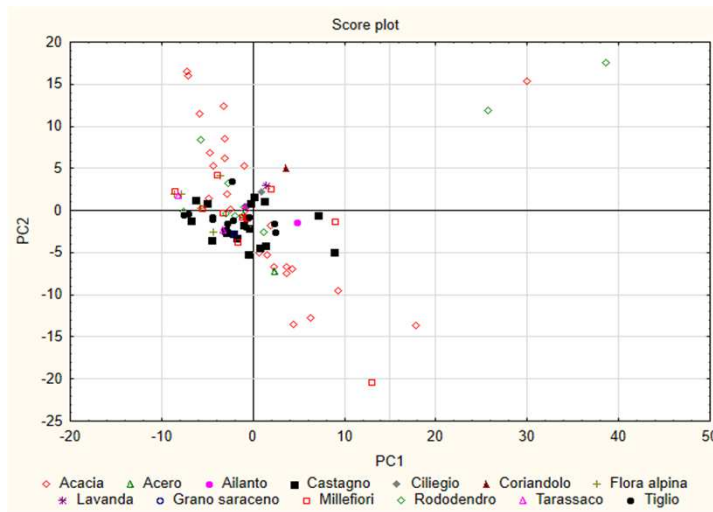


L'informazione sull'area geografica non appare chiaramente dalle prime 4 PC: gruppi non evidenti

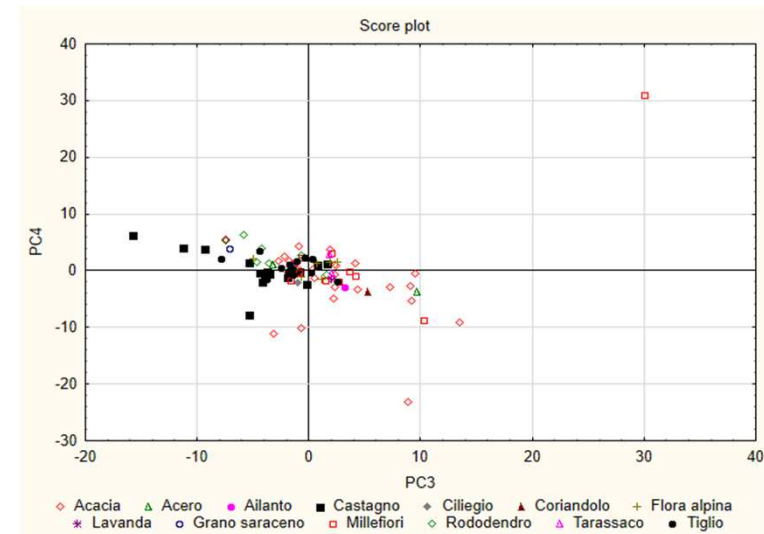


## Informazione sull'origine botanica

**Esempio 1** => Mieli da flora alpina dovrebbero essere clusterizzati non per l'origine botanica (indipendente da profilo elementare), ma perché provenienti da zone simili (simile profilo elementare).



Area geografica in parte confusa con origine botanica (alcune varietà caratteristiche di un'area geografica).



**Esempio 2** => I mieli di acacia potrebbero provenire da aree simili dal punto di vista della composizione del terreno.

