



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

Tè rooibos fermentato e non: confronto del contenuto di solidi solubili, Fe e Al tra diversi tipi di infusione.

Fermented and non-fermented rooibos tea: comparison of the content of soluble solids, Fe and Al between different types of brews.

Tesi di Laurea Magistrale

Relatore

Chiar.mo Prof. Cristina Truzzi

Sessione Estiva

Anno Accademico 2019/2020

Indice

1.	INTRODUZIONE.....	1
1.1	Storia ed evoluzione del Rooibos	5
1.2	Rooibos: coltivazione, raccolta e lavorazione	8
1.3	Rooibos verde e composti fenolici.....	11
1.4	Estratti del Rooibos per applicazioni alimentari e nutraceutiche.....	17
1.5	Qualità del Rooibos	19
1.6	Metalli negli alimenti.....	22
1.6.1	Alluminio	26
1.6.2	Ferro.....	31
1.7	Metalli nel tè ed infusi	34
2	SCOPO DELLA TESI.....	42
3	MATERIALI E METODI.....	44
3.1	Campioni di Rooibos.....	44
3.2	Preparazione delle infusioni.....	45
3.3	Strumentazioni	49
3.3.1	Laboratorio.....	49
3.3.2	Reagenti e soluzioni standard	50
3.3.3	Digestione dei campioni.....	51
3.3.4	Determinazione del peso costante dei campioni.....	53
3.4	Metodologie analitiche	54
3.4.1	Spettrofotometria di assorbimento atomico	54
3.4.2	Assorbimento atomico e concentrazione	57
3.4.3	Strumentazione.....	58
3.4.4	Bianco strumentale	66
3.4.5	Analisi gravimetrica.....	66
3.4.6	Determinazione dei solidi solubili	68
3.5	Analisi statistica.....	69
4	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	70
4.1	Risultati.....	70
4.1.1	Ferro.....	70
4.1.2	Alluminio	77
4.1.3	Solidi solubili	83
4.2	Discussione.....	89
4.2.1	Ferro.....	89
4.2.2	Alluminio	92
4.2.3	Solidi Solubili	93
4.2.4	Confronto con i dati in letteratura	96

5	CONCLUSIONI.....	98
6	BIBLIOGRAFIA.....	100

1. INTRODUZIONE

Il Rooibos (*Aspalathus linearis*, Fabaceae, Tribù Crotalarieae) (Fig.1) è un arbusto legnoso e aghiforme endemico delle zone occidentali di Città del Capo in Sudafrica, che si estende a partire dall'area a nord di Città del Capo sino a Nieuwoudtville (Fig.2).



Figura 1 Campo di rooibos.

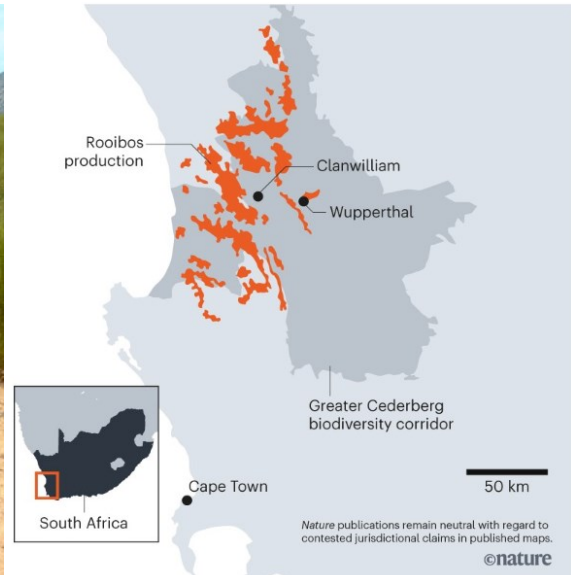


Figura 2 Area di coltivazione del rooibos.

Il nome “Rooibos” deriva dall’Afrikaans, la lingua parlata dai coloni provenienti dall’Olanda, e significa “arbusto rosso” ed è usato sia per descrivere il colore delle foglie lavorate sia il colore degli infusi preparati con le foglie essiccate della pianta.

Oggi è ampiamente coltivato per la produzione dell’omonimo tè, ben noto ai consumatori di tisane di ogni età in tutto il mondo.

Il rooibos è una delle 270 specie del genere *Aspalathus* (Dahlgren, 1968). La seconda parte del suo nome - *linearis* - si riferisce alla forma delle foglie aghiformi della pianta. Le radici della pianta si estendono per due metri o più sotto la superficie per raggiungere l'acqua, il che aiuta la pianta a sopravvivere nelle condizioni generalmente aride della regione. La pianta richiede precipitazioni invernali e la sua crescita attiva

inizia nella prima parte dell'estate e aumenta verso la metà. (J. F. Morton, 1983) Fattori come umidità, disponibilità d'acqua, temperatura dell'aria, angolo di pendenza, terreno sabbioso grossolano e latitudine svolgono tutti ruoli importanti nel ciclo di vita della pianta. Simile ad un arbusto, il rooibos ha uno stelo principale centrale e liscio che si suddivide in una serie di rami robusti vicino al suolo. Questi sono collegati a rami delicati che portano foglie morbide e aghiformi lunghe fino a dieci millimetri. Lasciati crescere nel suo ambiente naturale, i rooibos raggiungono un'altezza fino a 1.5 metri. Le piante coltivate possono variare da 0.5 a 1.5 metri, a seconda della loro età, del clima e delle condizioni del suolo. Le foglie strette hanno un'area superficiale molto limitata, il che riduce al minimo la perdita di umidità nelle giornate calde. La pianta ha una durata media di 6 anni e fornisce in media 4 raccolti. È buona pratica agricola concedere un periodo di riposo di 2-3 anni prima di ripiantare i campi. In un ciclo completo (periodo di crescita più periodo di rotazione) la resa media della vita della pianta è di 1.800 kg/ha (SARC, 2019).

Il più utilizzato a livello commerciale è il cosiddetto tipo rosso, o Rocklands (Fig.3). È una forma non germogliata e densamente ramificata con fiori gialli e foglie verdi brillanti, che diventano di un intenso rosso-marrone dopo la "fermentazione" (in realtà si tratta di un'ossidazione enzimatica seguita da un'ossidazione chimica).



Figura 3 Particolare di rooibos Rocklands

Oltre il 90% del prodotto commerciale è attualmente realizzato con questa forma coltivata, ma un tempo, per produzioni su piccola scala, si usavano diverse forme wild-type (o aggiunte al tipo rosso per migliorare il processo di fermentazione e/o il sapore) (Malgas et al., 2010).

Altri tipi di Rooibos come il rosso-marrone, il grigio e il nero erano coltivati e raccolti in passato, ma, a causa della loro imprevedibile e scadente qualità, il loro uso è stato interrotto nel 1966 (Joubert et al., 2008).

La crescente domanda ha portato nel corso degli anni all'enorme espansione dell'industria del tè Rooibos (Joubert e De Beer, 2011) e alla protezione dell'indicazione geografica (GI), che viene assegnata solo ai prodotti in possesso di qualità attribuibili a un particolare luogo di origine (Anonymous, 2014). Pertanto, il nome "Rooibos" e tutti gli altri nomi correlati ad esso (ad es. "cespuglio rosso", "rooitee", ecc.) sono protetti e appartengono esclusivamente all'industria sudafricana.

Lo status di GI ha portato alla crescita economica e allo sviluppo sociale nelle regioni di produzione del rooibos (Dahlgren, 1968).

L'arbusto è proprio parte dell'identità sudafricana, quindi il Consiglio Sudafricano del Rooibos, S.A.R.C.¹ e l'industria dei rooibos hanno difeso la registrazione dei rooibos come GI per i seguenti motivi:

- La registrazione GI aiuta a proteggere il nome da abusi e imitazioni, consentendo a tutti coloro che sono coinvolti nell'industria dei rooibos nella regione, dagli agricoltori agli esportatori, di usarlo senza timore di controversie nei mercati esteri;

¹ Il Consiglio sudafricano del Rooibos (The South African Rooibos Council, SARC) è un'organizzazione indipendente, che rappresenta i trasformatori, gli imballatori e i marchi di rooibos. La sua missione è promuovere responsabilmente i rooibos e i suoi attributi e proteggere gli interessi dei consumatori e delle parti interessate del settore.

- Poiché la GI collega un'area a un prodotto, è un potente strumento di marketing per la regione e può essere utilizzato per promuovere altre attività come il turismo;
- Il rooibos è prodotto in un fragile ecosistema e la registrazione della GI contribuisce a proteggere la biodiversità unica della regione.

Il tè Rooibos viene esportato in quantità significative nel mondo, dove rappresenta il 10% del mercato globale delle tisane (Anonymous, 2014). Circa 15.000 tonnellate di Rooibos vengono consumate a livello globale e i volumi delle esportazioni hanno raggiunto le oltre 7.000 tonnellate all'anno come si evince in Figura 4.

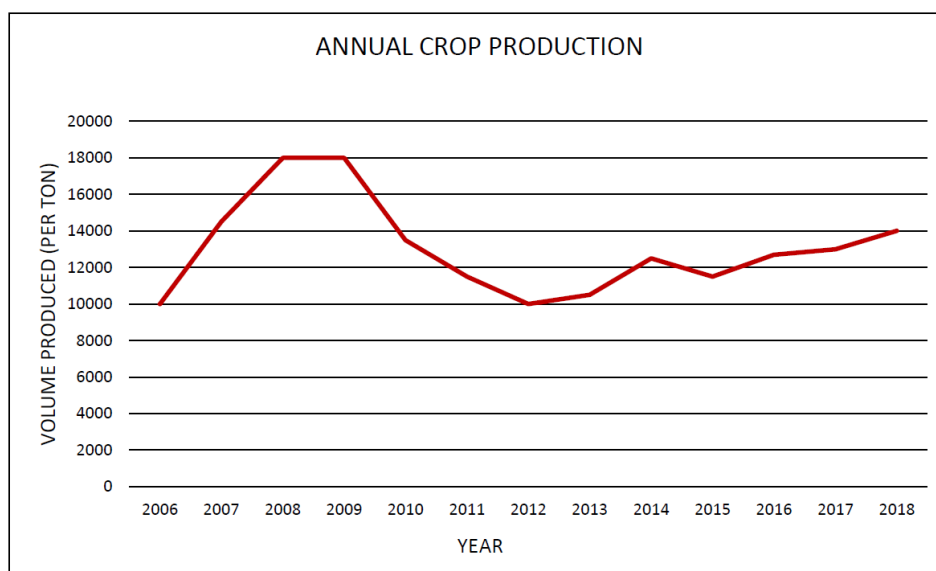


Figura 4 Andamento annuale della raccolta del rooibos in Sudafrica

Il mercato delle esportazioni continua a essere dominato dal Giappone (29.42%), seguono Germania (27.97%), i Paesi Bassi (11.24%), il Regno Unito (9.25%) e gli Stati Uniti d'America (5.27%). Il mercato di esportazione dei rooibos è cresciuto fino a includere altri paesi come lo Sri Lanka (2.55%), lo Zimbabwe (1.99%), Zambia (1.79%), Russia (1.33%) e Polonia (1.24%) (SARC, 2019) (Figura 5).

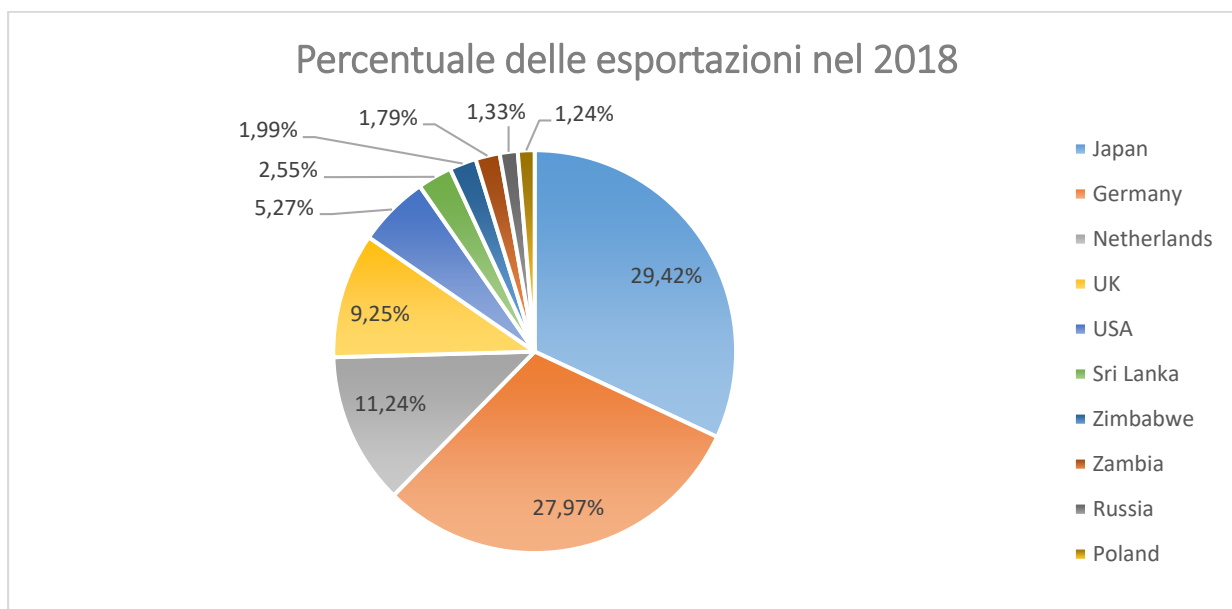


Figura 5 Percentuale delle esportazioni nel 2018

1.1 STORIA ED EVOLUZIONE DEL ROOIBOS

La bevanda prodotta con il rooibos è usata da secoli dalle popolazioni Khoi e San, i due principali gruppi etnici dell'Africa meridionale, che ne conoscono da sempre le proprietà.

I coloni olandesi del Sudafrica lo adottarono come alternativa economica al tè nero che doveva essere trasportato dalle navi provenienti dall'Europa. Tuttavia, fino al XIX secolo l'uso del tè da parte degli olandesi era minimo.

Nel 1904 Benjamin Ginsberg, un colono sudafricano di origine russa e appartenente a una famiglia di commercianti di tè, osservò che i discendenti dei Khoi lavoravano il materiale vegetale durante i caldi mesi estivi (Morton, 1983). Riducevano la pianta in piccoli pezzi con un'ascia, e, successivamente, mettevano le foglie e gli steli tagliati a seccare sopra le pietre (Joubert et al., 2008). Questo procedimento ha gettato le basi per il processo di produzione utilizzato fino ad oggi.

Ginsberg, così, intuì il potenziale del rooibos e iniziò a commerciare con le popolazioni Khoi e San che lo raccoglievano. Cominciò a vendere il suo "Tè della Montagna" ai coloni e divenne in breve il primo importatore di rooibos usando i contatti della sua famiglia. Negli anni Trenta Ginsberg convinse un medico locale a sperimentare la coltivazione della pianta. I tentativi furono fruttuosi e consentirono a Ginsberg di incoraggiare gli agricoltori locali ad avviare la coltivazione, con la speranza di ottenerne un buon profitto. Il primo tentativo di coltivazione su larga scala, tuttavia, fu un disastro a causa della piccola dimensione dei semi, difficili da raccogliere a mano. I botanici Mac Owan e Marloth, che si recarono in missione botanica nelle aree del Clanwilliam, Wupperthal, Gifberg e Cederberg tra il 1897 e il 1901, non menzionarono il rooibos (*A. linearis*) nelle loro recensioni sui medicinali utilizzati nella zona di Città del Capo (Van Wyk e Gorelik, 2017). Tuttavia, nel 1932 Watt & Breyer-Brandwijk documentarono per la prima volta l'utilizzo del rooibos come pianta medicinale, ma non hanno annotato nessun uso specifico (Joubert et al., 2008).

Il suo uso ha subito un'evoluzione nel tempo. Di fatto si è passati dall'uso del rooibos come fonte medicinale all'uso come fonte non medicinale, cioè come tisana consumata a scopo di piacere.

La situazione attuale, scaturita dall'aumento dei problemi di salute generati dall'invecchiamento della popolazione, ha visto l'aumento dei consumi dei cibi con proprietà medicinali (Joubert et al., 2008).

Il tè Rooibos è stato inizialmente considerato salutare, vista l'assenza della caffeina e il suo basso contenuto di tannini (Cheney e Scholtz, 1963). A ciò si deve aggiungere la scoperta fatta da Annetjie Theron, nel 1968, che ha rivelato la capacità degli infusi

di rooibos di curare l'irrequietezza cronica, il vomito e i crampi allo stomaco del suo bambino affetto da coliche croniche. La sua scoperta, di conseguenza, ha suscitato un interesse maggiore da parte dei consumatori (Joubert et al., 2008). Da allora a molti bambini è stato dato il rooibos o come aggiunta nel latte o come infuso leggero. Ciò ha portato alla commercializzazione del rooibos con un'etichetta specifica per i bambini, denominata "Rooibos baby".

Oltre al suo uso convenzionale come infuso a base di erbe, gli estratti del rooibos sono stati successivamente utilizzati per la produzione di una gamma di prodotti cosmetici sotto il marchio *Annique* (Morton, 1983). Si ritiene che le applicazioni di cosmetici a base di rooibos trattino problemi dermatologici come la dermatite da pannolino, l'acne e l'eczema (Joubert et al., 2008).

Il rooibos è anche commercializzato come rimedio per vari disturbi, con diversi aneddoti che suggeriscono la sua efficacia nel ridurre la tensione nervosa, il bruciore di stomaco e la nausea. Inoltre, è di aiuto per la digestione e stimolante dell'appetito, ed è persino un rimedio per il sonno a causa di un lieve effetto sedativo (Joubert e De Beer, 2011).

Negli ultimi anni è emerso che le caratteristiche benefiche del rooibos per la salute sono da attribuire al suo contenuto fenolico. Ha proprietà quali antiossidante, antitumorale, antidiabetico, epatoprotettivo e antinfiammatorio. Inoltre, sono stati studiati a fondo i presunti benefici come anti-invecchiamento, antimicrobico, immunoprotettivo e antiemolitico (Joubert et al., 2008) (Joubert e De Beer, 2011).

È stato dimostrato, inoltre, che l'aspatina (il principale composto fenolico nel tè Rooibos), ha la capacità di migliorare l'assorbimento di glucosio *in vitro* e *in vivo* (Muller et al., 2012) (Son et al., 2013).

Un recente articolo di Miller (Miller et al., 2017) ha evidenziato una maggiore estrazione dell'aspatina in estratti acquosi di rooibos verde.

Secondo Marnewick (Marnewick et al., 2011), il consumo giornaliero di sei tazze di rooibos tradizionale ha il potenziale di migliorare il profilo lipidico e lo stato redox, entrambi rilevanti per le malattie cardiache, negli adulti a rischio di sviluppare la patologia per malattie cardiovascolari. Pertanto, gli estratti che hanno la capacità di fornire l'equivalente di sei tazze di rooibos ora sono diventati uno standard di riferimento nell'industria, in quanto sono collegati alla quantità percepita come efficace sulla salute e sulle patologie (Joubert e de Beer, 2012).

1.2 ROOIBOS: COLTIVAZIONE, RACCOLTA E LAVORAZIONE

La fragranza e gli aromi della versione tradizionale del tè rooibos hanno guadagnato notorietà mondiale nel corso degli anni.

La maggior parte dei Rooibos sul mercato locale è disponibile in forma di bustina di tè anziché in foglie sfuse, in gran parte questo è dovuto al fatto che è conveniente e facile da smaltire.

La raccolta della pianta rooibos avviene durante i caldi mesi estivi e l'inizio dell'autunno, di solito da gennaio ad aprile (Cheyney e Scholz, 1963). Non viene raccolto durante la primavera poiché, a causa della presenza dei fiori, il tè risulta debole, delicato e di bassa qualità (Joubert et al., 2008).

Durante il raccolto, il cespuglio viene prelevato ad un'altezza di circa 45 cm o appena sopra il livello del raccolto precedente.

La lavorazione del materiale vegetale, presso le aziende agricole, comporta i seguenti passaggi base: i giovani steli e le foglie aghiformi della pianta vengono tagliati in sezioni lunghe 2-3 mm, dopodiché vengono spellati, inumiditi e messi in “sacchi di fermentazione”. Infine, vengono stesi su una superficie piana per completare la “fermentazione” e seccare.

Il caratteristico colore rosso-marrone del Rooibos è il risultato della "fermentazione" (ossidazione), che contribuisce allo sviluppo del sapore e aroma unici del Rooibos (Joubert e De Beer, 2011).

Spellare e inumidire il materiale vegetale coadiuva il rilascio dei polifenoli insieme allo sviluppo del colore che garantisce l'uniformità del prodotto. Inoltre, un'adeguata aerazione, effettuata rigirando più volte il materiale vegetale, è necessaria in modo che possa verificarsi un'ossidazione uniforme attraverso i cumuli di materiale vegetale.

Un'insufficiente aerazione si traduce in un prodotto di bassa qualità a causa della “sotto-fermentazione” (Joubert, 2007).

Il processo di “fermentazione” (ossidazione) viene condotto, di solito durante la notte, ad una temperatura compresa tra i 38°C e 42°C per 12/14 ore (Joubert e Schulz, 2006). Tuttavia, fattori come l'età dell'arbusto, la crescita dei giovani getti e l'area di coltivazione possono influire sui tempi di fermentazione in modo tale che possano variare da 8 a 24 ore (Joubert, 1994).

Come visto precedentemente, dopo il periodo di fermentazione, i cumuli di Rooibos vengono stesi al sole, in strati sottili, per asciugare. A seconda del meteo, l'asciugatura può richiedere fino a 24 ore che, a volte, porta a tè di bassa qualità.

Dopo l'essiccazione, il rooibos fermentato viene setacciato, classificato e pastorizzato tramite vapore prima di essere confezionato per lo più sfuso.

Poiché il materiale vegetale, raccolto da vari lotti, viene solitamente combinato insieme per la standardizzazione della qualità del prodotto, la possibilità di introduzione di contaminazione è aumentata. Quando il rooibos viene fermentato, perciò, esistono le condizioni ideali per la crescita dei batteri. Pertanto, la contaminazione microbica è inevitabile e la pastorizzazione a vapore a 99.5°C per 2 minuti, prima dell'imballaggio, ha mostrato una riduzione del carico microbico a livelli tollerabili (Du Plessis e Roos, 1986). Dopo la pastorizzazione a vapore è necessario un ulteriore passaggio di essiccamento per ridurre il contenuto di umidità al 10% o meno, in conformità con il regolamento ufficiale relativo agli standard di qualità del rooibos del Sud Africa.

Pertanto, il tè rooibos lavorato è un prodotto che, se ben conservato, grazie al suo basso contenuto di umidità finale risulta essere microbiologicamente sicuro (Joubert e De Beer, 2011). Prove aneddotiche evidenziano che la pastorizzazione a vapore ha cambiato l'aroma di una tazza di tè rooibos. Koch (Koch et al., 2013) ha dimostrato che la pastorizzazione a vapore dei rooibos ha determinato una diminuzione dell'intensità dell'aroma e del sapore, oltre che una diminuzione dei solidi solubili, dei polifenoli totali, del contenuto di aspalatina e del "colore totale" delle infusioni.

1.3 ROOIBOS VERDE E COMPOSTI FENOLICI

Il rooibos è costituito da una serie di composti responsabili del colore caratteristico, del sapore, dell'aroma e delle proprietà funzionali. Numerosi ricercatori hanno ampiamente studiato la sua composizione chimica, nonché i cambiamenti che si verificano nel profilo chimico durante la “fermentazione”. La particolarità del tè rooibos è attribuita alla presenza di due composti fenolici noti come aspalatina, un glucoside C-C diidrocalcone (Koeppen & Roux, 1965) e la aspalalinina ciclica diidrocalcone (Shimamura, 2006).

Un altro composto raro che si trova nel rooibos è la notofagina, che è un 3-deidrossi diidrocalcone glucoside. In precedenza, era stato identificato solo in altre due specie, *Nothofagus fusca* e *Schoepfia chinensis* (Huang et al., 2008)

Ulteriori composti fenolici importanti trovati nei rooibos includono flavoni (orientina, isoorientina, vitexina isovitexina, luteolina, crisoeriolo), flavanoni (diidro-orientina, diidro-isoorientina, emiflorina) e flavonoli (quercetina, iperoside, isoquercitrina, rutina) (Shimamura, 2006). Altri composti che sono stati identificati includono acidi fenolici, lignani, flavone diglicosidi, (+) - catechina, un acido glucoside fenilpiruvico, il flavonolo quercetina-3-O-robinobioside e cumarine, esculetina ed esculina (Figura 6). Joubert et al. (2012) hanno fornito il primo rapporto costituito da dati quantitativi rappresentanti i composti fenolici monomerici rilevabili nelle infusioni di rooibos a livello di “tazza di tè”: aspalatina, orientina, isoorientina e quercetina-3-O-robinobioside (flavonoidi) nonché Z-2-(β -D-glucopiranosilossi)-3-acido fenilpropenoico (PPAG), un acido fenilpropenoico (presente in quantità > 5 mg/L); vitexina, isovitexina e iperoside (quercetin-3-O-galactoside) altri composti rilevati a

livelli > 2 mg/L; notofagina, isoquercitrina (quercetin-3-O-glucoside), rutina (quercetin-3-O-rutinoside) e acido ferulico presenti in quantità > 0.9 mg/L. Più recentemente sono stati identificati da Walters et al. (2017) tre composti precedentemente segnalati in *Cyclopia* spp (honeybush), vale a dire il diidrocalcone cloretina-3', il 5'-di-C-β-D-glucopiranoside, il flavanone esperidina e il flavone scolymoside.

Secondo Joubert (1996), le quantità di aspalatina e notofagina presenti nel tè rooibos di solito dipendono dal grado di ossidazione del materiale vegetale. Oltre ai benefici per la salute, che sono collegati al contenuto fenolico del tè rooibos (Joubert et al, 2008), la presenza di composti fenolici è vitale per il gusto e l'aroma (Koch et al., 2013).

Il gusto "dolce" delle infusioni di rooibos è stato associato al PPAG, Z-2-(β-D-glucopiranosilossi) -3-acido fenilpropenoico (Koch et al., 2012), ma quando è stato testato come composto puro è stato percepito come "amaro", suggerendo che la modulazione del gusto si è verificata quando era presente in infusione (Joubert et al., 2013). Inoltre, quando testato in acqua, il gusto "amaro" è stato precedentemente associato alla rutina e all'isoquercitrina.

L'aspalatina, la cui presenza fino ad oggi risulterebbe essere provata unicamente nella pianta di Rooibos, ha manifestato un maggior potere antiossidante rispetto a tutti i polifenoli flavonici presenti nel fitocomplesso. Inoltre, Krafczyk et al. (2008) hanno accertato che l'aspalatina, tra gli altri composti, è in parte responsabile dell'imbrunimento che si verifica durante l'ossidazione. Gli enzimi, tuttavia, erano considerati responsabili dell'inizio del cambiamento di colore durante l'ossidazione. È

stato suggerito da Joubert & De Villiers (1997) che l'ossidazione delle foglie di rooibos, che provoca la rapida formazione del caratteristico colore rosso-marrone, era causata, in effetti, dagli enzimi.

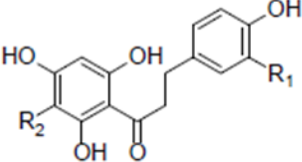
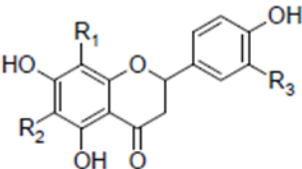
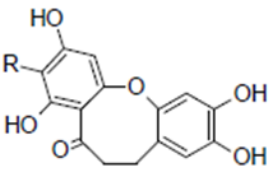
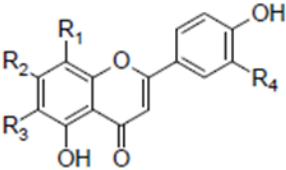
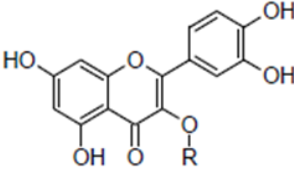
General structure	Compound type, names and substituents
	<p>Dihydrochalcones</p> <p>Aspalathin: R₁ = OH, R₂ = β-D-glucopyranosyl Nothofagin: R₁ = H, R₂ = β-D-glucopyranosyl</p>
	<p>Flavanones</p> <p>Hemiphlorin: R₁ = β-D-glucopyranosyl, R₂ = R₃ = H (R)/(S)-eriodictyol-8-C-glucoside: R₁ = β-D-glucopyranosyl, R₂ = H, R₃ = OH (R)/(S)-eriodictyol-6-C-glucoside: R₁ = H, R₂ = β-D-glucopyranosyl, R₃ = OH</p>
	<p>Cyclic dihydrochalcone</p> <p>Aspalalinin: R = β-D-glucopyranosyl</p>
	<p>Flavones</p> <p>Orientin: R₁ = β-D-glucopyranosyl, R₂ = R₄ = OH, R₃ = H Iso-orientin: R₁ = H, R₂ = R₄ = OH, R₃ = β-D-glucopyranosyl Vitexin: R₁ = β-D-glucopyranosyl, R₂ = OH, R₃ = R₄ = H Isovitexin: R₁ = R₄ = H, R₂ = OH, R₃ = β-D-glucopyranosyl Luteolin: R₁ = R₃ = H, R₂ = R₄ = OH Luteolin-7-O-glucoside: R₁ = R₃ = H, R₂ = β-D-glucopyranosyloxy, R₄ = OH Chrysoeriol: R₁ = R₃ = H, R₂ = OH, R₄ = OCH₃</p>
	<p>Flavonols</p> <p>Quercetin: R = H Isoquercitrin: R = β-D-glucopyranosyloxy Hyperoside: R = β-D-pyranosyloxy Rutin: R = α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyloxy Quercetin-3-O-robinoside: R = α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranosyloxy</p>

Figura 6 Principali composti fenolici identificati in *A. linearis* fermentato (Joubert et al., 2008)

Questa tesi è ulteriormente supportata dal fatto che il trattamento del rooibos verde (non “fermentato”) con vapore inattiva gli enzimi, mantenendo così il suo colore verde. Tuttavia, Krafczyk et al. (2008) hanno concluso che le reazioni di imbrunimento, che si verificano durante l'ossidazione, erano non enzimatiche.

Sono stati sviluppati e utilizzati vari metodi di cromatografia liquida ad alte prestazioni per la quantificazione dei composti fenolici nei rooibos. Di recente, Walters et al. (2017) hanno sviluppato un metodo incentrato ad analizzare i cambiamenti dei composti fenolici durante l'ossidazione. Questo metodo, in un tempo ragionevole, mirava a quantificare ulteriormente i composti come isomeri eriodictyolglucopyranoside. Ad oggi questi composti non sono stati quantificati nel materiale vegetale a causa di problemi di separazione. Il rooibos è considerato una bevanda a basso contenuto di tannini nonostante siano stati identificati in passato proantocianidine. Tuttavia, sono disponibili informazioni limitate sulla struttura dei tannini nel tè rooibos (Joubert e De Beer, 2011).

Sono disponibili pochissime informazioni anche sul contenuto minerale del rooibos e delle sue infusioni. Touyz e Smit (1982) hanno mostrato che un'infusione di rooibos “fermentato” contiene 1.29 µg/mL di fluoruro. È interessante notare che Joubert et al. (2008) hanno mostrato per gli infusi un contenuto di sodio relativamente alto, pari a 43.33 µg/mL, seguito da tracce di potassio, magnesio, calcio, fosforo, ferro e alluminio.

Composti volatili, costituiti da chetoni, aldeidi, alcoli, esteri, idrocarburi, fenoli ed eteri, contribuiscono al caratteristico aroma e sapore dei rooibos. Esempi di

componenti volatili che sono stati identificati includono prodotti di decomposizione del β -carotene, cioè β damascenone e β -ionone (Kawakami et al., 1993), che sono presenti in concentrazioni relativamente alte.

Inoltre, altri principali composti volatili che sono stati trovati nei rooibos “fermentati” includono guaicol, diidroattinidiolide, 5,6-epossi- β -ionone, 6-metil-3,5-eptadien-2-one, alcool β -feniletilico, benzaldeide, 2-feniletanolo, geranilacetone e 6-metil-5-epten-2-one (Kawakami et al., 1993).

Il profilo aromatico di questi composti è riportato nella successiva Figura 7. Composti come cis-3-hexenal e trans-3-hexenal, che sono associati all'aroma verde/erboso, erano presenti anche nella frazione volatile. Se analizzati singolarmente, nessuno di questi composti rappresenta l'aroma "caratteristico" completo del tè rooibos. Una combinazione di composti volatili è di solito usata per spiegare l'aroma dei prodotti alimentari.

Chemical compound	Aroma
Guaicol	Woody Smokey ^a
β -damascenone	Floral, violet ^b
Dihydroactinidiolide	Sweet, tea-like odor ^a
β -ionone	Rose-like ^a
5,6-epoxy-ionone	Fruity, floral ^a
6-methyl-3,5-heptadien-2-one	Spicy ^b
β -phenylethyl alcohol	Floral, rose/dried rose ^b
Benzaldehyde	Almond ^a

^aHabu et al., 1985; ^b Kawakami et al., 1993

Figura 7 I profili aromatici dei composti chimici trovati nelle infusioni di rooibos.

Il rooibos “fermentato” è notoriamente caratterizzato da un leggero sapore dolce e con aroma di miele, note legnose ed erbacee, a differenza della versione “non fermentata” che ha un aroma e un sapore prevalentemente erbaceo (Fig. 8).

Il rooibos verde (non ossidato) è un prodotto relativamente nuovo, sviluppato per capitalizzare le opportunità di mercato degli antiossidanti (Joubert e De Beer, Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical 2011).



Figura 8 Rooibos Verde e Rosso

Molta enfasi è stata posta sul potenziale ruolo del maggior antiossidante del rooibos e diidrocalcone, l’aspatina, nella prevenzione della sindrome metabolica (Dludla et al., 2018).

Diversi studi hanno anche dimostrato come la capacità antiossidante e il contenuto di polifenoli dei rooibos sono influenzati da diversi tempi di preparazione (1–10 min), temperature (65–100°C), aggiunte domestiche (zucchero, latte, miele) e tipologia (materiale vegetale sfuso o insaccato o estratti in polvere).

Questo aspetto è particolarmente importante se si considera che i rooibos stanno diventando estremamente popolari in Estremo Oriente, specialmente in Giappone, una delle più grandi nazioni di bevitori di tè al mondo. Le esportazioni di rooibos verso questo paese hanno raggiunto livelli record nel 2018. In Giappone, il tè rooibos è

comunemente preparato sia con infusione a caldo sia con infusione a freddo. La preparazione a freddo implica l'infusione del materiale vegetale in acqua a temperatura ambiente (o fredda) e non in acqua bollente. Le ragioni fornite per la crescente popolarità dei rooibos preparati a freddo sono da ricercare nella convenienza della preparazione, nella percezione di un profilo aromatico “più leggero”, “più fresco”, “più dolce” e nel fatto che i composti bioattivi non vengano alterati.

L'obiettivo della ricerca è diventato la produzione di estratti standardizzati, contenenti un alto livello di questo composto per uso nutraceutico.

1.4 ESTRATTI DEL ROOIBOS PER APPLICAZIONI ALIMENTARI E NUTRACEUTICHE

Lo sviluppo di un tè rooibos "istantaneo" in polvere ha avuto luogo negli anni '80 ed ha fornito al consumatore una forma più conveniente di rooibos, poiché, prima, il processo di preparazione di una tazza di tè richiedeva molto tempo.

Tuttavia, è stato solo nel 2000 che in Sudafrica è stato preso seriamente in considerazione il concetto di produzione di rooibos solubile per la preparazione di estratti in polvere per i mercati di bevande, alimenti e integratori alimentari.

La maggior parte degli estratti di rooibos prodotti su base annuale viene preparato con rooibos fermentati e può essere personalizzato per adattarsi a diverse applicazioni (Joubert e De Beer, 2011).

I rooibos verdi o non fermentati, prodotti per la prima volta su base sperimentale negli anni '90 per ottenere un prodotto con livelli di antiossidanti più elevati (Von Gadow et al., 1997), sono stati commercializzati come tisana e per la preparazione di estratti (Joubert e de Beer, 2012).

In conclusione, l'aggiunta di estratti di rooibos (fermentato o non) ai prodotti alimentari fornisce non solo il sapore caratteristico del rooibos, ma anche un buon apporto di polifenoli che può potenzialmente contribuire agli effetti salutari del prodotto. Molti prodotti derivati dal rooibos sono attualmente disponibili sul mercato.

Le tisane sono disponibili in vari gusti (come miele, limone, ribes nero e vaniglia) e miscele di tè (ad es. honeybush, finocchio e buchu²) di diverse marche sudafricane e non.

Si è sviluppato a livello locale e globale anche un mercato per i rooibos verdi non fermentati (sebbene ancora di dimensioni ridotte), grazie alla maggiore attività antiossidante di questo prodotto e ai benefici per la salute associati al suo consumo. Inoltre, l'industria dei rooibos ha recentemente visto l'uso degli estratti come ingrediente nella produzione di pane integrale, che è promossa per il suo alto contenuto di antiossidanti ed è commercializzata come prodotto salutare.

Il rooibos non fermentato è stato utilizzato anche nel processo di produzione di una gamma di vini senza solfiti, di un'innovativa birra artigianale di nicchia e di pane integrale.

Altri prodotti derivati dal rooibos sono prodotti dimagranti e cosmetici, integratori alimentari, cappuccino istantaneo, yogurt aromatizzato al rooibos e cereali per la colazione (Joubert e De Beer, 2011).

² In lingua khoekhoe, il termine “buchu” si riferisce a erbe profumate (o a polveri e infusi ricavati da queste erbe) del genere *Agathosma*. In inglese e in altre lingue si usa la parola “buchu” per riferirsi a due specie, l’A. betulina (il buchu a foglia rotonda) e l’A. crenulata (il buchu a foglia ovale). Entrambe sono arbusti perenni e sempreverdi che crescono fino a circa 2 metri di altezza.

1.5 QUALITÀ DEL ROOIBOS

Al fine di ottenere un'efficace standardizzazione e commercializzazione dei prodotti alimentari attraverso il miglioramento del controllo, che si traduce in soddisfazione del cliente, vengono istituiti sistemi di classificazione. Lo sviluppo di tali sistemi comporta l'identificazione, la definizione e la misurazione di parametri di qualità. Tuttavia, l'efficacia della misurazione dei parametri dipende fortemente dalla semplicità della misurazione, dal tempo, dalla convalida scientifica e dalla correlazione con il modo in cui i consumatori percepirebbero la qualità del prodotto (Feria-Morales, 2002). Questi principi sono applicabili a molti prodotti, inclusi i rooibos.

La classificazione della qualità dei rooibos ha subito molti cambiamenti nel corso degli anni, allo scopo di migliorarla (Joubert, 1994). Durante i primi anni della produzione di rooibos, i tentativi di classificazione di qualità erano soggettivi e suddivisi in sei gradi in base all'aroma, al taglio e al colore delle foglie e degli steli di rooibos essiccati. Nel 1965 fu introdotto un sistema di setacciatura meccanica per classificare i rooibos in base alla lunghezza del taglio. Solo a partire dal 1985 fu presa in considerazione la valutazione delle infusioni in termini di gusto, aroma e colore, che si tradusse in ulteriori gradi di qualità, vale a dire "Super", "Choice" e "Standard" (Joubert, 1994). Piccoli cambiamenti furono fatti nel corso degli anni e nel 1992 il grado di qualità "Selected" è stato aggiunto alla classificazione. Successivamente, sono state introdotte tre categorie di tè rooibos (A, B, C) per raggruppare il tè in base alle caratteristiche tipiche di gusto e aroma: forte, media e scarsa. Inoltre, le particelle sono state separate in base alla loro dimensione di taglio, grossolane e fini, per l'utilizzo in bustine di tè o confezioni di tè sfuse.

Con l'abolizione del sistema di marketing ad un canale, e quindi del Rooibos Tea Control Board, le aziende di trasformazione hanno iniziato ad utilizzare le proprie procedure standard per la valutazione sensoriale e la classificazione del prodotto.

Secondo Koch (Koch et al., 2011), il sistema di valutazione più strutturato finora utilizzato nell'industria (impiegato da Rooibos Ltd., Sudafrica) include la setacciatura meccanica del materiale vegetale ricevuto dai produttori con la classificazione in seguito condotta da esperti assaggiatori. Viene valutato l'aspetto delle foglie secche e bagnate, seguito dall'aspetto (colore e luminosità) e dal sapore (aroma, gusto e sensazione in bocca) delle infusioni.

La bassa qualità e le pratiche di lavorazione possono essere indicate dall'aspetto delle foglie secche e bagnate, perché un'eccessiva “fermentazione” può dare luogo a foglie di colore marrone opaco e a infusi con un lieve aroma legnoso.

Le infusioni “ideali” di rooibos, preparate con tè di alta qualità, sono limpide e possiedono un colore rosso mattone-marrone con una tinta giallo arancio sul bordo della tazza dove le infusioni “sotto-fermentate”, di bassa qualità, sono spesso di colore giallo-arancio (Koch et al., 2011). Le infusioni fatte con materiale vegetale troppo “fermentato” sono marroni e torbide e possono avere un effetto negativo sulla qualità visiva delle infusioni (Joubert, 1994).

Il sapore del rooibos può essere considerato come l'elemento di qualità più importante, poiché, alla fine, ha effetto sul gradimento del prodotto da parte del consumatore. L'aroma di un infuso di rooibos è altrettanto importante e non deve contenere note estranee (miele vecchio, acqua di piante in decomposizione, alghe, muffa/ammuffito, medicinali o polvere), inoltre devono essere assenti le note verdi. L'intensità dell'aroma

"caratteristico", simile al miele, determina anche il grado dato all'aroma del tè rooibos. Pertanto, si suppone che il tè di alta qualità abbia un gusto corposo, forte, dolce, "caratteristico" e non abbia note amare, ammuffite, acide, salate o estranee. Tuttavia, per alcune classi è accettabile un sapore leggermente erbaceo. L'aroma, il sapore, il gusto hanno quindi il maggiore impatto sulle classi date al tè rooibos (Koch et al., 2011).

Attualmente non esistono linee guida specifiche all'interno della legislazione che stabiliscano il modo in cui la qualità del tè rooibos dovrebbe essere regolata. L'unico regolamento relativo agli standard di qualità dei rooibos stabilisce che *"tutti i rooibos devono avere il gusto e l'aroma caratteristico e il colore chiaro e distintivo dei rooibos"*.

Tuttavia, i consumatori sudafricani potrebbero essere più abituati al termine aroma e sapore "caratteristico", in quanto hanno più familiarità con il tè rooibos rispetto ai consumatori stranieri. Nel tentativo di affrontare le incoerenze nella classificazione dei rooibos, sono stati sviluppati una ruota sensoriale generica e un lessico per l'industria. Tuttavia, la ruota sensoriale e il lessico sono stati sviluppati sulla base dei dati raccolti da una sola stagione di produzione (2009) e un'area di produzione (Western Cape), pertanto hanno una valenza limitata

Di conseguenza, è stato intrapreso uno studio di follow-up per convalidare sia la ruota sensoriale che il lessico utilizzando un set di dati più ampio. Includendo i dati di diverse aree di produzione, classi e anni, sono state coperte tutte le possibili variazioni (Joubert, 2016). Dai dati è emerso che le infusioni di rooibos possiedono un profilo aromatico caratteristico primario ("rooibos-legnoso", "fynbos-floreale" e "miele") e

secondario ("dolce-fruttato", "caramello" e "albicocca"). Inoltre, la nota aromatica "fieno/erba secca", sebbene percepita a bassa intensità, era presente nel 99% dei campioni di rooibos, il che la rende "caratteristica" del profilo aromatico dei rooibos (Koch et al., 2012) (Figura 9). L'area di produzione non ha influenzato il profilo sensoriale del tè rooibos, ma l'anno di produzione ha avuto un ruolo: gli anni di produzione erano distinguibili in base alle differenze nelle intensità percepite nell'aroma.

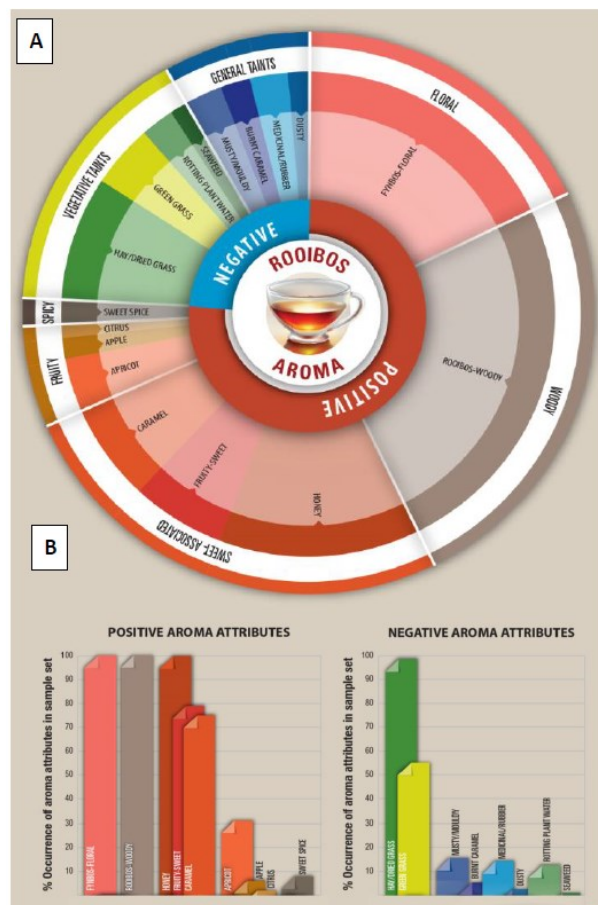


Figura 9 Ruota dell'aroma di Rooibos, che mostra l'intensità relativa di 17 attributi dell'aroma (a), accompagnata da grafici a barre (b) che indicano la frequenza percentuale di occorrenza di positivo e negativo (Jolley et al., 2017)

1.6 METALLI NEGLI ALIMENTI

Dei 94 elementi presenti in natura 70 sono metalli, definiti come elementi di buona conducibilità elettrica e di calore, che formano cationi per perdita di elettroni e che

producono ossidi e idrossidi basici. Il termine "metallo pesante" (considerato generalmente in una accezione negativa) è, al giorno d'oggi, obsoleto e chimicamente privo di senso (Wood et al., 2012). "Metallo" si riferisce all'elemento puro o a una lega di elementi metallici, mentre "pesante" nell'uso convenzionale implica alta densità. La conoscenza della densità non è così rilevante riguardo alla previsione degli effetti biologici dei metalli, poiché gli elementali metalli o le loro leghe non sono, nella maggior parte dei casi, le specie che interagiscono con i sistemi biologici. Oltre a "metallo pesante" vi sono altri termini o espressioni impiegati in letteratura che non presentano definizioni precise:

1. Metallo leggero: termine usato raramente in riferimento sia a un determinato elemento che ai suoi composti. Bjerrum, creatore del termine, lo ha applicato a metalli di densità inferiore a 4 g/cm³.
2. Metallo essenziale: metallo richiesto per l'intero ciclo di vita di un organismo, la cui assenza produce specifici sintomi di carenza alleviati solo da quel metallo e il cui effetto dovrebbe essere riferito a una curva dose-risposta. Spesso viene usato in modo approssimativo per riferirsi sia all'elemento che ai suoi composti.
3. Metallo benefico: termine antiquato ormai largamente in disuso, il quale implicava che un metallo non essenziale potesse migliorare la salute. Un altro termine che è stato usato in riferimento sia all'elemento che ai suoi composti.
4. Metallo tossico: termine impreciso. Tutte le sostanze, incluso il carbonio, sono tossiche se somministrate in determinate dosi. Il grado di tossicità dei metalli varia molto da metallo a metallo e da organismo a organismo. I metalli puri sono raramente molto tossici (tranne che in polveri molto fini, le quali possono essere

dannose per i polmoni). La tossicità, come l'essenzialità, dovrebbe essere definita in riferimento a una curva dose-risposta per la specie in esame.

5. Metallo abbondante: solitamente si riferisce alla proporzione dell'elemento nella crosta terrestre, sebbene possa essere definito in termini di altri ambienti, ad esempio oceani, acque dolci, ecc.
6. Metallo disponibile: metallo che si trova in una forma assimilabile.
7. Metallo in traccia: metallo trovato in bassa concentrazione (ppm o meno), in una certa sorgente specifica, ad esempio terreno, pianta, tessuto, acqua freatica, ecc.
8. Micronutrienti: termine più recente per descrivere più accuratamente il significato di “metallo in tracce” (Duffus, 2002).

In riferimento alla salute umana, i metalli sono classificabili in essenziali e non essenziali. Tra i primi troviamo calcio, magnesio, manganese, selenio, zinco, ferro e rame, mentre tra i non essenziali sono presenti nichel, cromo esavalente, arsenico, cadmio, piombo, mercurio e alluminio (Mudipalli e Zelikoff, 2017).

La Figura 10 mostra la relazione tra intake di un elemento, concentrazione dell'elemento nel tessuto e indice di salute. La curva I rappresenta un elemento in traccia essenziale, il quale può produrre effetti avversi in condizioni di ridotta o eccessiva esposizione. La curva II rappresenta invece un elemento non essenziale, i cui effetti avversi sono associati solo a condizioni di eccessiva esposizione. Gli intake A e B rappresentano gli assorbimenti di elementi che producono significativi cambiamenti dai valori di norma per uno o più indici di salute dovuti rispettivamente a deficienza o tossicità (Fox & Tao, 1981).

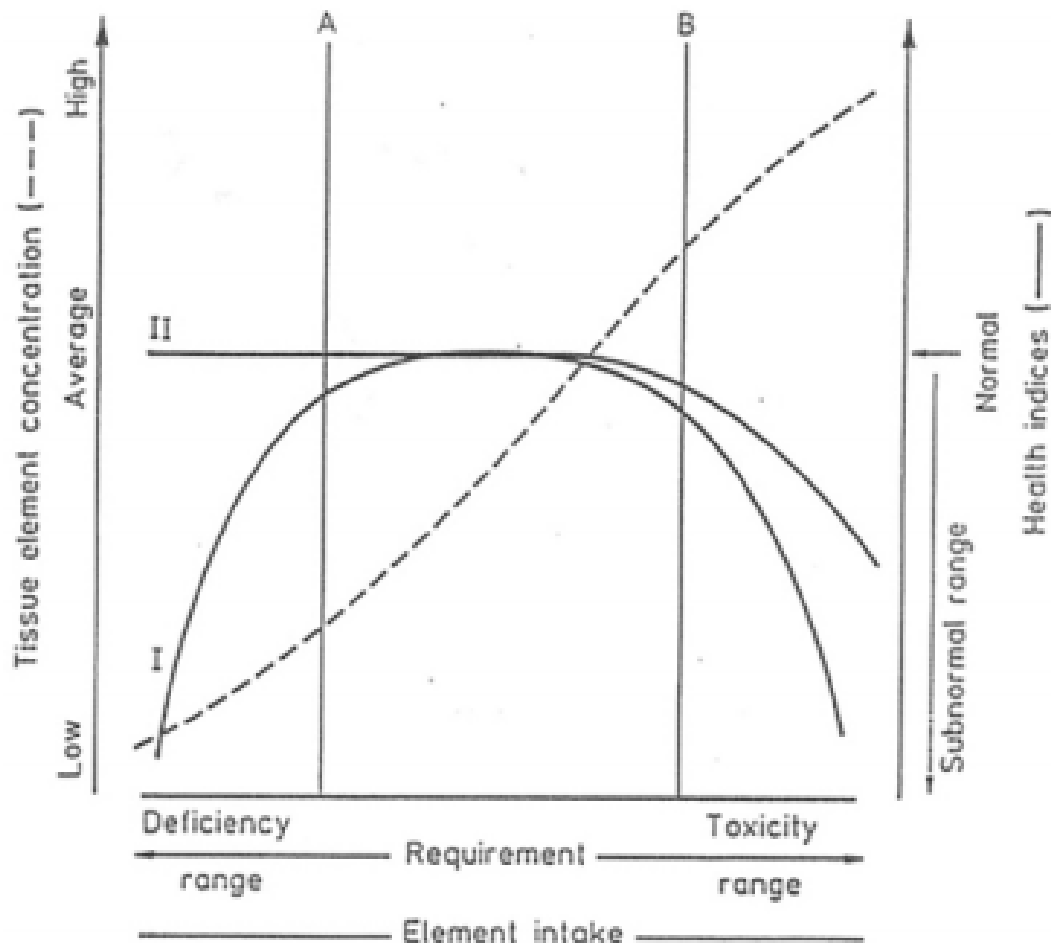


Figura 10 Relazione tra intake di un elemento, concentrazione dell'elemento nel tessuto e indice di salute. (Spivey Fox and Tao 1981).