## Partial Least Squares – Discriminant Analysis

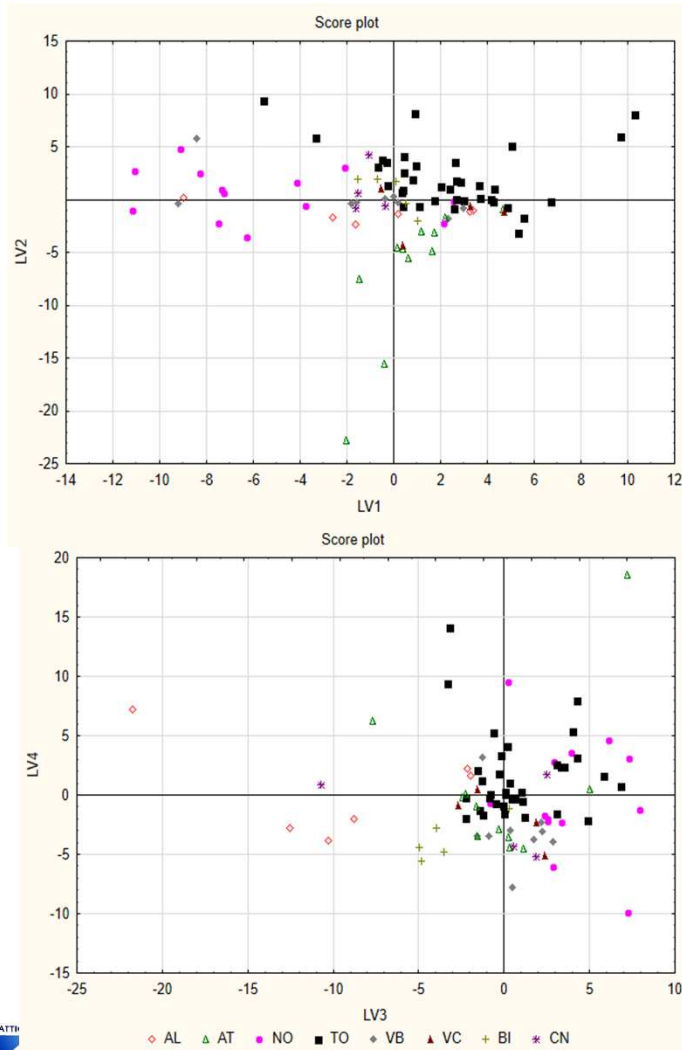
**(PLS-DA):** classificazione in base alla zona geografica

Per valutare la **possibilità di separare i campioni in base alla provincia di origine** si è applicato come metodo di **classificazione**: Partial Least Squares – Discriminant Analysis (PLS-DA), che produce variabili latenti simili alle PC.

Il metodo è stato applicato al dataset che include i campioni di 8 province (AL, AT, NO, TO, VB, VC, BI, CN).

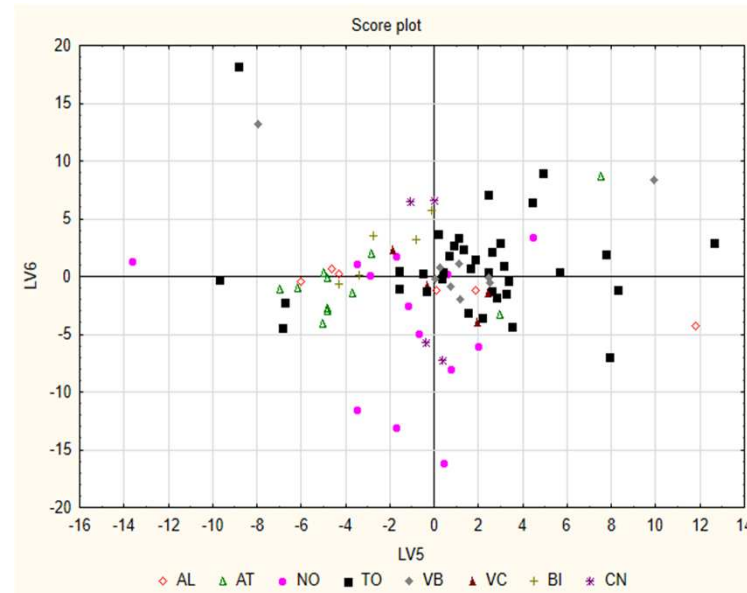
Il modello finale permette di classificare correttamente il **90% dei campioni**.





## Score plot

Campioni risultano abbastanza ben separati rispetto alla provincia di provenienza, soprattutto per quanto riguarda le province di AT, NO e TO).