I metalli, in modo particolare quelli essenziali, sono presenti nel corpo umano in concentrazioni molto basse, nell'ordine di ppb (parti per miliardo), sono pertanto definiti oligoelementi o elementi in traccia. Gli oligoelementi essenziali devono essere presenti nei tessuti in concentrazioni costanti, carenze alimentari possono provocare alterazioni strutturali e fisiologiche analoghe in più specie animali. Le funzioni svolte dagli elementi in traccia sono varie: stabiliscono le differenze di potenziale attraverso le membrane, consentono reazioni enzimatiche di ossidoriduzione, agiscono come cofattori di reazioni enzimatiche e mantengono la struttura di proteine e ormoni (Costantini et al., 2016).

Per valutare la reattività fisica, la biodisponibilità e la tossicità degli elementi in tracce, quindi dei metalli, è essenziale studiare la speciazione degli elementi stessi. Il termine "speciazione chimica" è stato definito nelle "Raccomandazioni IUPAC 2000" come la forma specifica di un elemento: composizione isotopica, stato di ossidazione e struttura complessa o molecolare.

1.6.1 ALLUMINIO

L'alluminio è un elemento chimico della tavola periodica degli elementi con numero atomico 13, il suo simbolo è Al. Il nome alluminio è derivato dal nome antico per l'allume (solfato alluminoso di potassio), quale era alumen (Latino, che significa "sale amaro").

L'alluminio è uno dei maggiori costituenti della crosta terrestre (8.6% di tutti i costituenti). Questo metallo, molto abbondante nei terreni, è altamente reattivo e non è mai reperibile in forma libera in natura ma è sempre combinato con altri elementi (in particolare con ossigeno, silicio e fluoro), per lo più in forma ossidata a causa della sua alta affinità per l'ossigeno (triossido di bialluminio Al_2O_3 , insolubile in acqua). L'abbondanza di varie forme fisiche e chimiche dell'alluminio, così come la sua solubilità in mezzi, dipende da un gran numero di parametri fisico-chimici, tra cui pH, temperatura, contenuto di carbonio organico sciolto e molti altri ligandi.

L'Alluminio, onnipresente nella nostra vita quotidiana, è uno dei metalli con riconosciuta potenziale pericolosità per la nostra salute, anche considerando la presenza diffusa in molti alimenti e in molti altri prodotti di consumo.

L'alluminio interferisce con diversi processi biologici (stress ossidativo cellulare, metabolismo del calcio, etc.), pertanto può indurre effetti tossici in diversi organi e

sistemi: il tessuto nervoso è il bersaglio più vulnerabile (EFSA, 2008). L'alluminio ha una biodisponibilità orale molto bassa nei soggetti sani anche se, per contro, la dose assorbita ha una certa capacità di bioaccumulo. L'escrezione avviene essenzialmente tramite il rene; il bioaccumulo, e quindi la tossicità, dell'alluminio è nettamente maggiore nei soggetti con funzionalità renale immatura o diminuita (bambini piccoli, anziani, nefropatici) (EFSA, 2008).

Gli effetti sul sistema nervoso centrale e sul tessuto osseo sono principalmente osservati in soggetti a rischio esposti all'accumulo di grandi quantità di alluminio (pazienti con insufficienza renale, in dialisi, sottoposti a nutrizione parenterale, professionalmente esposti, ecc.). Diversi studi in passato suggerivano che l'alluminio, per la sua neurotossicità, potesse contribuire all'insorgenza della malattia di Alzheimer e di altre malattie neurodegenerative (EFSA, 2008). Le più recenti pubblicazioni non hanno prodotto

dati a sostegno del diretto coinvolgimento dell'alluminio nella genesi dell'Alzheimer (EFSA, 2008). Per contro l'alluminio può aumentare la morte neuronale e lo stress ossidativo a livello cerebrale; per cui non va escluso un ruolo nell'aggravare o accelerare i sintomi e l'insorgenza di patologie neurodegenerative umane.

Sulla base degli effetti neurotossici, l'European Food Safety Authority EFSA ha definito una dose settimanale tollerabile (TWI) pari a 1 mg/kg p.c./settimana, corrispondente a 20 e 70 mg di alluminio/settimana, rispettivamente, per un bambino di 20 kg e per un adulto di 70 kg.

La via primaria di esposizione all'alluminio per la popolazione generale è quella alimentare. La sua concentrazione negli alimenti può derivare da un background

naturale o da emissioni ambientali; vi è inoltre un utilizzo di additivi alimentari a base di alluminio, che però è stato drasticamente ridotto a partire dal 2011. Attualmente il principale fattore direttamente prevenibile è la contaminazione del cibo per contatto, ad esempio, per fenomeni migrazionali da utensili per la cottura o imballaggi; per quanto generalmente modesta, la migrazione diventa particolarmente marcata quando i materiali a base di alluminio vengono in contatto con cibi acidi (ad es. contenenti acido citrico) o contenenti sale. Alcuni studi effettuati con alimenti avvolti in fogli di alluminio e sottoposti a differenti tipi di cottura (in forno e grigliati sulla carbonella) hanno dimostrato che l'elevata temperatura comporta l'aumento della concentrazione dell'alluminio nell'alimento. I dati disponibili indicano che i cereali e prodotti a base di cereali, verdure, bevande e formule per lattanti sono i principali determinanti dell'esposizione alimentare all'alluminio. L'acqua potabile rappresenta una fonte di esposizione secondaria. Un'ulteriore esposizione può derivare da medicinali e prodotti di consumo (ad es., prodotti per la cura personale) che contengono composti dell'alluminio.

L'EFSA, nel report "Safety of aluminium from dietary intake 1" pubblicato il 22 maggio 2008, riporta che studi condotti negli ultimi anni in diversi Paesi europei hanno stimato che l'esposizione alimentare media di un adulto all'alluminio è compresa tra 0.2 e 1.5 mg/kg p.c. per settimana. Nei bambini e nei giovani l'esposizione è più alta, variando da 0.7 a 2.3 mg/kg p.c. per settimana. Anche se i livelli di esposizione attuali potrebbero essere minori, i dati indicano una significativa probabilità di superamento della TWI, anche considerando l'esposizione aggiuntiva attraverso i prodotti di

consumo. Tuttavia, va tenuto conto che, riguardo all'esposizione complessiva all'alluminio contenuto nei materiali a contatto, si impongono alcune considerazioni:

- a) esso è difficile da quantificare e verosimilmente molto variabile in funzione delle modalità di uso;
- b) i materiali a contatto con gli alimenti contribuiscono comunque ad una esposizione aggregata (da più fonti), verosimilmente in modo significativo;
- c) essendo il rilascio di alluminio dai materiali a contatto dipendente dalle modalità di uso, si tratta di una fonte di esposizione che può essere drasticamente ridotta da azioni preventive nella preparazione commerciale degli alimenti.

L'uso non corretto di materiale a base di alluminio non protetto può rappresentare una fonte importante di esposizione al metallo. Pertanto, è opportuno evitare il contatto con alimenti acidi e/o salati, per tempi e temperature elevati e, al fine di ridurre i rischi di migrazione, molte aziende produttrici utilizzano l'alluminio anodizzato, in cui uno strato protettivo di ossido di alluminio sigilla la superficie e impedisce il rilascio di molecole di alluminio.

Considerati i possibili rischi di effetti avversi derivanti dall'elevata assunzione di alluminio per gruppi di popolazione vulnerabili quali bambini, anziani e donne in gravidanza è stato osservato che:

- l'aspetto preoccupante della tossicità dell'alluminio è legato alla capacità di bio-accumulo del minerale nell'organismo umano in seguito a esposizioni prolungate, anche se l'assorbimento di una singola dose è basso, un'assunzione prolungata può dare luogo ad un significativo carico corporeo, soprattutto ove la capacità renale è immatura (bambini piccoli) o ridotta (anziani, soggetti nefropatici);

- l'alluminio può essere considerato un elemento con una considerevole potenza tossicologica, ma il rischio è notevolmente limitato dallo scarso assorbimento (0,2-1%) e la rapida escrezione nei soggetti sani;
- la dose assorbita, anche se molto piccola, può depositarsi progressivamente nell'organismo e che l'accumulo è maggiore, e l'escrezione minore ove la funzione renale è immatura o parzialmente compromessa. Pertanto, le fasce di popolazione più vulnerabili comprendono i bambini, gli anziani e i soggetti con funzione renale inadeguata: a questi si devono aggiungere le donne in gravidanza, per il passaggio transplacentare ed il rischio di fetotossicità. Inoltre, il ruolo di polimorfismi genetici nel modulare la tossico-cinetica dell'alluminio è possibile, ma va meglio caratterizzato;
- benché l'alluminio possa interferire con svariati processi biologici, il sistema nervoso è il bersaglio principale della sua tossicità. Non vi sono evidenze epidemiologiche coerenti di un ruolo specifico dell'alluminio nella malattia di Alzheimer; tuttavia, l'associazione fra alluminio e patologie neurodegenerative e del neuro-sviluppo è biologicamente plausibile anche se probabilmente non specifica (conseguente all'induzione di stress ossidativo e infiammazione nel tessuto nervoso);
- a parte le esposizioni lavorative e situazioni particolari (dialisi, nutrizione parenterale) ove il rischio è ben riconosciuto, i materiali a contatto con gli alimenti sono solo una delle fonti di esposizione alimentare; i materiali a contatto con gli alimenti (soprattutto se impropriamente usati) contribuiscono ad una esposizione

aggregata (da più fonti) che certamente è indesiderabile ed occorre mantenere al di sotto della TWI;

- l'alluminio può verosimilmente avere un'azione additiva con altri metalli che si concentrano nel sistema nervoso e/o nell'osso (piombo, cadmio) data la somiglianza di effetti e di bersagli; questo porta ad un ulteriore elemento di cautela nei confronti dell'esposizione.
- considerati i potenziali rischi per la salute e la presenza di significative fasce di popolazione maggiormente vulnerabili, è importante adottare particolari precauzioni per prevenire la contaminazione degli alimenti e delle bevande con l'alluminio sia direttamente che durante la loro preparazione (CNSA 2017).

1.6.2 FERRO

Il ferro è l'elemento chimico di numero atomico 26. Il suo simbolo Fe è un'abbreviazione della parola ferrum, il nome latino del metallo. Il ferro è uno dei metalli più abbondanti sulla crosta terrestre (ne costituisce il 5%). ed un costituente naturale di piante e animali.

Il ferro è usato come materiale da costruzione, anche per le tubature dei sistemi di distribuzione dell'acqua. Gli ossidi di ferro sono usati come pigmenti per colori e plastiche. Altri suoi composti vengono usati come coloranti alimentari e come farmaci per il trattamento delle patologie da carenza di ferro. Vari sali di ferro sono usati come coagulanti nel trattamento dell'acqua.

Il ferro si può trovare come contaminante naturale nelle fonti d'acqua; in genere la sua concentrazione non supera gli 0,3 mg/L, ma può essere più elevata nell'acqua trattata e distribuita, come conseguenza del suo impiego come coagulante o a seguito del suo

rilascio dalle tubature dei sistemi di distribuzione per corrosione. Molti alimenti sono ricchi di ferro, soprattutto il fegato, il pesce, i vegetali verdi, la carne rossa e le uova. Sono proprio gli alimenti la principale fonte di assunzione del ferro per l'uomo; l'acqua potabile contribuisce solo parzialmente. L'esposizione attraverso l'aria è minima.

Il ferro è un elemento essenziale nella nutrizione umana. Il ferro forma l'emoglobina, la mioglobina, gli enzimi contenenti eme; viene immagazzinato nelle molecole di ferritina ed emosiderina, principalmente nella milza, nel fegato, nel midollo osseo e nei muscoli striati. Le perdite di ferro giornaliere nell'adulto sono minime e pari a circa 1 mg dovute soprattutto all'esfoliazione delle cellule, per due terzi perse dal tratto gastrointestinale e per il resto principalmente dalla cute. Nelle donne c'è una quota aggiuntiva di perdita mensile con le mestruazioni o durante la gravidanza.

Dal punto di vista tossicologico l'esposizione acuta a dosi di 200-250 mg/kg di peso corporeo può essere letale, per necrosi emorragica della mucosa intestinale. L'esposizione cronica determina tossicità da accumulo, con patologie come l'emocromatosi con gravi danni quali cirrosi epatica, diabete, iper ed ipotiroidismo, impotenza nell'uomo, alterazioni mestruali nella donna e sterilità in entrambi, scompenso cardiaco e aritmie, artropatie e osteoporosi.

Il ferro, soprattutto il catione bivalente Fe^{2+} , è in grado di innescare ossidazioni riducendo o decomponendo i perossidi formati in precedenza. Quindi, un antiossidante che protegge dalla tossicità del ferro è una sostanza che può:

- a) chelare il catione bivalente Fe^{2+} e prevenire la reazione con ossigeno o perossidi;
- b) chelare il ferro e mantenerlo in uno stato redox che lo rende incapace di ridurre l'ossigeno molecolare;

c) intrappolare i radicali già formati, che è un'azione putativa di qualsiasi sostanza che può eliminare i radicali liberi, indipendentemente dal fatto che siano originati da reazioni ferro-dipendenti o no.

Un gran numero di sostanze può chelare il ferro, e molti di loro sono presenti in sistemi biologici.

L'interazione tra il sovraccarico di ferro e gli antiossidanti alimentari è stata ben caratterizzata, soprattutto per quanto riguarda le vitamine E e C.

La vitamina E, una miscela di vari tocoferoli e tocotrienoli, è il più importante antiossidante liposolubile (Packer et al., 2001). La vitamina E è stata ampiamente studiata con rispetto alla sua capacità di proteggere della tossicità del ferro le molecole dagli effetti in vitro e in vivo. I vari test di laboratorio hanno dimostrato che la vitamina E può prevenire la maggior parte dei danni causati dal ferro.

L'interazione di un altro antiossidante dietetico, la vitamina C (ascorbato) e il ferro sono meno chiari. L'ascorbato può ridurre il ferro "libero" (ferrico) in Fe^{2+} , promuovendo l'iniziazione (via formazione di radicali idrossilici) e propagazione (tramite formazione di radicali alcossilici lipidi) di reazioni dei radicali liberi (Buettner e Jurkiewicz, 1996).

La tossicità da sovraccarico di ferro è stata generalmente associata con una condizione di radicali liberi. Poiché la maggior parte degli organismi ha un numero di proteine che tengono sequestrato la maggior parte del ferro, solo poche quantità di ferro sono "libere" o disponibili per le reazioni di catalizzazione dei radicali liberi.

Sotto certe condizioni patologiche, il ferro può essere rilasciato portando a una condizione di stress ossidativo. Le strategie per controllo dei danni del ferro sui radicali

liberi potrebbero essere diverse: dalla prevenzione delle condizioni che possono portare al sovraccarico ferro; al fornire sostanze chelanti che sequestrano l'eccesso di ferro; al proteggere le molecole funzionali (lipidi, proteine, DNA) dall'ossidazione con l'uso di antiossidanti alimentari (vitamine, flavonoidi, zinco, ecc.). A questo proposito, i flavonoidi possono giocare un doppio ruolo nel ridurre il tasso di ossidazione, in quanto possono intervenire a chelare il ferro e/o a intrappolare i radicali liberi (Van Acker et al., 1998). Numerosi rapporti indicano che alcuni flavonoidi possono proteggere i lipidi nei liposomi dall'ossidazione causata dal ferro. Essi sono presenti in diversi alimenti quali tè, vino rosso, uva, succo di frutta, prodotti a base di cacao, mele, cipolle e alcune nocciole.

1.7 METALLI NEL TÈ ED INFUSI

Il tè è la bevanda più consumata dopo l'acqua, grazie ai suoi effetti rinfrescanti e leggermente stimolanti (Harbowy e Balentine, 1997), e svolge un ruolo importante nell'assunzione di una serie di sostanze nutritive e di oligoelementi nell'uomo (Nkono e Asubiojo, 1997). La storia del tè, un'infusione di foglie essiccate di *Camellia sinensis* in acqua calda, risale a più di 5000 anni fa in Cina. Le tipologie di tè, basate sui processi di lavorazione o sul livello di sviluppo delle foglie raccolte, sono: nero o rosso (fermentato), oolong (semi-fermentato), verde (non fermentato), bianco (germogli di foglie raccolte con tricomi bianchi, non fermentato o semi-fermentato (Valter, 2001). La composizione chimica del tè è molto complessa e consiste in tannini, flavonoli, alcaloidi, proteine e aminoacidi, enzimi, sostanze che formano l'aroma, vitamine e oligoelementi (Li e Wang, 2005).

La comunità medica riconosce il tè come una bevanda che può offrire diversi benefici per la salute (Naithani e Kakkar, 2005) e il consumo regolare di tè può contribuire alle esigenze dietetiche quotidiane dei microelementi tra cui zinco, rame, manganese, ferro, ecc.

Negli ultimi decenni è stata effettuata una vasta ricerca sugli elementi nutritivi per definire il loro ruolo nella dieta umana. I metalli pesanti sono gli elementi negativi più spesso controllati nel cibo o in qualsiasi altro prodotto a causa della loro capacità di accumularsi nella catena alimentare. I loro livelli massimi sono quindi diventati in tutto il mondo standard di qualità (Malik et al., 2008).

Oltre a macro e microelementi essenziali, le piante da tè sono grandi accumulatrici di alluminio con concentrazioni nelle loro foglie superiori a 1000 mg kg^{-1} (Watanabe et al., 2003), ad esempio vecchie foglie di tè possono contenere fino a 30 mg di Al per grammo di peso secco (Matsumoto et al., 1976). Le piante di tè non tollerano solo l'alta percentuale di Al, ma la loro crescita è fortemente potenziata dalla sua presenza (Konishi et al., 1985).

Un numero considerevole di studi ha riportato la concentrazione totale di Al nelle infusioni di tè per la sua tossicità. Poiché la pianta è un accumulatore naturale di alluminio, le infusioni di tè sono importanti fonti di esposizione all'alluminio e un consumo elevato di tè può più che raddoppiarne l'assunzione individuale. In corrispondenza a quanto appena descritto (Malik, 2008) rileva una presenza di alluminio compresa tra i 0.055 e 1.734 mg l^{-1} . Risultati che concordano con altre pubblicazioni come quella di Wong et al (Wong et al., 1998) che evidenzia quantitativi di Al compresi tra 0.7 - 3.5 mg l^{-1} .

Vi è abbondanza in letteratura che dimostra gli effetti negativi sulla salute dei vari metalli pesanti e metalloidi sull'organismo umano. Con numerosi meccanismi avversi che includono: distruzione endocrina (WHO, 2002), citotossicità (Chen et al., 2010), disfunzione mitocondriale (Belyaeva et al., 2012) e stress ossidativo (Hu et al., 2013), oltre a uno spettro di elementi tossici che sono in grado di disturbare l'omeostasi cellulare e metabolica e indurre malattie cliniche. La letteratura è piena di molti processi patologici comuni come carcinogenesi (Nair et al., 2013), insulino-resistenza (Kolachi et al., 2011), neurodegenerazione (Jomova et al., 2010) e disregolazione immunitaria (Genuis, 2010). Queste patologie possono derivare dall'esposizione e dal bioaccumulo di vari metalli pesanti e metalloidi.

Inoltre, la letteratura recente ha chiarito che i vari composti tossici possono avere effetti epigenetici con potenziali danni transgenerazionali (Guerrero-Bosogna e Skinner, 2012). Piuttosto che incidenti isolati di singole esposizioni, è evidente che il contatto con metalli tossici è un fenomeno diffuso (Sears et al., 2012) con molte potenziali fonti tra cibo contaminato e bevande.

È ben documentato che le specie vegetali comunemente usate per preparare bevande stimolanti (tè e caffè) contengono alcuni micro e macroelementi; tuttavia, le loro concentrazioni variano con molti fattori: l'età della pianta quando raccolta, la genetica della pianta, condizioni del suolo, precipitazioni, altitudine e, in caso di infusioni, condizioni di preparazione (quantità di materiale relativa all'acqua, tempo e temperatura di infusione, ecc.) (Flaten, 2002). Di fatto i contaminanti possono variare nel terreno, nell'aria o nell'acqua con cui le piante vengono coltivate. Il terreno acido, ad esempio, può provocare un eccesso di alluminio disponibile. Altre fonti di metalli

possono essere trovate negli insetticidi, erbicidi e fertilizzanti che possono essere assorbiti attraverso le foglie di tè (Colak et al., 2005).

Quindi è importante esaminare diversi altri fattori per minimizzare l'esposizione a metalli pesanti. La prima cosa da verificare è considerare dove sono state coltivate le piante (paese di origine). È ideale consumare tè (o qualsiasi altro infuso) che abbia avuto una minima esposizione alle sostanze tossiche nelle acque sotterranee, suolo, aria e pioggia. In secondo luogo, bisogna considerare l'acqua, che può contenere contaminanti, con cui viene preparato l'infuso. L'acqua di rubinetto, ad esempio, contiene più contaminanti dell'acqua distillata. In terzo luogo, possono o meno contribuire al carico tossico i recipienti in cui viene bollita l'acqua e le sostanze utilizzate per costruire le tazze in vetro o in porcellana che si utilizzano per bere. In uno studio, ad esempio, è stato rilevato che le tazze in porcellana hanno rilasciato un livello di piombo di 0.4 µg/L (Schwalfenberg et al., 2013). Sempre la stessa ricerca ha evidenziato che di tutti gli elementi tossici testati solo alluminio e piombo avevano livelli inaccettabili. Livelli inaccettabili di alluminio sono stati trovati nel 7% dei tè infusi per 3 minuti e il 20% nei tè infusi per 15 minuti. Tutti i tè avevano livelli significativi di alluminio e 6 su 30 tè preparati per 15 minuti avevano livelli inaccettabilmente alti. Questo significa che bere più di 4 tazze di tè al giorno può contribuire in modo significativo a un carico tossico. (Schwalfenberg et al., 2013).

Il tè lasciato in infusione per periodi di tempo più lunghi aumenta i livelli dei contaminanti dal 10 al 50% rispetto ad un'infusione per 3 minuti. Pertanto, infusioni oltre i 3 minuti dovrebbero essere evitate.

Nel determinare gli standard normativi e le raccomandazioni per la salute pubblica, è importante considerare il carico totale cumulativo degli elementi tossici (Sears e Genuis, 2012). Non è sufficiente esaminare semplicemente le esposizioni isolate agli elementi tossici, ma piuttosto al totale cumulativo delle esposizioni.

Oltre alle bevande tradizionali di tè e caffè, ci sono altri stimolanti vegetali, preparati come infusione in acqua calda, che hanno un uso più recente nella storia, non più lungo di diverse centinaia di anni. La bevanda con il più grande potenziale per competere con la popolarità del tè e del caffè è il mate, che è un infuso di foglie essiccate di *Ilex paraguariensis* della famiglia delle Aquifoliaceae. È stato utilizzato commercialmente verso la fine del 17° secolo e attualmente supera il tè in popolarità in Sud America (Malik et al., 2008). Più recentemente, metà del secolo scorso, è iniziata la diffusione commerciale dei rooibos (*Aspalathus linearis*, oggetto del nostro studio) e dell'honeybush (*Cyclopia intermedia*) che appartengono entrambi alla famiglia delle Fabaceae e sono molto simili: arbusti perenni, legnosi, alti 1 m, le cui foglie vengono essiccate (verde) o fermentate ed essiccate (rosso) e consumato anche come infusi d'acqua calda. Sono spesso raccomandati per le persone ipersensibili alla caffeina, perché naturalmente privi di caffeina. Anche i capolini secchi di *Matricaria recutita* L. (Sinonimo *Chamomilla r. L.*), comunemente chiamata camomilla, sono usati per la preparazione con infusioni in acqua calda. Dalla ricerca effettuata da (Malik et al., 2008) è emerso che nel mate e nella camomilla c'era una maggiore presenza di metalli, che ha superato di diverse volte i livelli trovati nel tè e nel caffè. Ad esempio, nel mate c'erano contenuti di metalli più di cinque volte superiori in confronto al tè o al caffè.

Inoltre, è stato osservato che il caffè e il tè differiscono nel contenuto di micro e macroelementi tra materie prime e infusi (Jaganyi e Madlala, 2000) e le stesse differenze (tra materia prima e infuso) ci sono tra gli altri stimolanti vegetali tradizionali e non (camomilla, honeybush, mate, rooibos). I risultati emersi dagli studi di Gallaher e Marshall (Gallaher et al., 2006) confermano una conversione, tra materie prime e infusioni, relativamente scarsa di Fe e Ca, una conversione simile di K e una conversione che varia tra il 30% e il 50% per Cu, Mn, P, Zn (Malik et al., 2008).

I contenuti di alluminio presenti negli altri "stimolanti vegetali" non presentano differenze significative e si avvicinano al limite dell'acqua potabile fissato dall'OMS e pari a 0.2 mg Al l^{-1} .

Dal confronto di tutte le specie analizzate nello studio di (Malik et al., 2008), il più alto contenuto di Al nelle materie prime non è stato osservato nel tè ma nel caffè (10 volte superiori rispetto al tè). Ma, a causa della scarsa lisciviazione dell'alluminio dei chicchi di caffè, i livelli nelle infusioni hanno raggiunto solo la metà del contenuto medio dei tè (ca. 0.25 mg l^{-1}).

In confronto alle specie tradizionali utilizzate per la preparazione di infusioni, tutti i campioni di mate analizzati nello studio erano generalmente caratterizzati da alti contenuti di B, Ca, Cu, Mg, Mn e Zn. La conversione degli elementi nelle infusioni era paragonabile ai risultati ottenuti da Giulian et al., (Giulian et al., 2007). È interessante notare che il contenuto di boro è fino a sette volte superiore nel mate rispetto al tè o al caffè. Questo livello (1.55 mg l^{-1}) è superiore alla dose giornaliera raccomandata (RDA $2.0 \text{ } \mu\text{g giorno}^{-1}$), ma il livello massimo non è stabilito. Dal momento che il caffè e il latte sono considerati come i due principali contribuenti del

boro nella dieta umana, che rappresenta fino al 12% della sua assunzione totale (Rainey et al., 1999), il mate sembra essere importante come potenziale fonte di B nella dieta umana.

Nonostante alcune affermazioni promozionali, fatte dai distributori commerciali, che le bevande preparate con foglie di rooibos e honeybush sono fonti preziose di diversi elementi nutritivi, nella maggior parte dei campioni analizzati durante lo studio di Malik (2008) sono state trovate quantità inferiori di minerali rispetto agli infusi degli altri “stimolanti vegetali” tradizionali. Ciò suggerisce che l'effetto benefico nutrizionale delle infusioni fatte da entrambe queste specie è discutibile. Non sono state rilevate differenze significative nelle quantità di elementi contenuti nelle infusioni tra rooibos ed honeybush. In generale, le infusioni delle forme fermentate di queste piante hanno quantità inferiori di elementi rispetto alle forme non fermentate (Malik et al., 2008). Inoltre, i livelli di Ca delle forme non fermentate del rooibos e del honeybush erano significativamente più alti rispetto ai livelli del tè o del caffè. Risultati simili sono stati trovati anche nel caso del ferro, con la leggera eccezione nei rooibos fermentati, caratterizzati da 0.165 mg l^{-1} .

Per la camomilla, le quantità totali di tutti gli elementi analizzati si sono classificate al secondo posto dopo il mate. Il contenuto insolitamente alto di Al nella materia prima, che è più alta di cinque volte superiore rispetto al tè, non si riflette nell'infusione (1.5% del contenuto totale). In questo caso, deve essere presa in considerazione una possibile contaminazione secondaria del campione durante la raccolta e/o i processi di lavorazione e l'alta eterogeneità del contenuto di Al nel campione e la bassa conversione di questo elemento nell'infusione sembrano supportare questa teoria

(Malik et al., 2008). Anche i contenuti di alluminio determinati da Bas e Erdemoglu (Bas e Erdemoglu, 2006) nella camomilla (356 mg kg^{-1}) indicano la capacità relativamente alta della pianta di camomilla di accumulare questo elemento con la sua bassa conversione in infusione rispetto ad altre piante medicinali come la *Tilia vulgaris*, *Foeniculum vulgare*, *Rosa caninae* o *Salvia officinalis*. Rispetto alle piante comunemente usate per la preparazione di infusioni, sono stati misurati livelli elevati anche nei casi di boro, calcio e fosforo (cinque, otto e due volte più di tè, rispettivamente).

In sintesi, i risultati di Malik et al. (2008) mostrano un contrasto tra i tradizionali stimolanti vegetali (tè e caffè) nel contenuto di alcuni micro e macroelementi nelle specie meno comunemente utilizzate (camomilla, honeybush, mate, rooibos).

Inoltre, i volumi analizzati di Al e Ni nelle infusioni di rooibos e di honeybush erano significativamente più bassi rispetto al tè o al caffè.

2 SCOPO DELLA TESI

Nel seguente studio di tesi ho valutato l'effetto di diversi metodi di infusione di tè rooibos fermentato e non fermentato. Nello specifico, si è voluto confrontare un metodo di infusione standard “regular brews” (5 minuti di infusione in acqua bollente prima del filtraggio) con un metodo a freddo “cold brews” (8 ore di infusione a temperatura ambiente prima del filtraggio) e un metodo a caldo “hot/boiled brews” (5 minuti di infusione con acqua bollita in microonde a 1400 W di potenza).

In particolare, è stata determinata la concentrazione di solidi solubili (SS), alluminio (Al) e ferro (Fe).

I solidi solubili sono stati determinati in quanto contengono numerose molecole, con potenziali benefici per la salute.

Il livello di Al è stato valutato poiché le piante ne sono accumulatori naturali e le bevande quali i tè, sono una delle principali fonti di esposizione per l'uomo (Malik et al., 2008). Questo metallo può causare l'Alzheimer e il Parkinson e l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha istituito nel 2008 un consumo settimanale tollerabile (TWI) di 1 mg Al/kg di peso corporeo.

Infine, è stata determinata la concentrazione di Fe in quanto metallo essenziale per la vita, come trasportatore di ossigeno (emoglobina e mioglobina) e coenzima delle attività biologiche catalitiche (citocromi ed enzimi) (Fraga, 2002). L'assunzione giornaliera di riferimento è di 14 mg al giorno (UE N. 1169/2011) ma, a elevate concentrazioni (> 50 mg/giorno) provoca effetti gastrointestinali avversi (ad es. nausea, disagio epigastrico, costipazione) (EFSA, 2006) e varie patologie come ad

esempio malattie epatiche e cardiache, diabete e anomalie del sistema immunitario (Fraga, 2002).

3 MATERIALI E METODI

Le determinazioni del ferro (Fe) e dell'alluminio (Al) sono state effettuate tramite spettrometria di assorbimento atomico (AAS).

Il contenuto di solidi solubili SS dei campioni è stato determinato per via gravimetrica.

3.1 CAMPIONI DI ROOIBOS

Per il seguente studio di tesi sono stati utilizzati ventiquattro lotti di produzione di rooibos sudafricani (*Aspalathus linearis*), non pastorizzati (Tabella 1), dei quali 12 di rooibos verde (“non fermentato”) e 12 di rooibos rosso (“fermentato”).

I campioni di rooibos provenivano da due aree di produzione: Clanwilliam (Western Cape, South Africa) per il rooibos verde e Nieuwoudtville (Northern Cape, South Africa) per il rooibos rosso, gentilmente forniti dalle aziende Rooibos Ltd e Bokkeveld Rooibos.

Per le analisi sono stati selezionati i gradi di qualità A e B, in base alle caratteristiche tipiche di gusto e aroma facenti riferimento alle tre categorie A, B, C, utilizzate per la classificazione del rooibos rispettivamente in forte, media e scarsa.

La valutazione della qualità, come descritto nel paragrafo 1.5, è basata sulle caratteristiche sensoriali (colore delle foglie, colore e sapore dell'infusione) (Koch et al., 2012) e sulla resa percentuale di rooibos raffinati (ottenuti dopo la setacciatura).

Tutti i campioni sono stati setacciati meccanicamente per 1.5 minuti a 190 rpm per rimuovere polvere (<0.42 mm) e materiale grossolano (> 1.68 mm). I campioni setacciati sono stati conservati a temperatura ambiente (21 ° C) in barattoli di vetro sigillati prima e durante gli esperimenti.

Tabella 1 Campioni di rooibos fermentato e non provenienti dalle aziende Rooibos LTD e Bokkeveld Rooibos (Western e Northern Cape, South Africa).

N° Campione	Tipologia Rooibos	Data Campionamento	Lotto	Qualità	Azienda	Provenienza
01	Non Fermentato	18/11/2019	15001	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
02	Non Fermentato	18/11/2019	15002	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
03	Non Fermentato	18/11/2019	15003	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
04	Non Fermentato	18/11/2019	15007	long cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
05	Non Fermentato	18/11/2019	15008	long cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
06	Non Fermentato	18/11/2019	15009	long cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
07	Non Fermentato	18/11/2019	15015	long cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
08	Non Fermentato	18/11/2019	15025	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
09	Non Fermentato	18/11/2019	15026	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
10	Non Fermentato	18/11/2019	15027	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
11	Non Fermentato	18/11/2019	15028	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
12	Non Fermentato	18/11/2019	15040	small cut	Rooibos LTD	Clanwilliam
01	Fermentato	18/11/2019	NW2011	1B	Bokkeveld Rooibos	Nieuwoudtville
02	Fermentato	18/11/2019	NW2011	3B	Bokkeveld Rooibos	Nieuwoudtville
03	Fermentato	18/11/2019	NW2011	2A	Bokkeveld Rooibos	Nieuwoudtville
04	Fermentato	18/11/2019	NW2011	3A	Bokkeveld Rooibos	Nieuwoudtville
05	Fermentato	18/11/2019	NW2011	5A	Bokkeveld Rooibos	Nieuwoudtville
06	Fermentato	18/11/2019	NW2011	6A	Bokkeveld Rooibos	Nieuwoudtville
07	Fermentato	18/11/2019	RBLtd2011	3A	Rooibos LTD	Clanwilliam
08	Fermentato	18/11/2019	RBLtd2011	4A	Rooibos LTD	Clanwilliam
09	Fermentato	18/11/2019	RBLtd2011	1B	Rooibos LTD	Clanwilliam
10	Fermentato	18/11/2019	RBLtd2011	4B	Rooibos LTD	Clanwilliam
11	Fermentato	18/11/2019	RBLtd2011	5B	Rooibos LTD	Clanwilliam
12	Fermentato	18/11/2019	RBLtd2011	6B	Rooibos LTD	Clanwilliam

3.2 PREPARAZIONE DEGLI INFUSI

Sono state preparate tre diverse infusioni da ciascun campione, come illustrato nella Fig. 11, utilizzando in ciascun caso 2.5 g di rooibos (fermentato e non fermentato) e 200 ml di acqua, che rappresentano rispettivamente il peso medio del materiale vegetale contenuto in una bustina di tè o in un cucchiaino colmo, e il volume medio di

una tazza di tè, così come standardizzato dall'industria dei rooibos per una porzione, “one-cup-serving”.

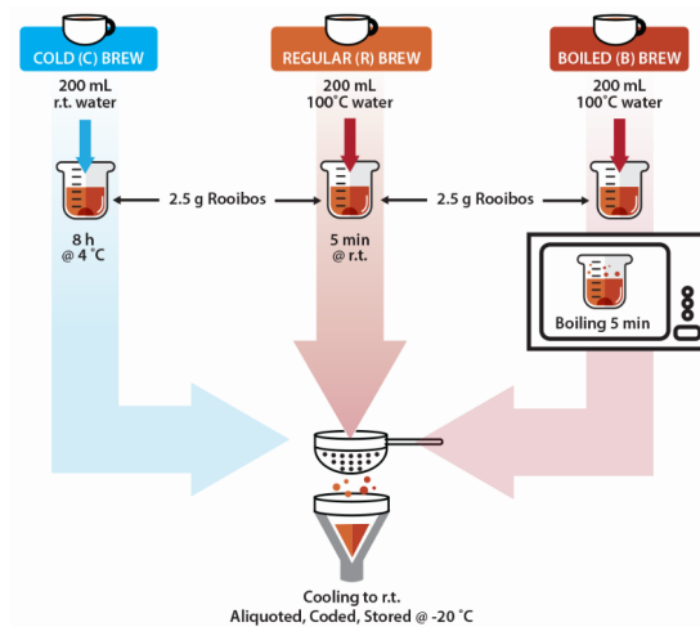


Figura 11 Schema di preparazione delle 3 differenti metodologie di infusione.

Le infusioni fredde o “cold brews” (C) sono state preparate versando acqua distillata a temperatura ambiente (21°C) sul materiale vegetale in una bottiglia di vetro borosilicato a collo largo, del tipo Schott, da 300 ml e mescolando per 5 secondi con un cucchiaino in acciaio inossidabile. La bottiglia è stata chiusa con l’apposito tappo e lasciata in infusione per 8 ore in frigorifero a +4°C. La miscela è stata quindi nuovamente agitata per 5 secondi, setacciata con un filtro a maglie fini e successivamente attraverso carta da filtro Whatman n. 4.

Le infusioni standard o “regular brews” (X), che simulano il metodo più comune di preparazione di una tazza calda di rooibos, sono state preparate seguendo la procedura standard per l’infusione del rooibos così come descritta da Koch et al (Koch et al., 2012). Acqua distillata bollente (100°C) viene versata sul rooibos contenuto in una bottiglia di vetro, identica a quella utilizzata per l’infusione “cold brews”, e si mescola per 5 secondi. La bottiglia è stata chiusa e i campioni sono stati lasciati in infusione

per 5 minuti a temperatura ambiente (21°C). L'infusione è stata agitata nuovamente per 5 secondi, e filtrata, come nel caso sopra descritto, attraverso un filtro a maglia fine e successivamente attraverso la carta da filtro Whatman n. 4.

Le infusioni a caldo, o “boiled/hot brews” (H) sono state preparate in modo simile alle infusioni standard, ma utilizzando un forno a microonde, aggiungendo acqua demineralizzata bollente (100°C) al materiale vegetale nella medesima bottiglia di vetro borosilicato, seguita da 5 secondi di agitazione, e 5 minuti di ebollizione in un forno a microonde (2450 MHz; potenza di energia del microonde utilizzata 1000 W). Al termine, l'infusione è stata nuovamente agitata per 5 secondi prima di essere filtrata con il filtro a maglia e carta filtro, come per gli altri tipi di infusione.

Tutte le infusioni di cui sopra sono state suddivise in parti uguali e conservate a -20°C fino all'analisi.

Ogni metodo di infusione è stato eseguito in triplicato per ciascun campione.

Per i campioni è stata utilizzata una nomenclatura che fa riferimento alla tipologia del campione, “fermentato” (R) e “non fermentato” (G), e alla modalità di infusione sottoposta: standard (X), a freddo (C) e a caldo (H). Per questo, ad esempio, il campione n.1 del rooibos non fermentato infuso a freddo prende il nome di G01C01. La tabella 2 riporta l'elenco dei campioni suddivisi per tipologia di rooibos e di infusione.

Tabella 2 Elenco nomenclatura dei campioni, suddivisa per tipologia di rooibos (fermentato e non fermentato) e di infusione (standard, a freddo e a caldo).

Tipo di infusione	Rooibos non fermentato			Rooibos fermentato		
X (infusione standard)	G01X01	G01X02	G01X03	R01X01	R01X02	R01X03
	G02X01	G02X02	G02X03	R02X01	R02X02	R02X03
	G03X01	G03X02	G03X03	R03X01	R03X02	R03X03
	G04X01	G04X02	G04X03	R04X01	R04X02	R04X03
	G05X01	G05X02	G05X03	R05X01	R05X02	R05X03
	G06X01	G06X02	G06X03	R06X01	R06X02	R06X03
	G07X01	G07X02	G07X03	R07X01	R07X02	R07X03
	G08X01	G08X02	G08X03	R08X01	R08X02	R08X03
	G09X01	G09X02	G09X03	R09X01	R09X02	R09X03
	G10X01	G10X02	G10X03	R10X01	R10X02	R10X03
	G11X01	G11X02	G11X03	R11X01	R11X02	R11X03
	G12X01	G12X02	G12X03	R12X01	R12X02	R12X03
C (infusione a freddo)	G01C01	G01C02	G01C03	R01C01	R01C02	R01C03
	G02C01	G02C02	G02C03	R02C01	R02C02	R02C03
	G03C01	G03C02	G03C03	R03C01	R03C02	R03C03
	G04C01	G04C02	G04C03	R04C01	R04C02	R04C03
	G05C01	G05C02	G05C03	R05C01	R05C02	R05C03
	G06C01	G06C02	G06C03	R06C01	R06C02	R06C03
	G07C01	G07C02	G07C03	R07C01	R07C02	R07C03
	G08C01	G08C02	G08C03	R08C01	R08C02	R08C03
	G09C01	G09C02	G09C03	R09C01	R09C02	R09C03
	G10C01	G10C02	G10C03	R10C01	R10C02	R10C03
	G11C01	G11C02	G11C03	R11C01	R11C02	R11C03
	G12C01	G12C02	G12C03	R12C01	R12C02	R12C03
H (infusione a caldo)	G01H01	G01H02	G01H03	R01H01	R01H02	R01H03
	G02H01	G02H02	G02H03	R02H01	R02H02	R02H03
	G03H01	G03H02	G03H03	R03H01	R03H02	R03H03
	G04H01	G04H02	G04H03	R04H01	R04H02	R04H03
	G05H01	G05H02	G05H03	R05H01	R05H02	R05H03
	G06H01	G06H02	G06H03	R06H01	R06H02	R06H03
	G07H01	G07H02	G07H03	R07H01	R07H02	R07H03
	G08H01	G08H02	G08H03	R08H01	R08H02	R08H03
	G09H01	G09H02	G09H03	R09H01	R09H02	R09H03
	G10H01	G10H02	G10H03	R10H01	R10H02	R10H03
	G11H01	G11H02	G11H03	R11H01	R11H02	R11H03
	G12H01	G12H02	G12H03	R12H01	R12H02	R12H03

3.3 STRUMENTAZIONI

3.3.1 LABORATORIO

La decontaminazione dei materiali e la preparazione dei campioni sono state effettuate nel laboratorio *clean room*, ISO 14644-1 Classe 6, con aree ISO Classe 5 sotto flusso laminare (Tabella 3). La temperatura del laboratorio è impostata a 20 ± 1 °C durante l'inverno e a 23 ± 1 °C durante l'estate.

Sono stati indossati camici, calzari e guanti da *clean room* seguendo tutte le procedure previste per questo tipo di laboratorio durante tutte le fasi più critiche del trattamento e della preparazione dei campioni.

Tabella 3 Classi ISO relative alla *clean room*.

Classe Area	0.1 µm	0.2 µm	0.3 µm	0.5 µm	1 µm	5 µm
5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	292

Il funzionamento della *clean room* si basa sul principio di ricircolo forzato di aria super-filtrata in una stanza sigillata. Il sistema è costituito da ventilatori operanti a bassa velocità, i quali immettono nella stanza, attraverso il soffitto, un flusso laminare di aria precedentemente filtrata attraverso filtri ad alta efficienza (HEPA), posizionati all'esterno della stessa e aspirata attraverso griglie poste sul pavimento.

L'analisi dei campioni è stata effettuata in un laboratorio prossimo alla *clean room*, dove si trova lo spettrofotometro di assorbimento atomico con fornetto in grafite (GFAAS).

3.3.2 REAGENTI E SOLUZIONI STANDARD

L'acqua utilizzata per la preparazione di soluzioni standard, per il lavaggio dei materiali e per gli usi generali del laboratorio, viene prodotta attraverso un sistema Millipore Midi con trattamento a due stadi, che produce rispettivamente acqua deionizzata nel primo stadio (sistema Elix) e acqua elettrodeionizzata Milli-Q nel secondo stadio (sistema Milli-Q).

Al fine di evitare la contaminazione dei campioni stessi, per il loro trattamento, per la pulizia dei contenitori e per tutte le altre procedure analitiche, sono stati usati reagenti di grado superpuro o ultrapuro, con un contenuto di metalli pesanti molto basso.

Riguardo gli acidi, sono stati impiegati: HCl ultrapuro (32–35%, UpA), HCl superpuro (34–37%, SpA), HNO₃ ultrapuro (70%, UpA), HNO₃ superpuro (68%, SpA) e HNO₃ grado reagente (65%) della “Carlo Erba” (Mi, Italia). L'acido nitrico usato per la digestione dei campioni al microonde è superpuro (30%, Carlo Erba).

Gli acidi grado reagente sono stati utilizzati solo nei primi stadi del lavaggio dei materiali, gli acidi di grado superpuro nelle fasi finali del lavaggio degli stessi e nella preparazione dei campioni, mentre gli acidi di grado ultrapuro sono stati usati per la preparazione di soluzioni, bianchi e standard.

Le soluzioni standard dei metalli, impiegate per la quantificazione, vengono rinnovate ogni mese a partire da soluzioni di Fe e Al con concentrazione 1 g/L (Carlo Erba), mediante diluizione con acqua Milli-Q acidificata 2:1000 con HNO₃ ultrapuro.

3.3.3 DIGESTIONE DEI CAMPIONI

La strumentazione usata per la digestione dei campioni consiste in un Microonde MARS 5 (CEM Corporation, North Carolina, USA) con frequenza standard di 2450 MHz (Fig. 12).

Il principio su cui si basa il microonde è l'impiego dell'energia delle microonde, prodotte da un apposito generatore (magnetron) al fine di accelerare il processo di digestione del campione. Le microonde sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti che causano un aumento dell'energia vibrazionale di molecole con momento dipolare, senza modificarne la struttura, attivando transizioni rotazionali dei legami molecolari polarizzati o polarizzabili, la migrazione degli ioni e il moto degli elettroni in materiali metallici. Così le molecole d'acqua e le specie ioniche del solvente, energizzate, collidono con le altre molecole trasferendo energia alla matrice.

La digestione assistita da microonde è applicata per la maggior parte all'analisi ambientale degli inquinanti (Buldini, Ricci e Lal Sharma 2002)



Figura 12 Microonde MARS 5

Il sistema a microonde impiegato è dotato di un carrello circolare all'interno del quale è possibile inserire fino a 14 contenitori (*vessel*) in teflon PFA, trasparenti alle

microonde, di cui uno è il contenitore pilota (*control vessel*), sul quale vengono monitorati i parametri pressione e temperatura durante l'intero processo di digestione, mediante un'apposita sonda in fibra ottica.



Figura 13 Contenitori in Teflon PFA (sinistra); sonda in fibra ottica (destra).

Per ciascuna operazione di digestione è necessario impostare un programma di lavoro, nel quale vengono definiti i seguenti parametri:

- Potenza in Watt e percentuale di utilizzo;
- Pressione;
- Temperatura;
- Tempo di raggiungimento dei parametri di pressione e temperatura impostati (rampa);
- Tempo di mantenimento dei parametri impostati (hold-time);
- Tempo di raffreddamento.

Nella Tabella 4 sono elencati i parametri che vengono impostati al microonde per la digestione dei campioni di rooibos.

Tabella 4 Parametri impostati del microonde per la digestione.

Fase	Potenza (W)	Potenza (%)	Tempo (min)
1	400	52	2:00
2	400	61	2:00
3	400	70	5:00

Vengono inseriti 5 ml di campioni nei contenitori di teflon PFA con 3 ml di HNO₃ di grado superpuro, poi si effettua la digestione al microonde; successivamente la soluzione ottenuta viene portata a 10 ml con 2 ml di acqua Milli-Q e conservata a +4° C in una provetta da 10 ml (Mendil, et al. 2013).

3.3.4 DETERMINAZIONE DEL PESO COSTANTE DEI CAMPIONI

La bilancia microanalitica elettronica computerizzata Mettler AT216 (risoluzione 0.01 mg, ripetibilità DS = 0.015 mg) (Fig. 14) per pesate di precisione è stata usata per individuare la massa delle capsule di nichel fino ad ottenere per ciascuna un peso costante (± 0.2 mg).

La medesima procedura è stata utilizzata per individuare la massa delle capsule di nichel contenenti i campioni dopo l'evaporazione su piastra riscaldante e il ciclo di riscaldamento in stufa – raffreddamento – pesata è stato ripetuto fino ad ottenere un peso costante (± 0.2 mg) per ciascuna capsula.

Per l'essiccazione è stata utilizzata una stufa da laboratorio Binder (USA) a ventilazione forzata che lavora in un range di temperatura che va da 5 °C sopra la temperatura ambiente fino ad un massimo di 300 °C (precisione ± 0.1 °C a 50 °C). Per l'analisi è stata impostata la temperatura di 100 °C.



Figura 14 Bilancia microanalitica Mettler AT216

3.4 METODOLOGIE ANALITICHE

3.4.1 SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO

La spettrofotometria di assorbimento atomico (Atomic Absorption Spectrophotometric), tecnica analitica introdotta nel 1955 da A. Walsh, è oggi una delle tecniche maggiormente impiegate per l'analisi qualitativa e, soprattutto, quantitativa degli elementi in tracce, in modo particolare dei metalli, in un vasto numero di matrici: da quelle ambientali (acque e terreni), fino agli alimenti e leghe metalliche (Cozzi et al., 2016).

Il principio di funzionamento si basa sull'assorbimento atomico: quando un atomo viene investito da radiazioni elettromagnetiche con una determinata frequenza (UV/Visibile), assorbe energia e salta ad un livello energetico superiore. Ciò accade quando l'elettrone esterno acquista energia pari a quella necessaria per il salto energetico:

$$\Delta E = (E_2 - E_1) = h\nu$$

Equazione 1 h è la costante di Planck ($6.6262 \cdot 10^{-34}$ J·s) e ν è la frequenza.

Questo elettrone va quindi a occupare un orbitale di energia superiore (Fig. 15). Questo fenomeno ha una durata compresa dai 10^{-14} ai 10^{-7} s, dopo di che segue il fenomeno di rilassamento (quenching), in cui l'energia assorbita si disperde rapidamente negli urti con altre particelle e l'elettrone torna nell'orbitale di partenza.

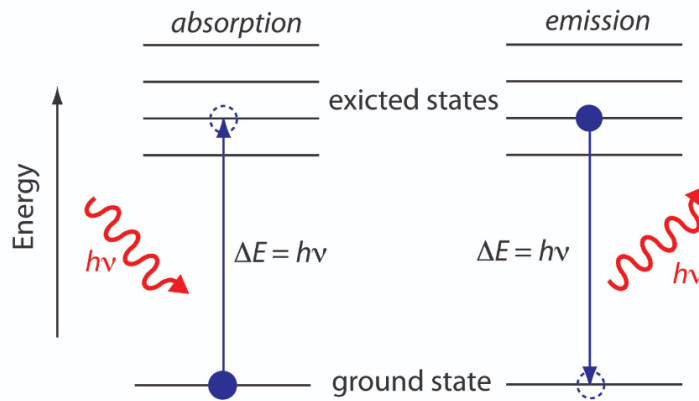


Figura 15 Fenomeno dell'assorbimento e dell'emissione atomica.

Ogni atomo dispone di un numero proprio di elettroni, i quali sono situati su determinati orbitali; è quindi possibile individuare gli spettri di assorbimento atomico caratteristici, costituiti da una serie di *righe di risonanza*, la cui intensità è proporzionale alla probabilità di transizione elettronica corrispondente.

Le righe osservate non sono monocromatiche, ma hanno un'ampiezza dell'ordine di 0.002 nm. Questa condizione è denominata "allargamento della riga spettrale" e deriva dalla somma di tre differenti fattori:

- *Allargamento di Lorentz*: gli atomi si urtano continuamente e le collisioni fanno variare, anche se di poco, i livelli energetici degli atomi stessi (di conseguenza l'assorbimento delle radiazioni avviene a frequenze non rigorosamente esatte, ma entro una ristrettissima gamma di queste). Dato che gli urti sono casuali, si avrà una banda (molto ristretta di frequenze) con andamento gaussiano.