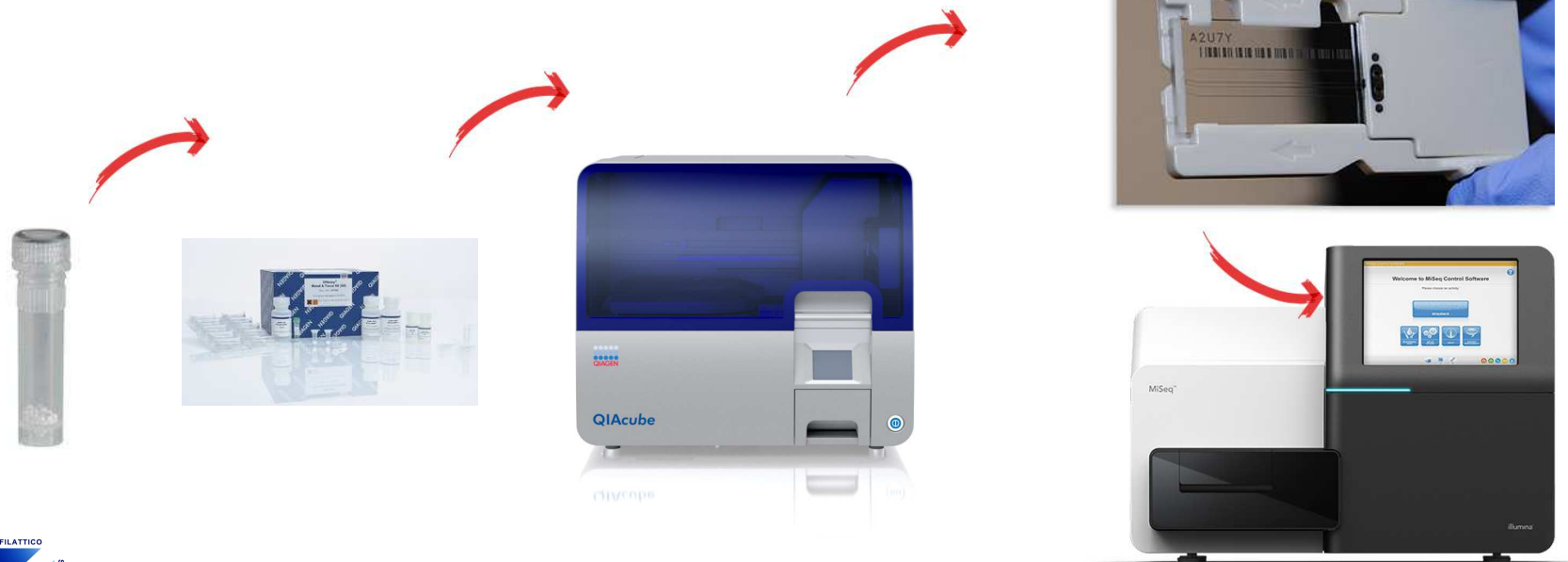


## Analisi chemiometriche su mieli piemontesi

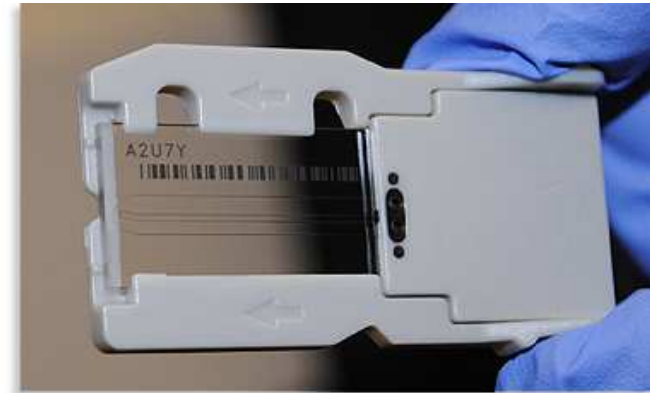
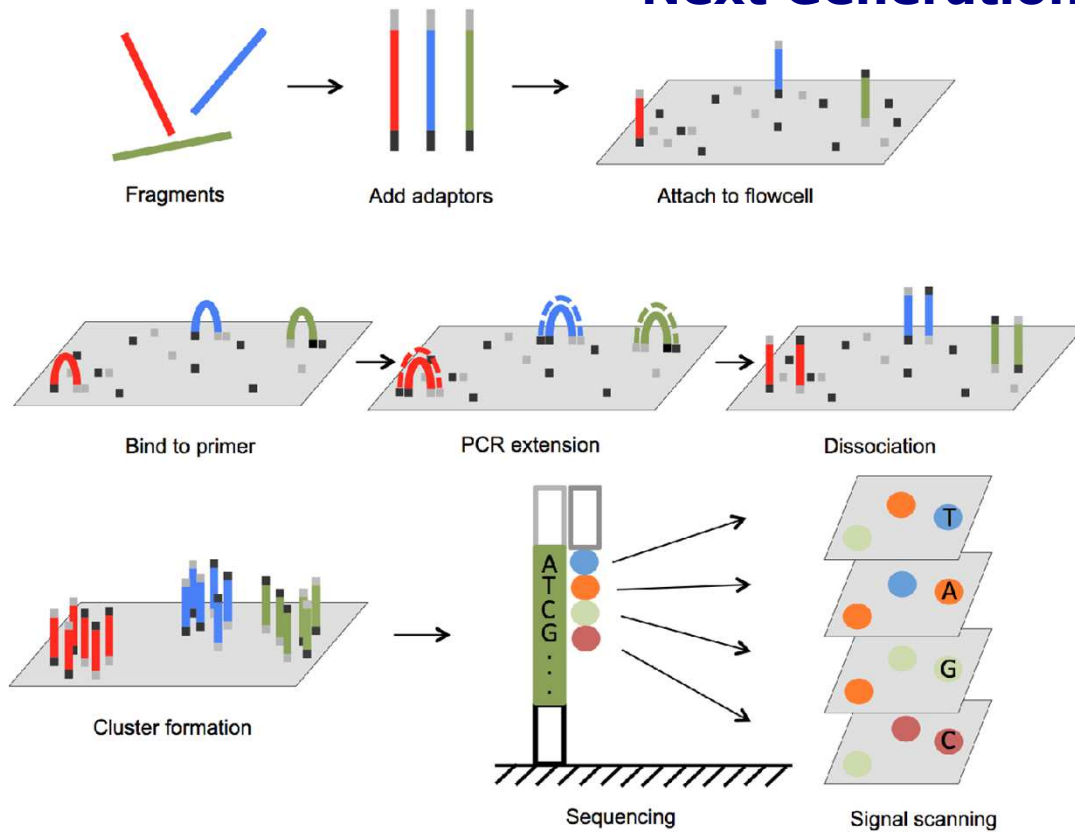
- L'analisi chemiometrica applicata ha permesso di identificare dei raggruppamenti tra i campioni dovuti sia all'origine geografica che a quella botanica.
- I dati chemiometrici hanno fatto rilevare che l'informazione sull'area geografica risulta parzialmente confusa con l'informazione circa l'origine botanica; questo effetto è da considerarsi normale in quanto alcune varietà botaniche sono anche caratteristiche di una certa area geografica.



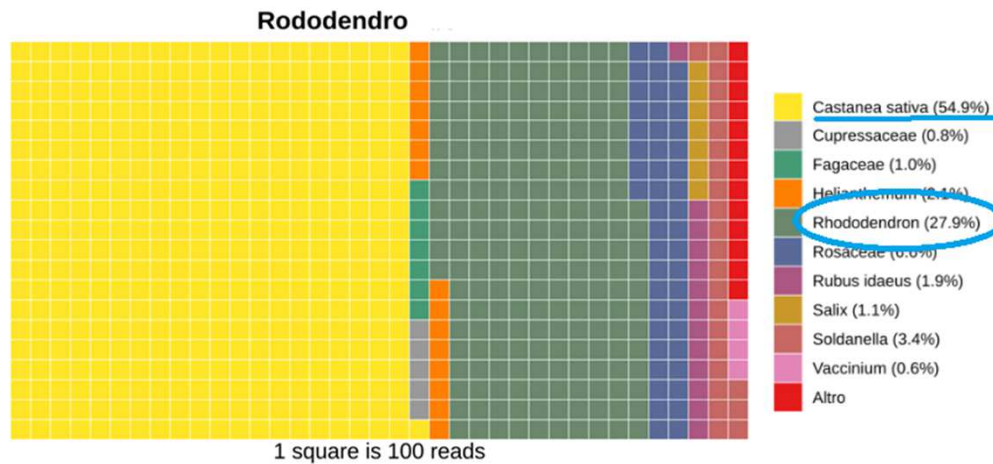
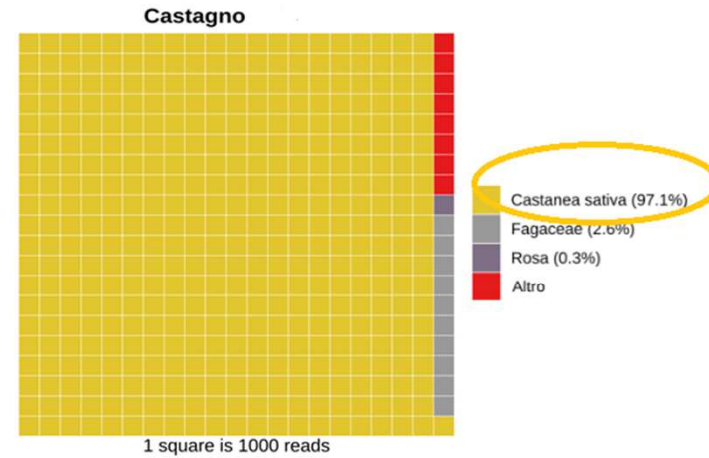
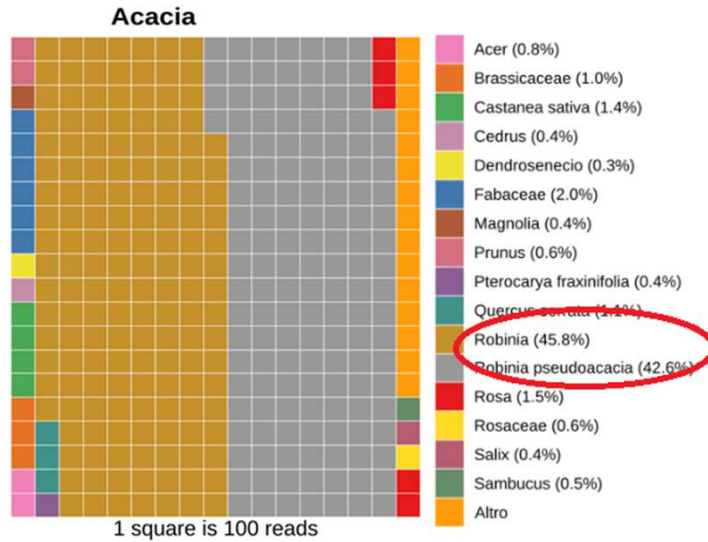
- Estrazione del DNA (polline) dal sedimento del miele
- Amplificazione del marcatore cloroplastico trnL e analisi NGS su MiSeq Illumina
- Analisi bioinformatica dei dati