- *Allargamento Doppler*: quando assorbono o emettono radiazioni, gli atomi sono in continuo movimento, sia rispetto alla sorgente, che al rilevatore. Di conseguenza la frequenza assorbita (o emessa) da ogni atomo è, sia pur lievemente, diversa da quella emessa dalla sorgente (o raccolta dal rilevatore).

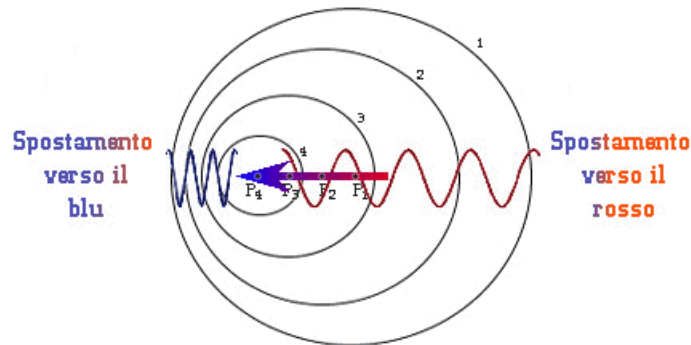


Figura 16 Effetto Doppler

- *Allargamento naturale*: la radiazione elettromagnetica ha una doppia natura, particellare e ondulatoria. Secondo il principio di indeterminazione di Heisenberg, esiste una relazione precisa tra il tempo (ΔT) che un atomo trascorre in un determinato stato quantico e l'energia di questo stato. Tale energia non è ben definita, ma si colloca in un intervallo (ΔE) di possibili valori, secondo l'equazione 2:

Equazione 2
$$\Delta E \times \Delta T \geq \frac{h}{4\pi}$$

In altri termini, l'ampiezza dell'intervallo energetico tende a zero ($\Delta E \rightarrow 0$) quando la durata tende a infinito ($\Delta T \rightarrow \infty$), ma questa condizione vale solo per lo stato fondamentale.

Gli stati eccitati sono di breve ($\Delta T \rightarrow 0$) durata e quindi l'intervallo delle possibili energie si allarga ($\Delta E \rightarrow \infty$); di conseguenza, anche le righe spettrali si allargano in una banda di ampiezza $D\nu$. Tale contributo resta notevolmente inferiore rispetto agli allargamenti di collisione e di Doppler.

3.4.2 ASSORBIMENTO ATOMICO E CONCENTRAZIONE

Per determinare la quantità di analita, il campione in cui è contenuto viene atomizzato tramite un sistema di riscaldamento (fiamma o fornetto in grafite) e i suoi atomi eccitati con radiazioni di opportuna lunghezza d'onda. La radiazione assorbita (*flusso radiante*) viene poi misurata.

Alle normali temperature di esercizio, una minima parte degli atomi si trova già in uno stato termicamente eccitato e, di conseguenza, questi non partecipano al processo di assorbimento che si intende misurare. Questi atomi possono andare incontro a un processo di rilassamento per via radiante, emettendo radiazioni che si sommano a quelle in uscita dal campione, le quali possono ridurre l'entità di assorbimento. Tuttavia, applicando l'equazione di Boltzmann (equazione 3) si può notare come a temperatura ambiente, la percentuale di atomi eccitati sia trascurabile (con dislivello energetico tipico di 2.5 eV la popolazione del primo livello eccitato è pari a una percentuale di $3.7 \times 10^{-43}\%$).

$$\%_{\text{atomi eccitati}} = \left(\frac{n_{\text{eccitati}}}{n_{\text{stato fondamentale}}} \times 100 \right) = \left(e^{\frac{\Delta E}{kT}} \right) \times 100$$

Equazione 3 - Equazione di Boltzmann; K è la costante di Boltzmann ($8,617385 \cdot 10^{-5}$ eV/K) e T è la temperatura in gradi Kelvin.

L'assorbimento, che dipende dal numero di atomi nello stato fondamentale, è direttamente proporzionale all'intera popolazione di atomi presenti sul cammino ottico della radiazione e quindi alla concentrazione dell'elemento nel campione (se l'atomizzazione viene ottenuta con una fiamma) oppure alla quantità dell'elemento (se l'atomizzazione viene ottenuta con sistemi senza fiamma). In queste condizioni l'assorbimento atomico, sia pure in un intervallo di linearità abbastanza ristretto, segue

una legge analoga alla legge di Lambert-Beer, descritta per l'assorbimento molecolare. Per un generico elemento eccitato da una radiazione monocromatica i cui atomi siano dispersi in fase gassosa si ha che:

$$A=x \times b \times n$$

- $A = \log \frac{I_0}{I}$ (con I_0 radiazione entrante e I radiazione uscente) è l'assorbanza;
- x è il coefficiente spettrale di assorbimento atomico, che caratterizza la riga di risonanza analitica*;
- b è lo spessore dello strato assorbente (ovvero il cammino ottico della radiazione);
- n è il numero totale di atomi liberi, proporzionale alla concentrazione del campione.

*Si definiscono righe di risonanza, quelle che partono da transizioni dal livello fondamentale. Il coefficiente spettrale di assorbimento atomico è il corrispettivo dell'assorbanza molecolare (ϵ) della legge di Lambert-Beer.

3.4.3 STRUMENTAZIONE

L'insieme di tutte le parti ottiche e meccaniche necessarie a generare, guidare, disperdere, selezionare e rivelare l'energia radiante viene definito spettrofotometro.

Spettrometria di assorbimento atomico a fornello di grafite

Per le analisi effettuate è stato usato il GFAAS (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometric*) con sistema di atomizzazione interamente automatizzato (GTA 120 Graphite Tube Atomizer, Agilent Technologies).

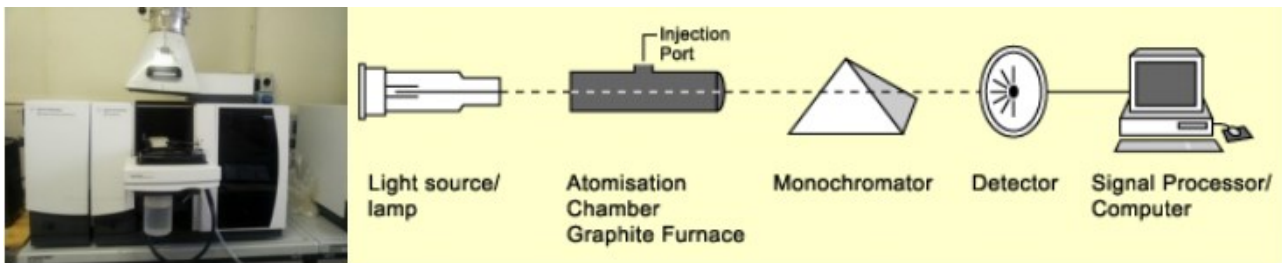


Figura 17 Spettrofotometro di assorbimento atomico con fornello in grafite (sinistra); Diagramma delle componenti principali di GFAAS (destra).

Lo spettrofotometro GFAAS è costituito principalmente dai seguenti componenti:

1. Sorgente. La sorgente dello spettrofotometro GTA 120 è costituita da una lampada a catodo cavo (*Hollow Cathode Lamp*), in cui l'emissione della radiazione eccitante è prodotta da un catodo cilindrico cavo, costituito dall'elemento da analizzare o da una sua lega. Il bulbo della lampada, in vetro con una finestra di quarzo, è riempito da argon o neon. Quando viene applicata una differenza di potenziale (d.d.p.) opportuna agli elettrodi, il gas di riempimento si ionizza parzialmente (*ionization*). Gli ioni positivi, accelerati dal campo elettrico, urtano il catodo e provocano l'espulsione degli atomi superficiali (*sputtering*). Si formano così atomi vaporizzati che, eccitati dagli urti con il gas di riempimento (*excitation*), emettono energia radiante (*emission*).

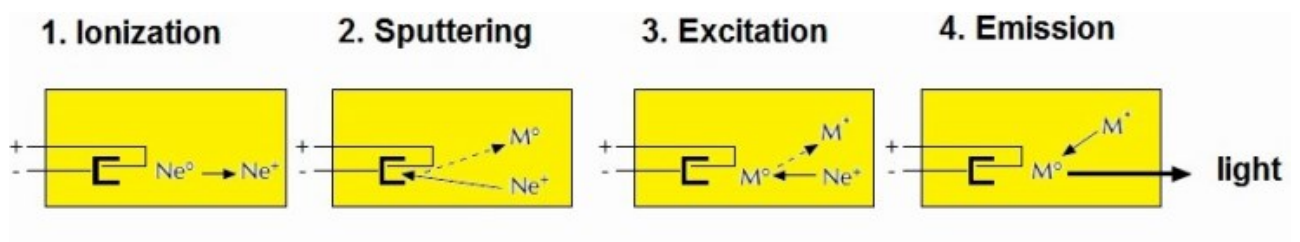


Figura 18 Principio di funzionamento di una lampada a catodo cavo.

2. Sistema di atomizzazione. Al fine di atomizzare la matrice entro cui è contenuto l'analita, il GFAAS è dotato di un sistema di atomizzazione a fornello di grafite (o fornello di massa) (Fig. 18). Tale sistema consente di abbassare notevolmente (fino a 1000 volte) i limiti di rivelabilità rispetto a quello con fiamma, permettendo di

misurare concentrazioni di $0.01 \mu\text{g/L}$ e di lavorare su aliquote molto piccole di campione. Un auto-campionatore introduce un volume noto di campione (da 20 a $40 \mu\text{L}$) all'interno del tubo di grafite, posto sul cammino ottico della radiazione emessa dalla sorgente. Al fine di espellere l'aria ed evitare condizioni ossidanti, viene fatto fluire un gas inerte (argon) all'interno del tubo. Successivamente all'introduzione del campione, il tubo di grafite (materiale a elevata conducibilità elettrica) viene riscaldato per mezzo di una resistenza elettrica, secondo un preciso programma a più stadi che varia in base all'elemento da analizzare, al fine di garantire la combustione della componente organica (che risulta essere un interferente) e un'efficiente atomizzazione nello stadio di massima temperatura. Generalmente, il programma impostato prevede tre fasi di durata differente, condotti a temperature crescenti: una prima fase di rimozione del solvente, seguita dall'incenerimento (pirolisi) del campione e, infine, l'atomizzazione vera e propria. La misura di assorbimento viene fatta sui vapori atomici che si liberano rapidamente nello stadio finale.

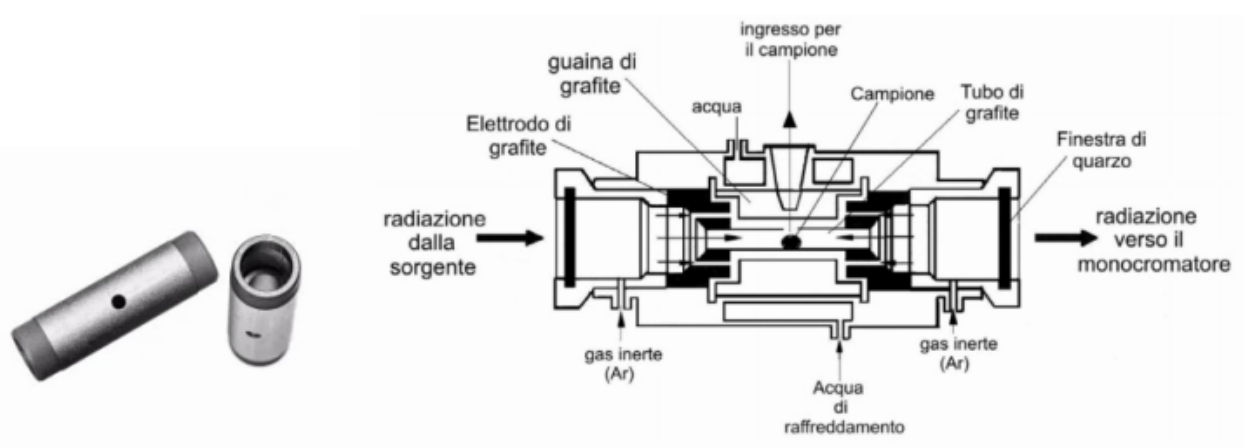


Figura 19 Fornetti in grafite (sinistra); Sezione longitudinale di un fornello in grafite (destra).

3. Sistema di controllo delle interferenze. Durante un'analisi mediante spettrofotometria di assorbimento atomico possono verificarsi numerose

interferenze; queste vengono distinte in interferenze spettrali (da emissione, atomiche, molecolari, di scattering e di fondo non specifiche) e interferenze non spettrali (chimiche, fisiche e da ionizzazione). Le interferenze chimiche possono essere dovute alla formazione di composti refrattari all'atomizzazione e sono state eliminate con l'aggiunta di un modificatore chimico (Palladium matrix Modifier 7640: 10 g/L palladio in acido nitrico al 15%), un reagente che rende più volatile la matrice e meno l'analita, formato da 0.120 g di C₆H₈O₇, 200 μL di HNO₃ SpA, 200 μL di Pd e 600 μL di acqua Milli-Q. Le interferenze dovute all'assorbimento di fondo (dipendenti dall'assorbimento molecolare della matrice e dallo scattering) sono state eliminate mediante il sistema Zeeman, ovvero attivando e disattivando un campo magnetico che polarizza la riga di assorbimento in direzione perpendicolare alla riga emessa dalla lampada, facendo in modo che quest'ultima subisca solo l'assorbimento di fondo (non polarizzato).

4. Monocromatore e sistema ottico. Il monocromatore ha il compito di isolare la radiazione caratteristica dell'elemento di interesse. Nel monocromatore di Ebert (Fig. 20) la radiazione proveniente dalla lampada a catodo cavo, dopo aver attraversato il sistema di atomizzazione, entra nel monocromatore attraverso una fenditura di ingresso e raggiunge uno specchio concavo che la collima su un reticolo a dispersione ad alto potere dispersivo. La radiazione, dispersa dal reticolo, viene focalizzata tramite lo stesso specchio concavo sulla fenditura di uscita in direzione del rivelatore.

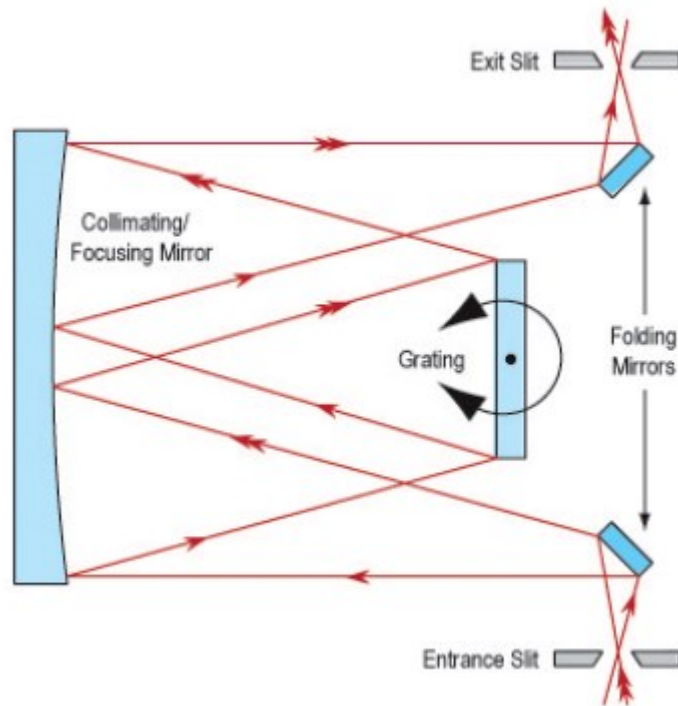


Figura 20 Monocromatore di Ebert

5. Rivelatore e sistema di lettura del segnale. L'intensità della radiazione trasmessa (ovvero, quella non assorbita dall'analita) deve essere convertita in un segnale elettrico ad essa proporzionale. Ciò avviene per mezzo di un fotomoltiplicatore, un particolare tipo di rivelatore utile nelle applicazioni a bassa intensità, costituito da due elettrodi opportuni all'interno di un'ampolla sottovuoto, con una finestra trasparente alle radiazioni (quarzo o vetro). La radiazione che giunge al primo catodo genera un'emissione di elettroni dalla sua superficie (effetto fotoelettrico). Gli elettroni emessi vengono accelerati da un campo elettrico e acquistano energia. Quando colpiscono la seconda superficie (dinodo) liberano un numero maggiore di elettroni rispetto a quello iniziale. Generando un effetto a cascata tramite la ripetizione di queste emissioni, il segnale iniziale subisce una notevole amplificazione (il fotone iniziale dopo 9 passaggi è amplificato di un fattore di circa 10^6).

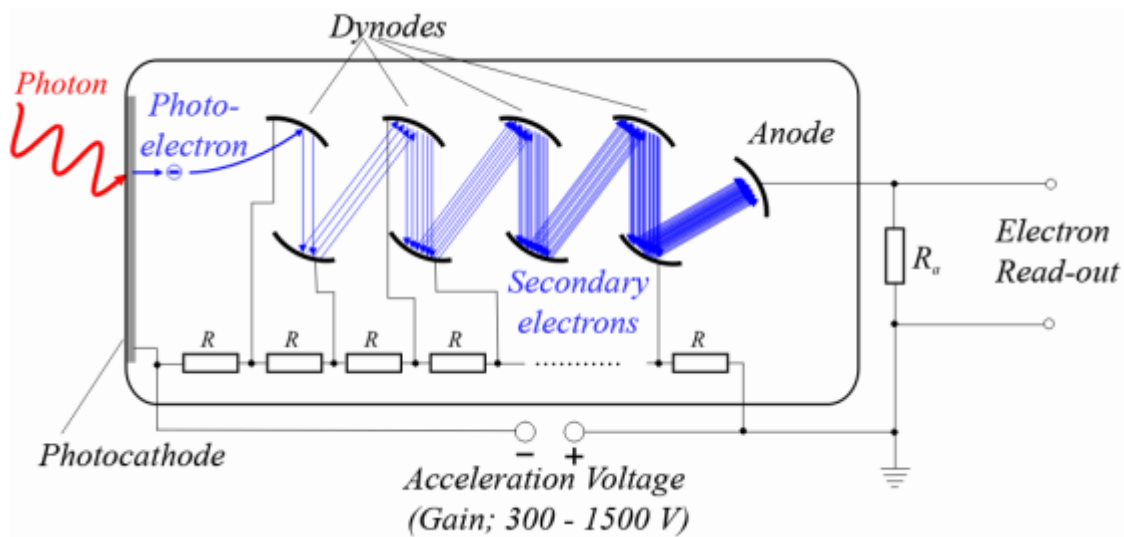


Figura 21 Principio di funzionamento di un fotomoltiplicatore.

6. Sistema di lettura del segnale e presentazione dati. Il segnale in uscita dal fotomoltiplicatore è, per sua natura, fluttuante e deve essere filtrato prima di essere trasmesso al microprocessore. Al termine della compensazione delle fluttuazioni, si ottiene un picco la cui area (o altezza) è direttamente proporzionale alla massa dell'analita presente allo stato atomico nel tubo di grafite (Fig. 21). In particolare, l'area rappresenta l'intera popolazione di atomi, mentre l'altezza dipende dalla concentrazione massima di atomi presenti nel fornetto durante lo stadio di atomizzazione. A questo punto il microprocessore comunica al sistema di elaborazione del segnale la trasmittanza; in base a questa, viene calcolata l'assorbanza del campione.

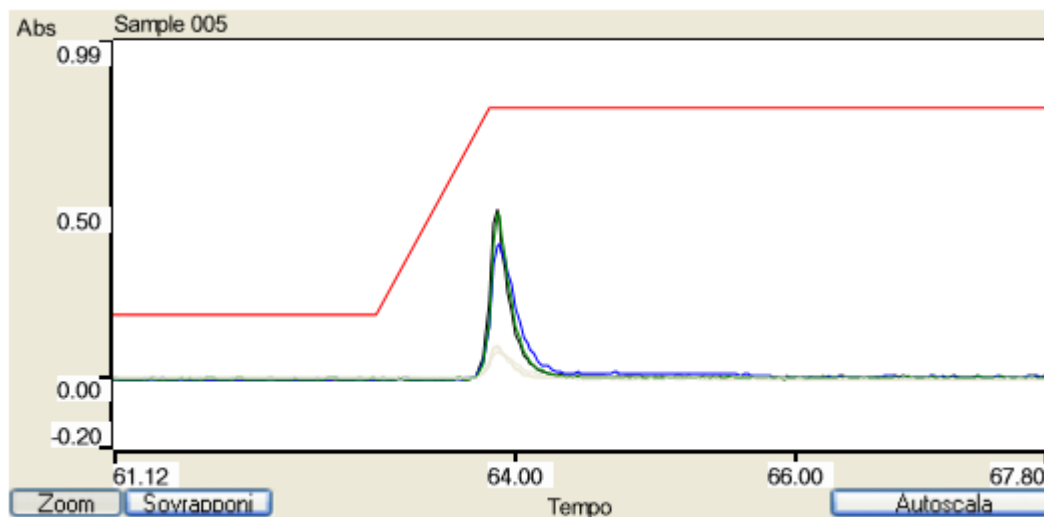


Figura 22 Segnale ottenuto mediante GFAAS.

Per le analisi dei metalli sono state usate lampade a catodo cavo multielemento (Fig.23). Il catodo per ciascuna lampada è ricoperto da più elementi compatibili in lega.



Figura 23 Lampade multielemento a catodo cavo (Agilent Technologies).

La Tabella 5 riporta i parametri strumentali di lunghezza d'onda, corrente della lampada, fessura, correzione dello sfondo e modalità di calibrazione.

Tabella 5 – Parametri strumentali usati per l’analisi di Fe e Al.

Parametri	Fe	Al
Wavelength (nm)	248.3	396.2
Lamp current (mA)	10.0	10.0
Slit (nm)	0.2	0.5
Background correction	Zeeman effect	Zeeman effect
Calibration mode	Calibration curve	Calibration curve

La Tabella 6 mostra le fasi di atomizzazione per Fe e Al con i corrispettivi parametri di temperatura, durata dello step e flusso.

Tabella 6 Fasi di atomizzazione in funzione di ferro e alluminio.

Element	Program step	Temperature (°C)	Time (s)	Gas flow (L/min)
Fe	1	85	5.0	0.3
	2	95	40.0	0.3
	3	120	10.0	0.3
	4	700	5.0	0.3
	5	700	1.0	0.3
	6	700	2.0	0.0
	7	2300	0.8	0.0
	8	2300	2.0	0.0
	9	2300	2.0	0.3
Al	1	85	5.0	0.3
	2	95	40.0	0.3
	3	120	10.0	0.3
	4	1000	5.0	0.3
	5	1000	1.0	0.3
	6	1000	2.0	0.0
	7	2500	0.8	0.0
	8	2500	2.0	0.0
	9	2500	2.0	0.3

Una volta misurata l'assorbanza, per quantificare il contenuto degli analiti è stato utilizzato il metodo della retta di taratura (calibration curve) (Fig. 24). Sono state eseguite 3 repliche nella fase di misura dell'assorbanza sia per le soluzioni standard che per i campioni. Tutte le misure sono state eseguite direttamente nelle soluzioni digerite tal quali.

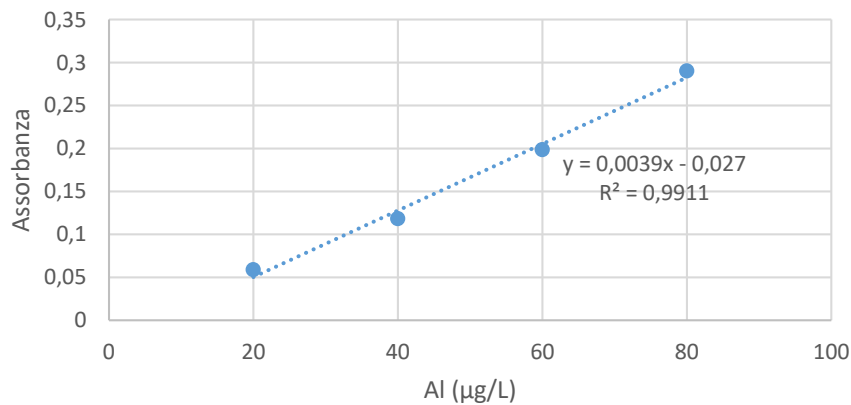


Figura 24 Esempio di retta di taratura per l'alluminio (Al)

3.4.4 BIANCO STRUMENTALE

Prima di effettuare l'analisi dei campioni è stato necessario analizzare il "bianco", ossia una soluzione composta da una matrice simile al campione, contenente tutti i suoi componenti ad eccezione dell'analita di interesse. In questo modo è possibile ottenere il segnale relativo alla "concentrazione zero" di analita.

Per il GFAAS il bianco è costituito da una soluzione di 3 ml di HNO₃ superpuro e 5 ml di Milli-Q digerita al microonde e successivamente portata a 10 ml con l'aggiunta di 2 ml di acqua Milli-Q. Questa determinazione è già inclusa nella procedura, che sottrae all'assorbanza del campione quella del rispettivo bianco.

3.4.5 ANALISI GRAVIMETRICA

L'analisi gravimetrica descrive un insieme di metodi utilizzati in chimica analitica per la determinazione quantitativa di un analita in base alla sua massa.

L'analisi consiste nell'isolare e pesare un elemento o un composto dell'elemento a stechiometria definita in una forma quanto più pura possibile. L'elemento (o il suo composto) devono essere isolati da un'aliquota pesata del campione in esame. Gran parte delle determinazioni nell'analisi gravimetrica coinvolgono la trasformazione dell'elemento o del radicale da quantificare in un composto puro stabile che possa poi essere facilmente convertito in una forma pesabile.

La separazione dell'elemento (o del suo composto) dal resto della matrice può essere effettuata:

- Per precipitazione;
- Per volatilizzazione (o evoluzione di gas);
- Attraverso metodi elettroanalitici;
- Attraverso metodi estrattivi o cromatografici.

È una tecnica molto esatta e precisa, quando si usano le moderne bilance analitiche.