## Next Generation Sequencing





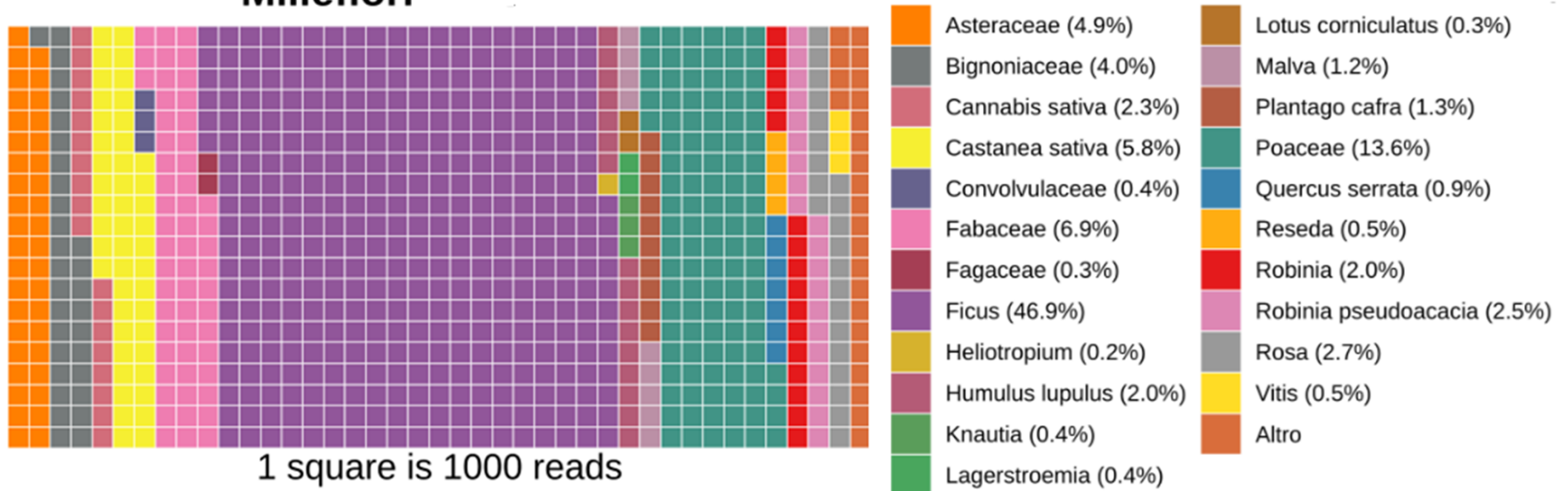


**Esempio di mieli  
monoflora**





## Millefiori

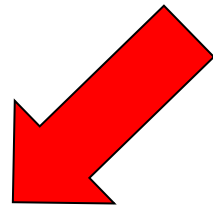


## Esempio di mieli multiflora

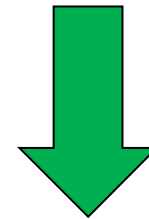


## Risultati analisi NGS

85 mieli monoflorali italiani



Assenza di reads  
corrispondenti alla  
specie/genere dichiarata in  
**16%** dei campioni



**84%** dei campioni con  
presenza di reads della  
specie/genere dichiarata in  
etichetta



## Risultati NGS

- ✓ Identificazione a livello di genere e specie per molti campioni
- ✓ Identificazione a livello di famiglia per i mieli di sulla, coriandolo, tarassaco, cardo, grano saraceno, eucalipto
- ✓ Identificazione a livello di ordine per il miele di lavanda

Le analisi NGS hanno permesso di identificare le specie vegetali a cui appartengono i granuli pollinici presenti nel miele, sia mono che multiflora





Food Control 128 (2021) 108175



**ELSEVIER**

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

**Food Control**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)



## Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding

Beltramo Chiara<sup>1</sup>, Cerutti Francesco<sup>1</sup>, Brusa Fulvio, Mogliotti Paola, Garrone Annalisa, Squadrone Stefania, Acutis Pier Luigi, Peletto Simone\*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Via Bologna 148, 10154, Turin, Italy*



**IZSTO**

Istituto Zooprofilattico  
Sperimentale del Piemonte  
Liguria e Valle d'Aosta

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta



**Grazie!**



**"XI CONVEGNO DEL CENTRO APISTICO REGIONALE. Asti, 28 ottobre 2021**