Le possibili fonti di errore possono essere controllate in maniera relativamente facile:

- I filtrati possono essere controllati per verificare la completezza della precipitazione.
- I precipitati possono essere analizzati per verificare la presenza di eventuali impurezze.

È un metodo assoluto in quanto la quantificazione si basa su una misura diretta senza la necessità di alcun tipo di calibrazione e le determinazioni possono essere condotte con un apparato sperimentale relativamente poco costoso: gli elementi più costosi sono una muffola e, se necessario, un crogiolo di platino.

3.4.6 DETERMINAZIONE DEI SOLIDI SOLUBILI

L'analisi gravimetrica è stata utilizzata per determinare il contenuto di solidi solubili (SS). Per ciascun campione sono stati trasferiti 20 ml di estratto su capsule di nichel pre-pesate e portate ad evaporazione su piastra riscaldata fino ad essiccazione visibile. L'essiccazione è avvenuta in una stufa ad aria forzata di laboratorio Binder (USA) impostato a 100 ° C per 60 minuti, dopodiché i campioni sono stati raffreddati in essiccatore, e pesati. Il ciclo riscaldamento in stufa – raffreddamento – pesata è stato ripetuto fino ad ottenere un peso costante (± 0.2 mg). Infine, è stato calcolato il peso dei solidi solubili, espresso in mg/200 ml, per valutare il contenuto dei solidi solubili in una porzione standard “one-cup-serving”. Le Figure 25, 26 e 27 riportano alcune fasi della procedura di determinazione dei solidi solubili.



Figura 25 Piastra riscaldante. Evaporazione campioni.

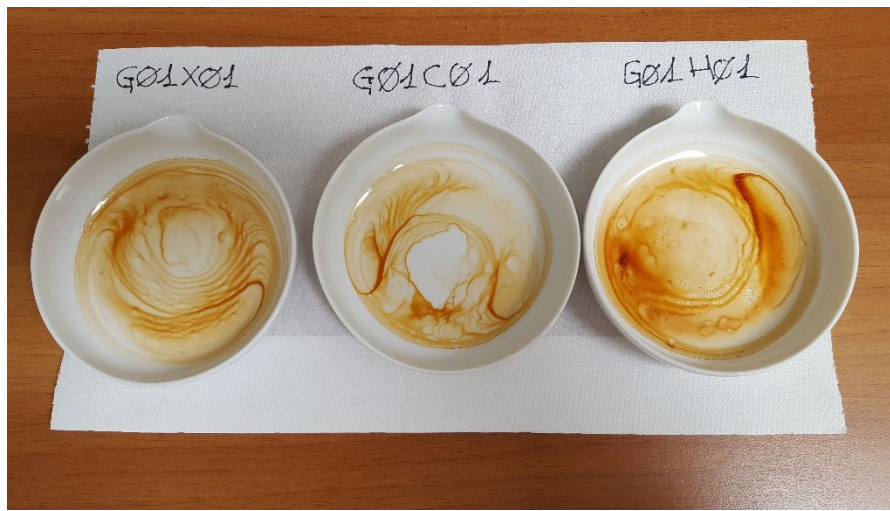


Figura 26 Campioni rooibos non fermentato.

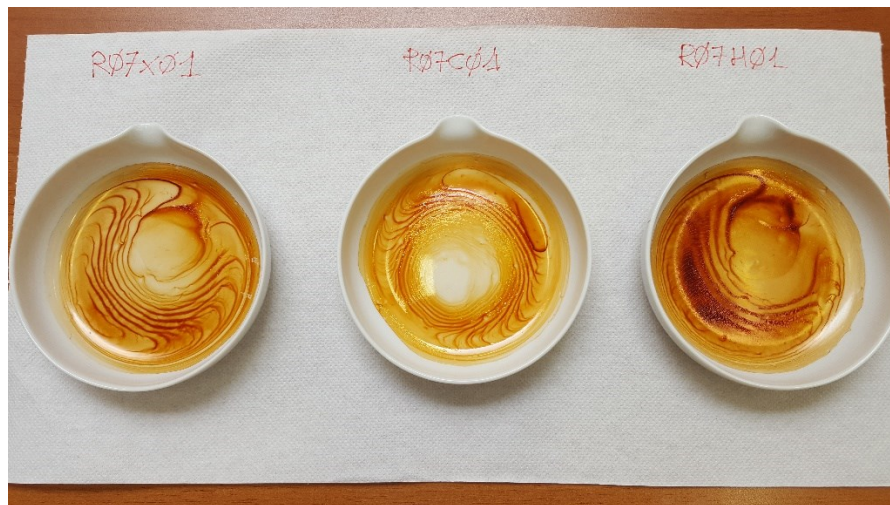


Figura 27 Campioni rooibos fermentato.

3.5 ANALISI STATISTICA

Al fine di comparare i risultati ottenuti tra i diversi campioni è stata utilizzata l'analisi della varianza (Test di ANOVA), seguita dal Multiple Range Test, utilizzando il software STATGRAPHICS Centurion 2018, (Manugistic Inc., Rockville, Maryland, USA).

La presenza di eventuali dati outliers è stata dimostrata con il test di Grubbs.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Il presente studio ha analizzato gli effetti dei diversi metodi di infusione di rooibos fermentati e non sul contenuto di ferro (Fe), alluminio (Al) e solidi solubili (SS). In particolare, si è voluto confrontare un metodo standard (X) di infusione (5 minuti di infusione in acqua bollente prima del filtraggio) con un metodo a freddo (C) (8 ore di infusione a temperatura ambiente prima del filtraggio) e un metodo a caldo (H) (5 minuti di infusione con acqua in ebollizione nel microonde a 1000 W di potenza).

4.1 RISULTATI

4.1.1 FERRO

Sono indicate in Tabella 7 e 8 le concentrazioni di ferro rilevate nei 12 infusi ottenuti con rooibos non fermentato e nei 12 ottenuti con rooibos fermentato, rispettivamente. I campioni sono stati suddivisi in base al tipo di infuso: X (infusione standard), C (infusione a freddo) e H (infusione a caldo). Per ogni campione sono state fatte 3 repliche, indicate in tabella con REP1, REP2, REP3. La colonna MEDIA \pm D.S. riporta la media aritmetica delle 3 repliche di ogni campione, seguita dalla deviazione standard (D.S.). Gli stessi dati li troviamo anche nelle Figure 28 e 29, che riportano la concentrazione di Fe negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato e fermentato, rispettivamente. Mediante il test di Grubbs, è stato possibile identificare dati significativamente anomali, cosiddetti “outliers”, che sono stati esclusi dalla trattazione statistica.

Il contenuto medio di Fe varia nei diversi infusi da un valore minimo a un valore massimo pari a:

- Infusi ottenuti da rooibos non fermentato: infuso X, 13 ± 3 - 33 ± 2 ; infuso C, 10 ± 1 - 35 ± 4 ; infuso H, 34 ± 2 - 74 ± 1 .
- Infusi ottenuti da rooibos fermentato: infuso X, 101 ± 5 - 148 ± 4 ; infuso C, 87 ± 3 - 121 ± 9 ; infuso H, 134 ± 6 - 151 ± 1 .

La Tabella 9 e la Figura 30 riportano le concentrazioni medie di Fe registrate nei 6 diversi tipi di infusi. In particolare, gli infusi ottenuti da rooibos non fermentato con infusioni standard e a freddo non mostrano differenze statisticamente significative tra loro, ma evidenziano una concentrazione di Fe significativamente più bassa (-64%) rispetto agli infusi ottenuti con infusione a caldo ($P=0.0011$). Anche per quanto riguarda gli infusi ottenuti da rooibos fermentato, si evidenziano differenze statisticamente significative tra le tre tipologie di infusione: l'infuso ottenuto a freddo mostra il contenuto di Fe più basso, mentre l'infuso ottenuto a caldo mostra il contenuto di Fe più alto ($P=0.0011$).

Tutti gli infusi ottenuti con rooibos non fermentato mostrano un contenuto di Fe significativamente più basso rispetto agli infusi ottenuti con rooibos fermentato ($P=0.0011$). In particolare, il contenuto di Fe negli infusi ottenuti con rooibos non fermentato rispetto ai corrispettivi infusi ottenuti da rooibos fermentato è pari a: -82% per l'infuso standard, -80% per l'infuso ottenuto a freddo e -59% per l'infuso ottenuto a caldo.

La Tabella 10 mostra le concentrazioni medie di Fe registrate nei 3 diversi tipi di infusi dei campioni di rooibos fermentato suddivisi per provenienza di produzione. Nello specifico i campioni 1-6 provenienti da Nieuwoudtville (Northern Cape, South Africa) e i campioni 7-12 provenienti da Clanwilliam (Western Cape, South Africa). Tutti gli

infusi ottenuti con rooibos fermentato proveniente da Clanwilliam hanno mostrato un contenuto leggermente superiore di Fe rispetto agli infusi ottenuti con rooibos fermentato proveniente da Nieuwoudtville, tuttavia la differenza non è statisticamente significativa ($P > 0.05$).

Tabella 7 Concentrazione di ferro negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato, suddivisi per tipologia di infusione: X, standard; C, a freddo; H, a caldo.

INFUSIONE	Nome CAMPIONE	REP1* µg/L	REP2* µg/L	REP3* µg/L	MEDIA±D.S. µg/L
X	G01X01	120	109	117	115§±6
	G02X01	19	24	23	22±3
	G03X01	26	27	25	26±1
	G04X01	14	14	15	14±1
	G05X01	34	34	31	33±2
	G06X01	17	15	16	16±1
	G07X01	21	22	19	21±1
	G08X01	32	34	32	33±1
	G09X01	22	21	21	22±1
	G10X01	16	16	15	16±1
	G11X01	17	17	17	17±1
	G12X01	16	14	10	13±3
C	G01C01	28	30	30	30±1
	G02C01	28	27	27	27±1
	G03C01	22	22	21	22±1
	G04C01	14	13	13	13±1
	G05C01	24	22	24	23±1
	G06C01	40	32	33	35±4
	G07C01	11	10	10	10±1
	G08C01	26	25	25	25±1
	G09C01	21	22	23	22±1
	G10C01	16	16	16	16±1
	G11C01	16	12	15	14±2
	G12C01	13	14	10	12±2
H	G01H01	69	69	59	66±6
	G02H01	72	70	63	68±5
	G03H01	68	69	67	68±1
	G04H01	117	112	106	111§±5
	G05H01	74	75	73	74±1
	G06H01	43	41	37	40±3
	G07H01	33	36	32	34±2
	G08H01	52	49	48	50±2
	G09H01	52	48	45	48±3
	G10H01	52	51	53	52±1
	G11H01	49	45	41	45±4
	G12H01	44	33	46	41±7

*: repliche per campione

§: outlier, test di Grubbs

Tabella 8 Concentrazione di ferro negli infusi ottenuti da campioni di rooibos fermentato, suddivisi per tipologia di infusione: X, standard; C, a freddo; H, a caldo.

INFUSIONE	Nome CAMPIONE	REP1* µg/L	REP2* µg/L	REP3* µg/L	MEDIA	MEDIA±D.S. µg/L
X	R01X01	106	112	117	112	112±6
	R02X01	129	133	142	135	135±6
	R03X01	122	125	132	126	126±5
	R04X01	102	103	106	104	104±2
	R05X01	104	119	111	111	111±8
	R06X01	96	105	104	101	101±5
	R07X01	103	109	110	107	107±4
	R08X01	151	150	144	148	148±4
	R09X01	129	123	115	122	122±7
	R10X01	119	111	105	112	112±7
	R11X01	146	125	121	131	131±14
	R12X01	116	120	111	115	115±5
C	R01C01	84	87	90	87	87±3
	R02C01	113	118	130	121	121±9
	R03C01	116	120	125	120	120±5
	R04C01	83	90	87	87	87±4
	R05C01	86	95	100	94	94±7
	R06C01	86	91	90	89	89±3
	R07C01	106	113	113	111	111±4
	R08C01	106	110	107	108	108±2
	R09C01	131	120	113	121	121±9
	R10C01	122	116	113	117	117±4
	R11C01	101	100	100	100	100±1
	R12C01	108	101	102	104	104±4
H	R01H01	138	142	150	143	143±6
	R02H01	143	142	152	146	146±5
	R03H01	146	142	152	147	147±5
	R04H01	127	138	135	134	134±6
	R05H01	132	140	135	136	136±4
	R06H01	133	137	135	135	135±2
	R07H01	140	144	141	142	142±2
	R08H01	152	149	151	151	151±1
	R09H01	145	139	137	140	140±5
	R10H01	152	147	146	148	148±3
	R11H01	141	145	144	143	143±2
	R12H01	142	141	141	141	141±1

*: repliche per campione

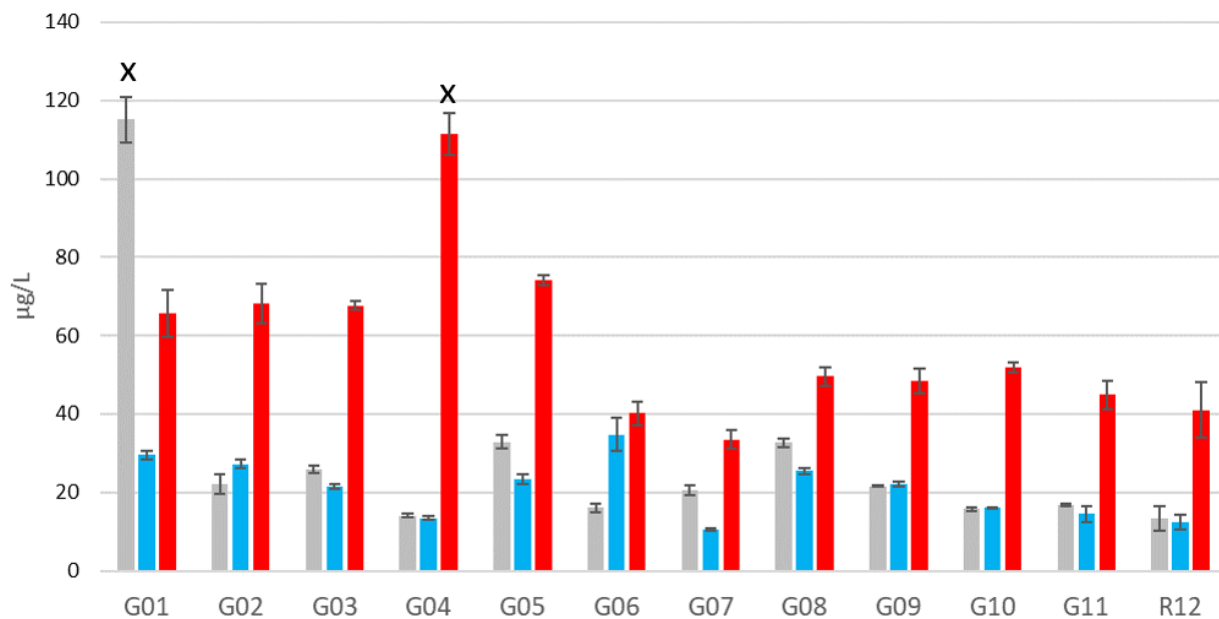


Figura 28 Concentrazione di ferro negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato. Barre grigie, infusione standard (X), barre azzurre, infusione a freddo (C), barre rosse, infusione a caldo (H). le barre di errore rappresentano la deviazione standard di 3 analisi. Le barre indicate con X riguardano dati outlier (test di Grubbs).

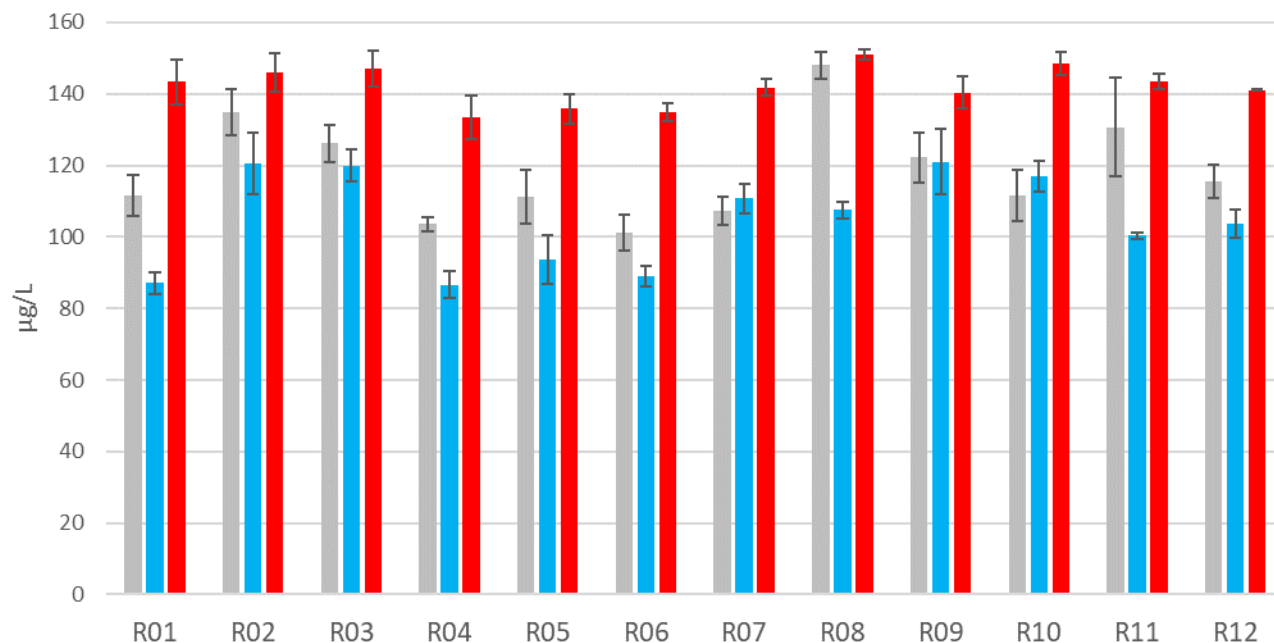


Figura 29 Concentrazione di ferro negli infusi ottenuti da campioni di rooibos fermentato. Barre grigie, infusione standard (X), barre azzurre, infusione a freddo (C), barre rosse, infusione a caldo (H). le barre di errore rappresentano la deviazione standard di 3 analisi.

Tabella 9 Contenuto medio di Fe negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato e non fermentato.

Infusione	Rooibos non fermentato (µg/L)	Rooibos fermentato (µg/L)
Standard (X)	21±2	119±7
Freddo (C)	21±2	105±5
Caldo (H)	53±3	142±4

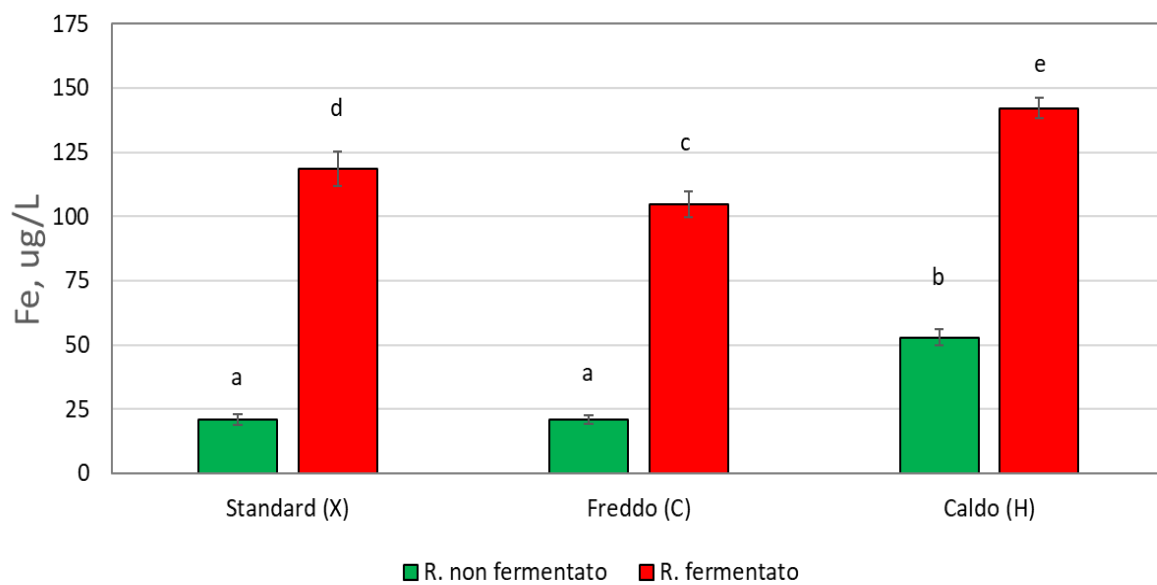


Figura 30 Contenuto medio di Fe negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato (barre rosse) e non fermentato (barre verdi).

Tabella 10 Contenuto medio di Fe negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato provenienti da due aree differenti (Nieuwoudtville, Northern Cape, South Africa e da Clanwilliam, Western Cape, South Africa).

Numero Campione	Provenienza Campioni	Standard (X) µg/L	Freddo (C) µg/L	Caldo (H) µg/L
1-6	Nieuwoudtville	115±4	99±4	140±4
7-12	Clanwilliam	123±5	110±3	144±2

4.1.2 ALLUMINIO

In Tabella 11 e 12 vengono riportate le concentrazioni di alluminio rilevate nei 12 infusi ottenuti con rooibos non fermentato e nei 12 ottenuti con rooibos fermentato, rispettivamente.

I campioni sono stati suddivisi in base al tipo di infuso: X (infusione standard), C (infusione a freddo) e H (infusione a caldo). Per ogni campione sono state fatte 3 repliche, indicate con REP1, REP2, REP3. La colonna MEDIA \pm D.S. riporta la media aritmetica delle 3 repliche di ogni campione, seguita dalla deviazione standard (D.S.). Gli stessi dati li troviamo anche nelle Figure 31 e 32, che riportano la concentrazione di Al negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato e fermentato, rispettivamente. Mediante il test di Grubbs, è stato possibile identificare dati significativamente anomali, cosiddetti “outliers”, che sono stati esclusi dalla trattazione statistica.

Il contenuto medio di Al varia nei diversi infusi da un valor minimo a un valore massimo pari a:

- Infusi ottenuti da rooibos non fermentato: infuso X, 46 \pm 4-129 \pm 2; infuso C, 34 \pm 1-106 \pm 8; infuso H, 64 \pm 4-218 \pm 4.
- Infusi ottenuti da rooibos fermentato: infuso X, 21 \pm 3-83 \pm 1; infuso C, 18 \pm 2-73 \pm 5; infuso H, 52 \pm 6-156 \pm 5.

La tabella 13 e la Figura 33 riportano le concentrazioni medie di Al registrate nei 6 diversi tipi di infusi. In particolare, gli infusi ottenuti da rooibos non fermentato con infusioni standard e a freddo non mostrano differenze statisticamente significative tra

loro, ma evidenziano una concentrazione di Fe significativamente più bassa (-45%) rispetto agli infusi ottenuti con infusione a caldo ($P=0.019$). Anche per quanto riguarda gli infusi ottenuti da rooibos fermentato, si evidenziano differenze statisticamente significative tra le tre tipologie di infusione: l'infuso ottenuto a freddo mostra il contenuto di Al più basso, mentre l'infuso ottenuto a caldo mostra il contenuto di Al più alto ($P=0.019$).

Tutti gli infusi ottenuti con rooibos fermentato mostrano un contenuto di Al significativamente più basso rispetto agli infusi ottenuti con rooibos non fermentato ($P=0.019$). In particolare, il contenuto di Al negli infusi ottenuti con rooibos fermentato rispetto ai corrispettivi infusi ottenuti da rooibos non fermentato è pari a: -30% per l'infuso standard, -49% per l'infuso ottenuto a freddo e -19% per l'infuso ottenuto a caldo.

La Tabella 14 mostra le concentrazioni medie di Al registrate nei 3 diversi tipi di infusi dei campioni di rooibos fermentato suddivisi per provenienza di produzione. Nello specifico i campioni 1-6 provenienti da Nieuwoudtville (Northern Cape, South Africa) e i campioni 7-12 provenienti da Clanwilliam (Western Cape, South Africa). Tutti gli infusi ottenuti con rooibos fermentato proveniente da Nieuwoudtville hanno mostrato un contenuto significativamente inferiore di Al rispetto agli infusi ottenuti con rooibos fermentato proveniente da Clanwilliam ($P<0.05$), con una differenza pari a: -22% per l'infuso standard, -31% per l'infuso a freddo e -33% per l'infuso a caldo.

Tabella 11 Concentrazione di alluminio negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato, suddivisi per tipologia di infusione: X, standard; C, a freddo; H, a caldo.

INFUSIONE	Nome CAMPIONE	REP1* µg/L	REP2* µg/L	REP3* µg/L	MEDIA±D.S. µg/L
X	G01X01	79	69	74	74±5
	G02X01	130	127	130	129±2
	G03X01	169	182	182	178§±7
	G04X01	49	41	48	46±4
	G05X01	48	47	48	48±1
	G06X01	49	48	48	48±1
	G07X01	58	61	58	59±2
	G08X01	59	65	63	63±3
	G09X01	68	68	68	68±1
	G10X01	86	86	84	86±1
	G11X01	77	76	74	76±1
	G12X01	91	92	93	92±1
C	G01C01	77	65	73	72±6
	G02C01	196	193	187	192§±5
	G03C01	48	42	46	45±3
	G04C01	55	56	50	54±3
	G05C01	62	63	64	63±1
	G06C01	97	109	113	106±8
	G07C01	34	34	35	34±1
	G08C01	62	68	62	64±3
	G09C01	87	87	88	88±1
	G10C01	107	106	105	106±1
	G11C01	55	57	57	56±1
	G12C01	104	103	96	101±4
H	G01H01	193	189	193	191±2
	G02H01	167	141	159	155±13
	G03H01	199	179	197	192±11
	G04H01	214	222	220	218±4
	G05H01	156	155	167	159±6
	G06H01	99	103	104	102±2
	G07H01	68	65	61	64±4
	G08H01	91	92	90	91±1
	G09H02	123	139	127	129±8
	G10H01	165	163	161	163±2
	G11H01	151	150	148	150±1
	G12H01	173	172	167	171±3

*: repliche per campione

§: outlier, test di Grubbs

Tabella 12 Concentrazione di alluminio negli infusi ottenuti da campioni di rooibos fermentato, suddivisi per tipologia di infusione: X, standard; C, a freddo; H, a caldo.

INFUSIONE	Nome CAMPIONE	REP1* µg/L	REP2* µg/L	REP3* µg/L	MEDIA±D.S. µg/L
X	R01X01	84	73	71	76±7
	R02X01	52	62	69	61±8
	R03X01	75	72	70	72±3
	R04X01	37	34	33	35±2
	R05X01	28	37	34	33±5
	R06X01	23	22	18	21±3
	R07X01	52	53	50	52±1
	R08X01	83	84	82	83±1
	R09X01	80	81	81	81±1
	R10X01	39	40	37	39±1
	R11X01	55	57	59	57±2
	R12X01	69	79	68	72±7
C	R01C01	17	24	16	19±4
	R02C01	59	44	39	47±11
	R03C01	38	26	30	32±6
	R04C01	16	19	20	18±2
	R05C01	47	45	43	45±2
	R06C01	24	26	21	24±2
	R07C01	89	97	96	94§±5
	R08C01	43	39	39	40±3
	R09C01	31	33	30	31±2
	R10C01	53	50	50	51±2
	R11C01	26	31	34	30±4
	R12C01	75	77	68	73±5
H	R01H01	117	86	86	96±18
	R02H01	111	141	121	124±16
	R03H01	88	106	88	94±10
	R04H01	59	51	47	52±6
	R05H01	67	67	60	65±4
	R06H01	242	262	255	253§±10
	R07H01	100	104	101	102±2
	R08H01	125	138	134	132±7
	R09H02	80	78	79	79±1
	R10H01	160	157	151	156±5
	R11H01	137	143	141	140±3
	R12H01	153	156	134	147±12

*: repliche per campione
§: outlier, test di Grubbs

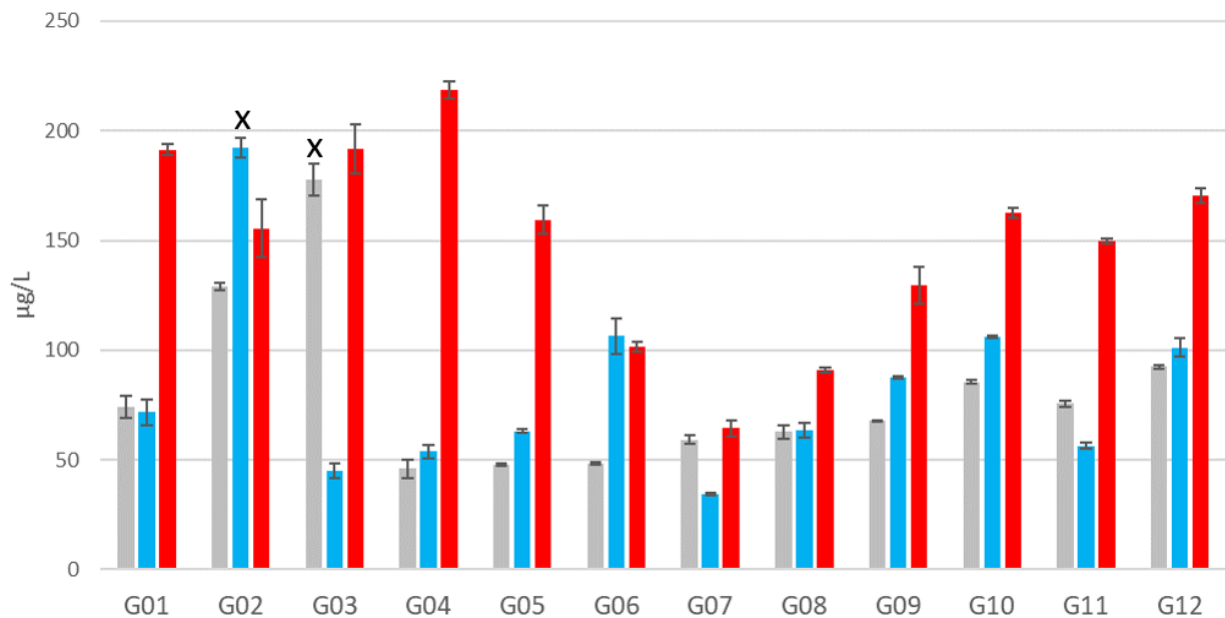


Figura 31 Concentrazione di alluminio negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato. Barre grigie, infusione standard (X), barre azzurre, infusione a freddo (C), barre rosse, infusione a caldo (H). le barre di errore rappresentano la deviazione standard di 3 analisi. Le barre indicate con X riguardano dati outlier (test di Grubbs).

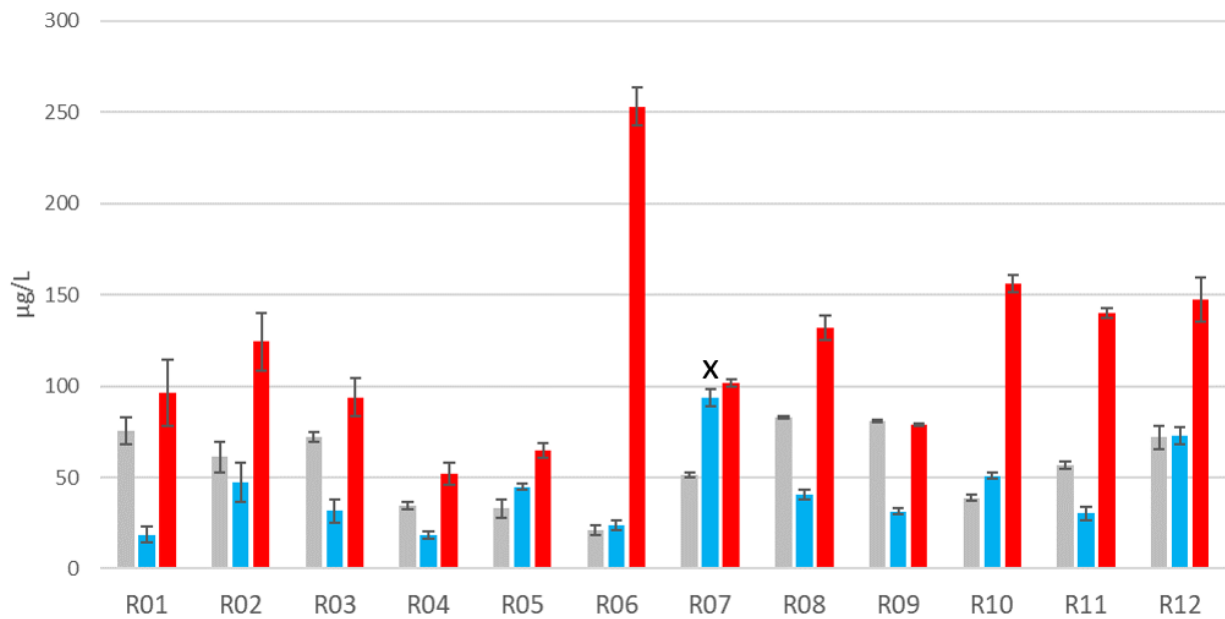


Figura 32 Concentrazione di alluminio negli infusi ottenuti da campioni di rooibos fermentato. Barre grigie, infusione standard (X), barre azzurre, infusione a freddo (C), barre rosse, infusione a caldo (H). le barre di errore rappresentano la deviazione standard di 3 analisi. Le barre indicate con X riguardano dati outlier (test di Grubbs).

Tabella 13 Contenuto medio di Al negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato e non fermentato.

Infusione	Rooibos non fermentato $\mu\text{g/L}$	Rooibos fermentato $\mu\text{g/L}$
Standard (X)	81 \pm 2	57 \pm 3
Freddo (C)	82 \pm 3	42 \pm 4
Caldo (H)	149 \pm 5	120 \pm 8

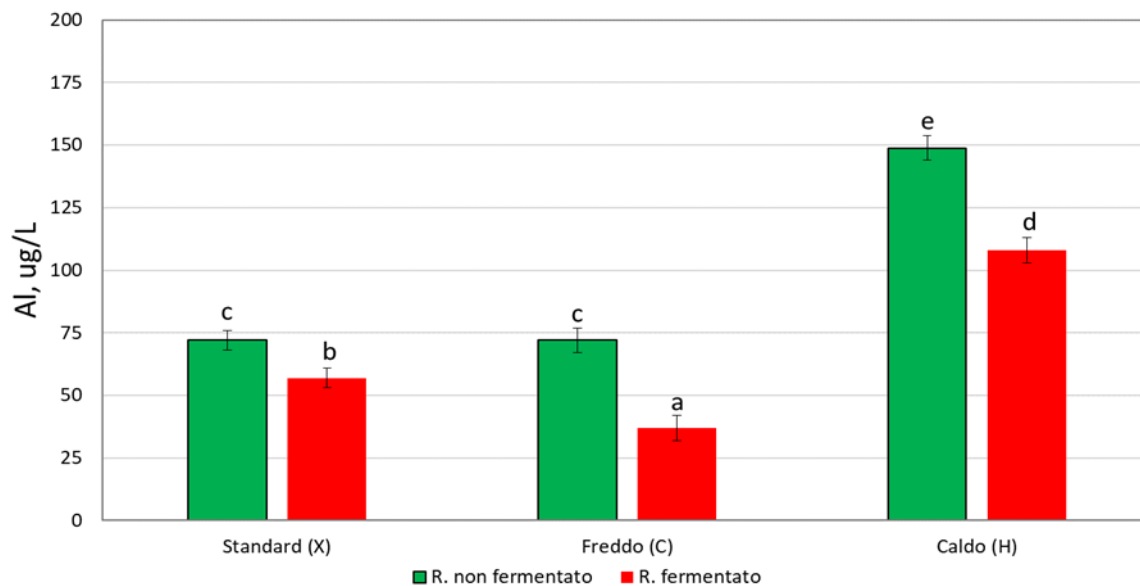


Figura 33 Contenuto medio di Al negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato (barre rosse) e non fermentato (barre verdi).

Tabella 14 Confronto medio di Al negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato provenienti da due aree differenti (Nieuwoudtville, Northern Cape, South Africa e da Clanwilliam, Western Cape, South Africa)

Numero Campione	Provenienza Campioni	Standard (X) $\mu\text{g/L}$	Freddo (C) $\mu\text{g/L}$	Caldo (H) $\mu\text{g/L}$
1-6	Nieuwoudtville	50 \pm 4	31 \pm 4	86 \pm 8
7-12	Clanwilliam	64 \pm 2	45 \pm 2	126 \pm 4

4.1.3 SOLIDI SOLUBILI

Le Tabelle 15 e 16 riportano il contenuto dei solidi solubili rilevati nei 12 infusi ottenuti con rooibos non fermentato e nei 12 ottenuti con rooibos fermentato, rispettivamente. I campioni sono stati suddivisi in base al tipo di infuso: X (infusione standard), C (infusione a freddo) e H (infusione a caldo).

Gli stessi dati li troviamo anche nelle Figure 34 e 35, che riportano la quantità di solidi solubili negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato e fermentato, rispettivamente.

Il contenuto medio di solidi solubili varia nei diversi infusi da un valor minimo a un valore massimo pari a:

- Infusi ottenuti da rooibos non fermentato: infuso X, 207 ± 8 - 426 ± 13 ; infuso C, 316 ± 25 - 426 ± 34 ; infuso H, 550 ± 38 - 739 ± 37 .
- Infusi ottenuti da rooibos fermentato: infuso X, 219 ± 32 - 344 ± 10 ; infuso C, 139 ± 20 - 264 ± 11 ; infuso H, 410 ± 20 - 612 ± 50 .

La tabella 17 e la Figura 36 riportano le concentrazioni medie di solidi solubili registrate nei 6 diversi tipi di infusi. Gli infusi ottenuti da rooibos non fermentato mostrano differenze statisticamente significative tra loro, con gli infusi ottenuti mediante infusione standard che presentano la quantità più bassa di SS e gli infusi ottenuti a caldo che presenta la quantità più alta. ($P < 0.0001$). Anche per quanto riguarda gli infusi ottenuti da rooibos fermentato, si evidenziano differenze statisticamente significative tra le tre tipologie di infusione: l'infuso ottenuto a freddo mostra il contenuto di SS più basso, mentre l'infuso ottenuto a caldo mostra il contenuto di SS più alto ($P < 0.0001$).

Tutti gli infusi ottenuti con rooibos fermentato mostrano un contenuto di SS significativamente più basso rispetto ai corrispettivi infusi ottenuti da rooibos non fermentato. In particolare, si evidenzia una percentuale di riduzione del contenuto di SS pari a: -16% per l'infuso standard, -45% per l'infuso ottenuto a freddo e -26% per l'infuso ottenuto a caldo.

La Tabella 18 mostra le concentrazioni medie di SS registrate nei 3 diversi tipi di infusi dei campioni di rooibos fermentato suddivisi per provenienza di produzione. Nello specifico i campioni 1-6 provenienti da Nieuwoudtville (Northern Cape, South Africa) e i campioni 7-12 provenienti da Clanwilliam (Western Cape, South Africa). Tutti gli infusi ottenuti con rooibos fermentato proveniente da Clanwilliam hanno mostrato un contenuto uguale o leggermente superiore di SS rispetto agli infusi ottenuti con rooibos fermentato proveniente da Nieuwoudtville con una differenza non statisticamente significativa ($P > 0.05$).

Tabella 15 Concentrazione di solidi solubili negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato, suddivisi per tipologia di infusione: X, standard; C, a freddo; H, a caldo.

INFUSIONE	Nome CAMPIONE	MEDIA mg /200 ml	MEDIA±D.S. mg /200 ml
X	G01X01	329	329±13
	G02X01	307	307±25
	G03X01	426	426±13
	G04X01	253	253±20
	G05X01	235	235±7
	G06X01	207	207±8
	G07X01	237	237±7
	G08X01	374	374±34
	G09X01	383	383±19
	G10X01	403	403±16
	G11X01	359	359±18
	G12X01	367	367±33
C	G01C01	358	358±18
	G02C01	426	426±34
	G03C01	362	362±25
	G04C01	373	373±15
	G05C01	372	372±26
	G06C01	396	396±20
	G07C01	316	316±25
	G08C01	416	416±17
	G09C01	376	376±30
	G10C01	383	383±15
	G11C01	351	351±25
	G12C01	409	409±20
H	G01H01	703	703±42
	G02H01	669	669±33
	G03H01	739	739±37
	G04H01	702	702±28
	G05H01	600	600±42
	G06H01	599	599±36
	G07H01	550	550±38
	G08H01	729	729±36
	G09H01	671	671±54
	G10H01	706	706±35
	G11H01	659	659±40
	G12H01	641	641±51

Tabella 16 Concentrazione di solidi solubili negli infusi ottenuti da campioni di rooibos fermentato, suddivisi per tipologia di infusione: X, standard; C, a freddo; H, a caldo.

INFUSIONE	N. CAMPIONE	MEDIA±D.S. mg /200 ml	MEDIA±D.S. mg /200 ml
X	R01X01	219	219±32
	R02X01	242	243±12
	R03X01	316	316±9
	R04X01	299	299±21
	R05X01	260	260±13
	R06X01	285	285±9
	R07X01	273	273±11
	R08X01	344	345±10
	R09X01	234	234±9
	R10X01	240	241±17
	R11X01	242	242±22
	R12X01	290	291±17
C	R01C01	139	139±20
	R02C01	205	205±11
	R03C01	224	225±13
	R04C01	210	210±15
	R05C01	191	191±15
	R06C01	203	203±16
	R07C01	264	264±11
	R08C01	262	262±24
	R09C01	179	179±5
	R10C01	223	223±13
	R11C01	152	152±8
	R12C01	242	243±15
H	R01H01	479	479±8
	R02H01	484	485±10
	R03H01	526	526±26
	R04H01	502	502±20
	R05H01	483	483±43
	R06H01	465	465±19
	R07H01	500	500±10
	R08H01	612	612±55
	R09H01	411	411±21
	R10H01	457	457±9
	R11H01	455	455±27
	R12H01	538	538±22

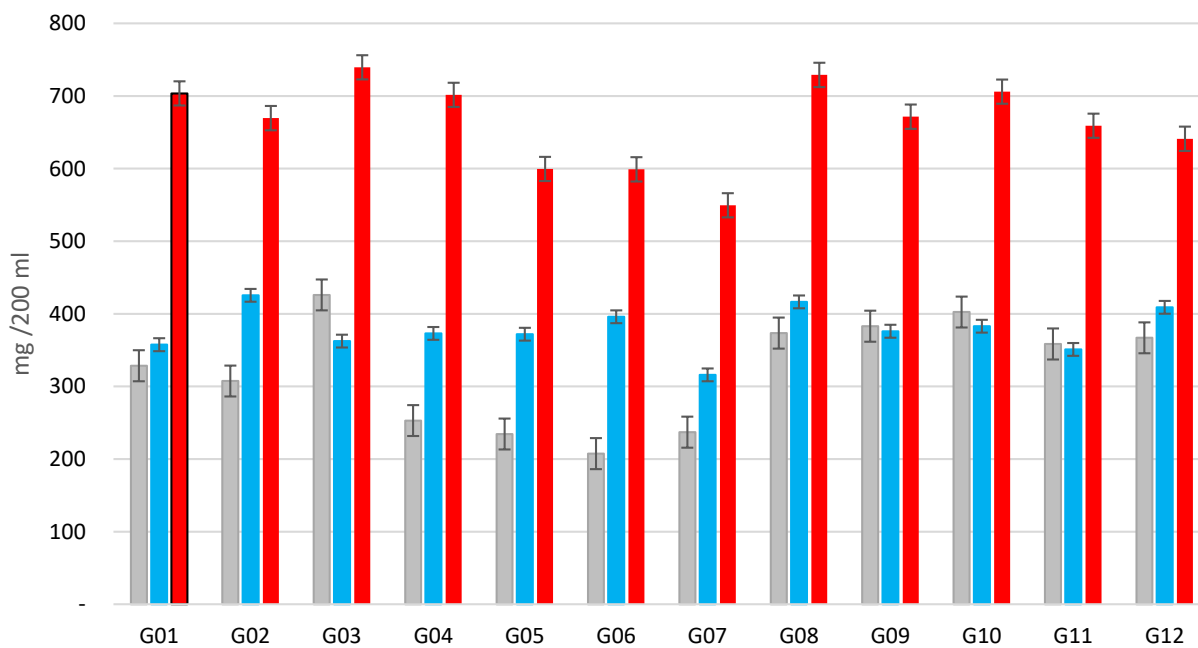


Figura 34 Concentrazione di solidi solubili negli infusi ottenuti da campioni di rooibos non fermentato. Barre grigie, infusione standard (X), barre azzurre, infusione a freddo (C), barre rosse, infusione a caldo (H). le barre di errore rappresentano la deviazione standard di 3 analisi.

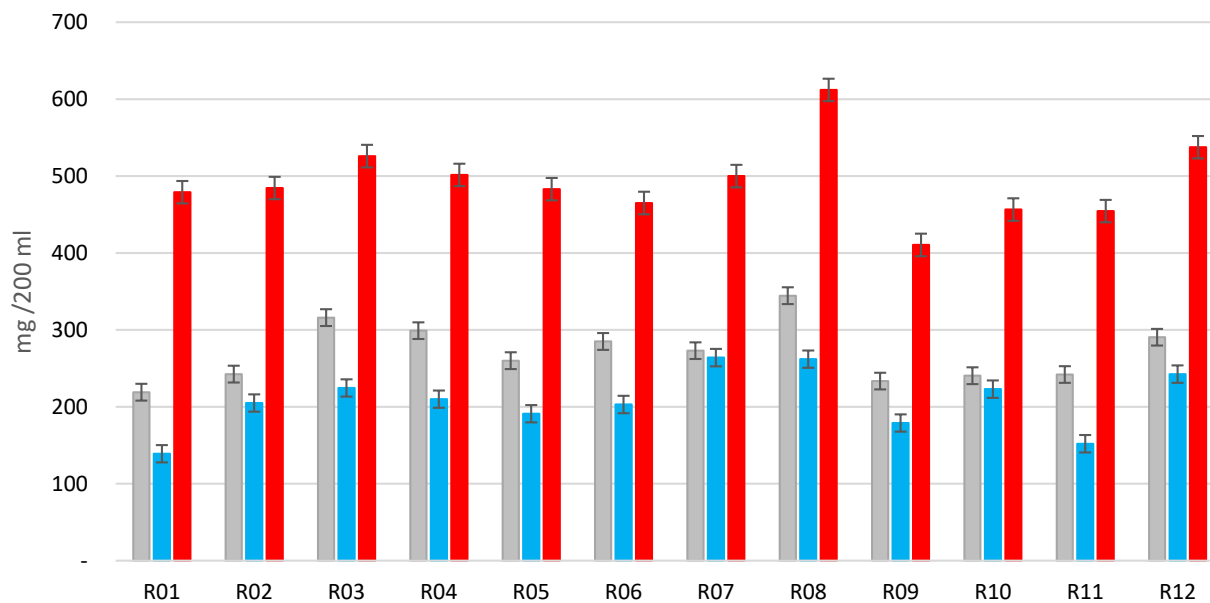


Figura 35 Concentrazione di solidi solubili negli infusi ottenuti da campioni di rooibos fermentato. Barre grigie, infusione standard (X), barre azzurre, infusione a freddo (C), barre rosse, infusione a caldo (H). le barre di errore rappresentano la deviazione standard di 3 analisi.

Tabella 17 Contenuto medio di S.S. negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato e non fermentato.

Infusione	Rooibos non fermentato mg/200ml	Rooibos fermentato mg/200ml
Standard (X)	323±18	270±15
Freddo (C)	378±23	208±14
Caldo (H)	664±39	493±23

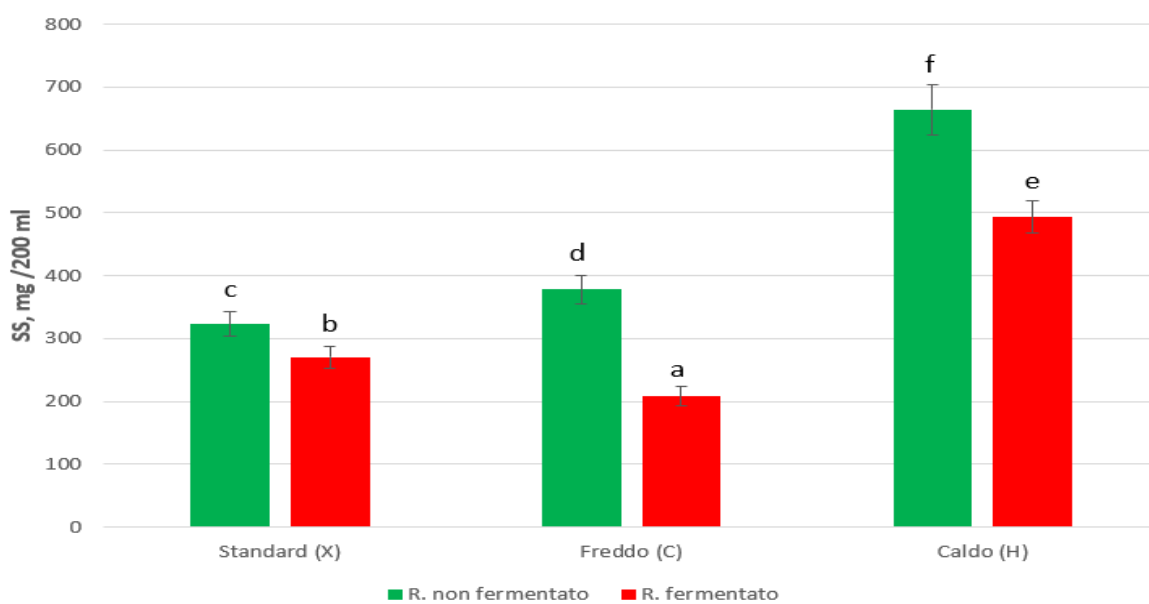


Figura 36 Contenuto medio di S.S. negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato (barre rosse) e non fermentato (barre verdi).

Tabella 17 Contenuto medio di SS negli infusi ottenuti da infusioni standard, a freddo e a caldo di campioni di rooibos fermentato provenienti da due aree differenti (Nieuwoudtville, Northern Cape, South Africa e da Clanwilliam, Western Cape, South)

Numero Campione	Provenienza Campioni	Standard (X) mg/200ml	Freddo (C) mg/200ml	Caldo (H) mg/200ml
1-6	Nieuwoudtville	270±13	195±11	490±17
7-12	Clanwilliam	271±11	220±10	495±20

4.2 DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi è stata determinata la quantità di ferro, alluminio e solidi solubili nelle infusioni standard, a freddo e a caldo ottenute da campioni di rooibos fermentato e non fermentato, per indagare se, e in che misura, gli infusi di rooibos preparati a freddo fossero diversi dagli infusi ottenuti con infusioni standard o a caldo in termini di quantità di Fe, Al e Solidi Solubili (SS).

L'interesse per questo argomento nasce della crescente popolarità del tè rooibos al di fuori del suo paese natale (Sudafrica), specialmente in Giappone, dove è comune prepararlo e servirlo anche come infusione a freddo, cioè eliminando l'uso di acqua calda o in ebollizione. L'infusione a freddo è particolarmente popolare nei mesi estivi caldi e umidi per la sua facilità di preparazione e per il sapore più fresco e leggero ottenuto dalla lenta estrazione.

In questo studio è stata inclusa anche una modalità di infusione che rispecchia la modalità di preparazione dell'infuso del consumatore moderno, utilizzando un forno a microonde per uso domestico. Tradizionalmente, una tazza di tè rooibos veniva preparata facendo sobbollire lentamente le foglie e gli steli in una pentola su una stufa calda (Joubert et al., 2008), ma questa pratica è caduta in disuso con l'introduzione delle bustine di tè negli anni '60 e la convenienza si è rivelata fondamentale con l'adozione del contemporaneo stile di vita affrettato.

4.2.1 FERRO

Il contenuto di Fe negli infusi di rooibos fermentato e non, come precedentemente visto, ha mostrato più o meno la stessa tendenza, con le infusioni a caldo che

determinano un contenuto di ferro significativamente più alto rispetto alle infusioni a freddo e standard.

Negli infusi di rooibos non fermentato il ferro ha mostrato una concentrazione simile negli infusi ottenuti con infusioni standard e a freddo (rispettivamente 21 ± 2 e 21 ± 2 $\mu\text{g/L}$), mentre nell'infuso ottenuto con infusione a caldo la concentrazione di Fe è significativamente maggiore (58 ± 3 $\mu\text{g/L}$). Tale tendenza si evince anche negli infusi di rooibos fermentato (rispettivamente 119 ± 7 e 105 ± 5 $\mu\text{g/L}$ negli infusi ottenuti con infusione standard e a freddo), con un aumento negli infusi a caldo (142 ± 4 $\mu\text{g/L}$).

Gli infusi di rooibos fermentato hanno rilevato una concentrazione significativamente maggiore di ferro, in tutti i tipi di infusione, rispetto a quelli del rooibos non fermentato: rispettivamente 119 ± 7 vs 21 ± 2 $\mu\text{g/L}$ per gli infusi da infusione standard, 105 ± 5 vs 21 ± 2 $\mu\text{g/L}$ per gli infusi a freddo e 142 ± 4 vs 58 ± 33 $\mu\text{g/L}$ per gli infusi a caldo.

Il rooibos contiene numerose molecole con potenziali effetti benefici sulla salute, come polifenoli, flavonoidi, aspalatina e tannini. È risaputo tuttavia, che durante il processo naturale di "fermentazione" il contenuto di aspalatina diminuisce sostanzialmente a causa della conversione ossidativa a flavoni e flavanone, tra gli altri, e che, inoltre, influisce sul contenuto totale di polifenoli (Joubert, 1996) (Krafczyk e Glomb, 2008) e solidi solubili.

Alla luce di quanto visto si potrebbe dedurre che i tannini legano il ferro rendendo meno disponibile nel rooibos non fermentato ma, a causa delle alterazioni dovute alla "fermentazione", il ferro risulta maggiormente disponibile nei campioni di rooibos fermentato.

Di fatto tutti i campioni di rooibos non fermentato presentano valori significativamente più bassi rispetto ai campioni di rooibos fermentato.

Si precisa, inoltre, che i campioni di rooibos fermentato provengono da due zone differenti del Sud Africa. Nello specifico, i primi 6 campioni hanno origine nell' area di Nieuwoudtville (Northern Cape, South Africa), mentre i campioni dal 7 al 12 provengono da Clanwilliam (Western Cape, South Africa). È interessante notare che dal confronto di questi campioni si evince che quelli provenienti da Clanwilliam presentano un quantitativo leggermente superiore di ferro in tutte le tipologie di infusione. Tali differenze potrebbero risiedere in diversi fattori quali: l'età delle piante al momento della raccolta, la genetica della pianta, condizioni del suolo, precipitazioni e altitudine.

Il ferro è un metallo essenziale per la vita, come trasportatore di ossigeno (emoglobina e mioglobina) e coenzima delle attività biologiche catalitiche. Secondo alcune affermazioni promozionali, fatte dai distributori commerciali, le bevande preparate con foglie di rooibos sono fonti preziose di diversi macro e microelementi.

L'assunzione giornaliera di riferimento del Fe è di 14 mg al giorno (UE N. 1169/2011) ma, a elevate concentrazioni (> 50 mg/giorno) provocano effetti gastrointestinali avversi (ad es. nausea, disagio epigastrico, costipazione) (EFSA, 2006) e varie patologie come ad esempio le malattie del fegato e del cuore, il diabete e le anomalie del sistema immunitario.

Di fatto la concentrazione di ferro rilevata nei campioni di rooibos fermentati e non, è risultata molto più bassa dell'assunzione giornaliera di riferimento, pertanto il consumo di rooibos sembrerebbe non comportare né ripercussioni né giovamenti evidenti sulla

salute umana. Nello specifico, una tazza di rooibos al giorno contribuirebbe per meno dello 0.2% all'assunzione giornaliera di riferimento. Paradossalmente per raggiungere l'assunzione giornaliera di riferimento, pari a 14mg, servirebbero circa 470 tazze al giorno di rooibos fermentato infuso a caldo e circa 1680 tazze al giorno per assumere un quantitativo di Fe > 50 mg, tale da provocare effetti dannosi per la salute.

4.2.2 ALLUMINIO

Negli infusi di rooibos non fermentato l'alluminio ha mostrato una concentrazione simile negli infusi ottenuti da infusione standard e a freddo (rispettivamente 81 e 82 µg/L) con un aumento significativo negli infusi a caldo (149 µg/L). Tale tendenza si evince anche negli infusi di rooibos fermentato (rispettivamente 57 e 42 µg/L negli infusi da infusione standard e a freddo), con un aumento negli infusi a caldo (120 µg/L).

Al contrario di quanto accaduto per il ferro, gli infusi di rooibos fermentato hanno rilevato una minore concentrazione di alluminio, in tutti i tipi di infusione, rispetto a quelle del rooibos non fermentato: rispettivamente 57 e 81 µg/L per gli infusi da infusione standard, 42 e 82 µg/L per gli infusi a freddo e 120 e 149 µg/L per gli infusi a caldo.

Si ricorda, inoltre, che i campioni di rooibos fermentato provengono da due zone differenti del Sud Africa. Nello specifico, i primi 6 campioni hanno origine nella area di Nieuwoudtville (Northern Cape, Sud Africa), mentre i campioni dal 7 al 12 provengono da Clanwilliam (Western Cape, Sud Africa). È interessante notare che i campioni provenienti da Clanwilliam presentano un maggior quantitativo di alluminio in tutte le tipologie di infusione rispetto ai campioni provenienti da Nieuwoudtville.

Pertanto, come per il ferro, anche per l'alluminio tali differenze potrebbero risiedere in diversi fattori quali: l'età delle piante al momento del raccolto, la genetica delle piante, condizioni del suolo, precipitazioni e altitudine.

La pianta del rooibos infatti cresce naturalmente in terreni sabbiosi e acidi con un alto contenuto di alluminio. Dallo studio di Kanu et al. (2013) sono stati evidenziati alti livelli di Al nelle radici della pianta di rooibos (1262 - 4078 mg/kg) suggerendo che *A. linearis* è in grado di accumulare un eccesso di Al in terreni acidi. Gli stessi autori hanno anche individuato livelli più alti nelle radici rispetto ai germogli, suggerendo che la pianta ha un meccanismo per limitare il movimento di Al ai tessuti sensibili.

I bassi livelli di Al riscontrati negli infusi analizzati in questo lavoro di tesi supportano questa ipotesi e /o un eventuale immagazzinamento dell'alluminio in una forma sequestrata scarsamente solubile in condizioni di infusione.

Sulla base degli effetti neurotossici l'EFSA ha definito una dose settimanale tollerabile (TWI) pari a 1 mg/kg p.c./settimana, corrispondente a 20 e 70 mg di alluminio/settimana, rispettivamente, per un bambino di 20 kg e per un adulto di 70 kg. Di fatto la concentrazione di alluminio è risultata molto più bassa della TWI, pertanto l'assunzione di questo tipo di infusi non comporta ripercussioni sulla salute umana. Una tazza di rooibos al giorno contribuirebbe per meno dello 0.3% all'assunzione massima di alluminio tollerabile (TWI).

4.2.3 SOLIDI SOLUBILI

Negli infusi di rooibos non fermentato i solidi solubili hanno mostrato una concentrazione simile negli infusi ottenuti da infusione standard e a freddo (rispettivamente 323 e 378 mg/200ml) e un aumento significativo negli infusi a caldo

(664 mg/200ml). Tale tendenza si evince anche negli infusi di rooibos fermentato (rispettivamente 270 e 208 mg/200ml negli infusi da infusione standard e a freddo), con un aumento negli infusi a caldo (493 mg/200ml).

Pertanto, tali valori mostrano l'impatto della temperatura dell'infusione sul contenuto dei solidi solubili. I risultati indicano chiaramente che la temperatura di infusione per i due metodi di infusione standard e a caldo, è un fattore importante che porta ai risultati di cui sopra, dal momento che il tempo di estrazione è lo stesso (5 min.), ma la temperatura è diversa (non costante vs costante 100° C, rispettivamente) (Joubert, 1990). Inoltre, il riscaldamento dielettrico a microonde rispetto al riscaldamento convenzionale accelera il trasferimento di energia e facilita la penetrazione del solvente nella matrice e la solvatazione di componenti vegetali, con conseguente estrazione più efficiente (Duarte et al., 2014).

Questi risultati sono in accordo con altri studi relativi al contenuto di solidi solubili (Muller, 2020) e flavonoidi (Damiani et al., 2019) nelle infusioni standard, a freddo e a caldo dei campioni di rooibos fermentato e non fermentato.

Chiaramente, la temperatura di infusione è un fattore importante quando si confrontano le infusioni a freddo con le infusioni a caldo per i campioni di rooibos fermentato e non fermentato. Tuttavia, per i rooibos non fermentati questo fattore non sembra essere dominante tra le infusioni a freddo e le infusioni standard in quanto sono stati rilevati valori di solidi solubili simili, indicando che il tempo di preparazione è un fattore decisivo.

Probabilmente, lasciando il materiale vegetale dei rooibos fermentati in infusione per 5 minuti in acqua appena bollita, come per il metodo standard, potrebbe non essere un

tempo abbastanza lungo per l'estrazione uniforme dei SS. Molto probabilmente, la durata di 8 ore della procedura di infusione a freddo sembra essere sufficientemente lunga da estrarre in maniera più efficiente i solidi solubili.

Inoltre, alcuni componenti sensibili al calore nelle infusioni a freddo non vengono degradati o rimangono inalterati, rispetto a ciò che accade durante le infusioni a caldo e standard.

Oltre alla temperatura e ai tempi di macerazione, sono risultati interessanti anche le differenze inerenti alla “fermentazione” o meno dei campioni.

Gli infusi di rooibos fermentato hanno rilevato una minore concentrazione di solidi solubili, in tutti i tipi di infusione, rispetto a quelli del rooibos non fermentato: rispettivamente 270 vs 323 mg/200ml per gli infusi da infusione standard, 208 vs 378 mg/200ml per gli infusi da infusione a freddo e 493 vs 664 mg/200ml per gli infusi da infusione a caldo.

I solidi solubili contengono molecole con potenziali effetti benefici sulla salute, come polifenoli, flavonoidi, aspalatina e tannini.

Durante il processo naturale di "fermentazione" il contenuto di aspalatina diminuisce sostanzialmente a causa della conversione ossidativa a flavoni e flavanone, tra gli altri, e che, inoltre, influisce sul contenuto totale di polifenoli (Joubert, 1996) (Krafczyk e Glomb, 2008) e solidi solubili. È quindi plausibile che il contenuto di solidi solubili nei campioni di rooibos fermentato sia risultato significativamente influenzato dalla procedura di “fermentazione”.

Si ricorda, inoltre, che i campioni di rooibos fermentato provengono da due zone differenti del Sud Africa. Nello specifico, i primi 6 campioni hanno origine nell' area

di Nieuwoudtville (Northern Cape, Sud Africa), mentre i campioni dal 7 al 12 provengono da Clanwilliam (Western Cape, Sud Africa). Dal confronto di questi campioni è interessante notare che quelli provenienti da Clanwilliam presentano un quantitativo di SS simile nelle infusioni standard e a caldo, e leggermente maggiore nelle infusioni a freddo rispetto ai campioni provenienti da Nieuwoudtville.

4.2.4 CONFRONTO CON I DATI IN LETTERATURA

Le Tabelle 19, 20 e 21 riportano i risultati ottenuti durante alcuni precedenti studi in riferimento rispettivamente al ferro, all'alluminio e ai solidi solubili negli infusi di rooibos. In letteratura non risultano essere presenti dati sull'alluminio e ferro relativamente alle infusioni a freddo dei rooibos fermentati e non fermentato.

In generale i dati ottenuti nel presente studio risultano essere confrontabili con quelli presenti in letteratura.

Tabella 18 - Confronto dati di letteratura del ferro negli infusi di rooibos.

	Rooibos Rosso			Rooibos Verde			Riferimenti
	Standard (X) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Freddo (C) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Caldo (H) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Standard (X) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Freddo (C) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Caldo (H) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	
Ferro	119±7 59*	105±5	142±4 103±1*	21±2	21±2	53±3 27±16*	Presente Studio Paz-Rodríguez et al, 2015 Malik et. Al, 2008

*: dati resi confrontabili con i dati del presente studio per mezzo di una ricostruzione delle medie e delle relative proporzioni di diluizione.

Relativamente al ferro, i dati del presente studio risultano essere superiori a quelli di Paz-Rodríguez et al. (2015) e a quelli di Malik et. al (2008).

Tabella 9 - Confronto dati in letteratura dell'alluminio negli infusi di rooibos.

Alluminio	Rooibos Rosso			Rooibos Verde			Riferimenti
	Standard (X) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Freddo (C) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Caldo (H) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Standard (X) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Freddo (C) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	Caldo (H) (µg/L) Media±D.S. (min-max)	
	57±3	42±4	120±8 148±15*	81±2	82±3	149±5 104±9*	Presente Studio Malik et. Al, 2008

*: dati resi confrontabili con i dati del presente studio per mezzo di una ricostruzione delle medie e delle relative proporzioni di diluizione.

Tabella 10 - Confronto dati in letteratura dei solidi solubili negli infusi di rooibos.

Solidi Solubili	Rooibos Rosso			Rooibos Verde			Riferimenti
	Standard (X) (mg/200 ml) Media±D.S. (min-max)	Freddo (C) (mg/200ml) Media±D.S. (min-max)	Caldo (H) (mg/200ml) Media±D.S. (min-max)	Standard (X) (mg/200 ml) Media±D.S. (min-max)	Freddo (C) (mg/200ml) Media±D.S. (min-max)	Caldo (H) (mg/200ml) Media±D.S. (min-max)	
	270±15 227±22.6 298	208±14 202	493±23 380	323±18	378±23	664±39	Presente Studio Joubert et al., 2012 Campioni Africa

Per quanto concerne l'alluminio e i solidi solubili i valori riscontrati sono dello stesso ordine di grandezza di quelli presenti in letteratura.

Le differenze tra i dati esposti nel presente lavoro di tesi e i dati rilevati in letteratura, a parità di modalità di infusione e metodologie di determinazione degli elementi, potrebbe risiedere nelle caratteristiche della pianta, quali l'origine geografica dei campioni, i terreni in cui le piante crescono, le specie vegetali, il clima, la qualità dei campioni e l'anno di raccolta. Purtroppo, non è possibile verificare la provenienza dei rooibos utilizzati nei lavori citati. Tuttavia, si evidenzia come questi lavori siano stati effettuati in anni precedenti al presente studio di tesi. Quindi risulta plausibile affermare che le differenti annate di raccolta abbiano influenzato il quantitativo di elementi rilevati.

5 CONCLUSIONI

Di recente, l'infusione a freddo di tè rooibos ha guadagnato popolarità. Aggiungere una bustina di tè rooibos nell'acqua e infonderla per un periodo prolungato a temperatura ambiente o in frigorifero è una comoda alternativa alla preparazione di un infuso usando acqua calda o bollendo l'acqua su una stufa.

Le indicazioni salutari per i rooibos, oltre al suo piacevole aroma, sapore e gusto, e lo status di caffeina-free, contribuiscono al suo crescente consumo.

Dai risultati del presente studio è emerso che le infusioni a caldo presentano un contenuto maggiore di ferro, alluminio e solidi solubili rispetto alle corrispondenti infusioni a freddo e standard.

Nelle infusioni di rooibos non fermentato, sia alluminio che ferro hanno mostrato una concentrazione simile negli infusi ottenuti da infusione standard e a freddo e una concentrazione significativamente maggiore negli infusi da infusione a caldo.

Gli infusi di rooibos fermentato hanno rilevato, invece, una concentrazione di metalli significativamente più bassa negli infusi ottenuti da infusione a freddo e significativamente più alta negli infusi da infusione a caldo.

Negli infusi di rooibos non fermentato il contenuto dei due metalli studiati risulta più alto per Al e più basso per Fe rispetto agli infusi di rooibos fermentato.

Per quanto riguarda i solidi solubili, questi sono significativamente maggiori negli infusi da infusione a caldo ottenuti con rooibos sia fermentati che non fermentati.

In conclusione, si osserva che il metodo di infusione a caldo presenta un'estrazione più efficiente rispetto a quello standard e a freddo, con un livello maggiore di solidi solubili, Al e Fe. Inoltre, gli infusi di rooibos non fermentato hanno una maggiore

concentrazione di solidi solubili e alluminio e un minor livello di ferro se confrontati con gli infusi di rooibos fermentato.

I livelli di Fe e Al, maggiori negli infusi a caldo, sono risultati troppo bassi sia per avere effetti negativi sulla salute sia per vantarne proprietà benefiche. Dunque, facendo riferimento ai soli risultati del presente studio, si potrebbe ipotizzare che il consumo di infusi ottenuti da rooibos fermentati con infusione a caldo è da preferire al consumo di infusi ottenuti da rooibos non fermentato con infusione standard o a freddo, in quanto presentano un minor contenuto di alluminio e un maggior contenuto di ferro.

6 BIBLIOGRAFIA

- Anonymous. «A profile of the South African rooibos tea market value chain» *Agriculture, forestry & Fisheries*, 1, 6-10, 2014.
- Baranska M., Schulz H., Joubert E., Manley M. «In situ flavonoid analysis by FT-Raman spectroscopy: identification, distribution, and quantification of aspalathin in green rooibos (*Aspalathus linearis*)» *Analytical Chemistry*, 78(22), 7716-21, 2006.
- Başgel S., Erdemoğlu S.B. «Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey» *Science of the Total Environment*, 359(1-3), 82-89, 2006.
- Belyaeva E.A., Sokolova T .V., Emelyanova L. V., Zakharova I. O. «Mitochondrial electron transport chain in heavy metal-induced neurotoxicity: effects of cadmium, mercury, and copper» *The Scientific World Journal*, Article ID 136063, 14, 2012.
- Buettner G. R., Jurkiewicz B. «Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid» *Radiation Research*, 145(5), 532-41, 1996.
- Buldini P. L., Ricci L. e Lal Sharma J. «Recent applications of sample preparation techniques in food analysis» *Journal of chromatography A* 975(1), 47-70, 2002.
- Chen. Y. W., Huang C. F., Yang C. Y., Yen C. C., Tsai K. S., Liu S. H. «Inorganic mercury causes pancreatic β -cell death via the oxidative stress-induced apoptotic and necrotic pathways» *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(3), 323-331, 2010.
- Cheney R. H., Scholtz E. «Rooibos Tea, a South African Contribution to World Beverages» *Economic Botany*, 18, 186-194, 1963.
- CNSA. Comitato nazionale per la sicurezza alimentare. «Esposizione del consumatore all'alluminio derivante dal contatto alimentare: elementi di valutazione del rischio e indicazioni per un uso corretto dei materiali a contatto con gli alimenti» *Parere n.19*, 2017.
- Colak H., Soylak M., Turkoglu O. «Determination of trace metal content of various herbal and fruit teas produced and marketed in Turkey» *Trace Elements and Electrolytes* 22(07), 192-195, 2005.
- Costantini M., Cannella C., Tommasi G. «Alimentazione e nutrizione umana.» *Il Pensiero Scientifico*, Roma, 2016.
- Cozzi G., Barbante C., Arabadzhi M., Zacharia A. N. «Comparison of analytical methods: ICP-QMS, ICP-SFMS and FF-ET-AAS for the determination of V, Mn, Ni, Cu, As, Sr, Mo, Cd and Pb in ground natural waters» *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 96(4), 1-21 2016.

- Dahlgren R. «Revision of the genus *Aspalathus*. II. The species with ericoid and pinoid leaflets. 7. Subgenus *Nortieria*. With remarks on rooibos tea cultivation» In *Botaniska Notiser*, 121, 165-208, 1968.
- Damiani E., Carloni P., Rocchetti G., Senizza B., Tiano L., Joubert E., De Beer D., Lucini L. «Impact of cold versus hot brewing on the phenolic profile and antioxidant capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) herbal tea» *Antioxidants*, 8, 499, 2019.
- Dlodla P. V., Gabuza K. B., Muller C. J. F., Joubert E., Louw J., Johnson R. «Aspalathin, a C-glucosyl Dihydrochalcone From Rooibos Improves the Hypoglycemic Potential of Metformin in Type 2 Diabetic (db/db) Mice» *Physiological Research*, 67(5), 813-818. 2018.
- Du Plessis M. M., Roos H. J. «Recovery of coliforms, *Escherichia coli* type I and *Salmonella* species from rooibos tea» *Microbiological Safety and Quality of Food*, 18, 963-970, 1986.
- Duffus J. H. «"Heavy metals" a meaningless term? IUPAC Technical Report» *The Edinburgh Centre for Toxicology, 43 Mansionhouse Road, Edinburgh EH9 2JD, Scotland, United Kingdom*, 2002.
- Duarte K., Justino C. I. L., Gomes A. M. Rocha-Santos T., Duarte A. C. «Green analytical methodologies for preparation of extracts and analysis of bioactive compounds», *Comprehensive Analytical Chemistry, Chapter 4(65)*, 59–78, 2014.
- Joubert E., Jolley B., Koch I.S., Muller M., Van der Rijst M., de Beer D. «Major production areas of rooibos (*Aspalathus linearis*) deliver herbal tea of similar phenolic and phenylpropanoic acid glucoside content» *South African Journal of Botany*, 103, 162-169, 2016.
- EFSA. «Advises on the Safety of Aluminium in Food.» 2008.
- Fekete V., Vandevijvere S., Bolle F., Van Loco J. «Estimation of dietary aluminum exposure of the Belgian adult population: Evaluation of contribution of food and kitchenware» *Food and Chemical Toxicology*, 55, 602-608, 2013.
- Feria-Morales A. M. «Examining the case of green coffee to illustrate the limitations of grading systems/expert tasters in sensory evaluation for quality control» *Food Quality and Preference*, 13(6), 355-367, 2002.
- Flaten T. P. «Aluminium in tea – Concentrations, speciation and bioavailability» *Coordination Chemistry Reviews*, 228(2), 385–395, 2002.
- Fox S., Jacobs M.R., Jones R.M., Fry A.O.L. «Animal models for assessing bioavailability of essential and toxic elements» *Trace Minerals in Foods*, 58(1), 318-321, 1981.
- Fraga C. G., Oteiza P. I. «Iron toxicity and antioxidant nutrients.» *Toxicology*, 180(1), 23-32, 2002.
- Gallaher R., Gallaher K., Marshall A. J., Marshall A. «Mineral analysis of ten types of commercially available tea» *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 53-57, 2006.

- Genuis S J. «Sensitivity-related illness: the escalating pandemic of allergy, food intolerance and chemical sensitivity» *The Science of the Total Environment*, 408(24), 6047–6061, 2010.
- Giulian R., Dos Santos C. E., Shubeita Sde M., Da Silva L. M., Dias J. F., Yoneama J. F. «Elemental characterization of commercial mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hill.) before and after hot water infusion using ion beam techniques» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 741–746, 2007.
- Guerrero-Bosogna C., Skinner M. K. «Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease» *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1-2), 3–8, 2012.
- Harbowy M.E., Balentine D. A. «Tea chemistry» *Critical Review in Plant Science*, 16(5), 415-480, 1997.
- Hu L., Greer J. B., Solo-Gabriele H., Fieber L. A., Cai Y. «Arsenic toxicity in the human nerve cell line SK-N-SH in the presence of chromium and copper» *Chemosphere*, 91(8), 1082–1087, 2013.
- Huang C. F., Gant X. W., Bai H. Y., Ma L., Hu L. H. «Schoepfin A, B, C: three new chalcone C-glycosides from *Schoepfia chinensis*» *Natural Product Research*, 22(7), 623-627, 2008.
- Jaganyi D., Madlala S. Z. «Kinetics of coffee infusion: A comparative study on the extraction kinetics of mineral ions and caffeine from several types of medium roasted coffees» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 85–90, 2000.
- Jolley B., van der Rijst M., Joubert E., Muller M. «Sensory profile of rooibos originating from the Western and Northern Cape governed by production year and development of rooibos aroma wheel» *South African Journal of Botany*, 110, 161-166, 2017.
- Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M. «Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders», *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1-2), 91–104, 2010.
- Joubert E. «Effect of batch extraction conditions on extraction of polyphenols from rooibos tea (*Aspalathus Linearis*)», *International Journal Food Science Technology*, 25, 339–343, 1990.
- Joubert E. «Effect of time on fixed-bed extraction of polyphenols from rooibos tea (*Aspalathus Linearis*) », *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 23, 181–183, 1990.
- Joubert E. «HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing» *Food Chemistry*, 55(4), 403-411, 1996.
- Joubert E., Chen W., Sudji I. R., Wang E., Wyk B., Wink M. «Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*» *Phytomedicine*, 20(3-4) 380-386, 2013.
- Joubert E., e de Beer D. «Phenolic content and antioxidant activity of rooibos food ingredient extracts» *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 45-51, 2012.

- Joubert E., De Beer D. «Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical» *South African Journal of Botany*, 77(4), 869-886, 2011.
- Joubert E., Schulz H., Baranska M., Manley M. «In Situ Flavonoid Analysis by FT-Raman Spectroscopy: Identification, Distribution, and Quantification of Aspalathin in Green Rooibos (*Aspalathus linearis*)» *Analytical Chemistry*, 78(22), 7716-7721, 2006.
- Joubert E. «Tristimulus colour measurement of rooibos tea extracts as an objective quality parameter» *International Journal of Food Science & Technology*, 30, 783–792, 1995.
- Joubert E. «Effect of controlled conditions during deep bed fermentation and drying on rooibos tea (*Aspalathus linearis*) quality» *Journal of Food Processing and Preservation*, 22(5), 405-417, 2007.
- Joubert E., Gelderblom W. C., de Beer D. «South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*. A review», *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 376-412, 2008.
- Joubert E., Muller C. J. F., Malherbe C. J., Chellan N., Yagasaki K., Miura Y. «Potential of rooibos, its major C-glucosyl flavonoids, and Z-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3-phenylpropenoic acid in prevention of metabolic syndrome» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(2), 227-246, 2017.
- Kanu A., Okonkwo J.O., Dakora F.D.. «*Aspalathus linearis* (Rooibos tea) as potential phytoremediation agent: a review on tolerance mechanisms for aluminum uptake» *Environmental Reviews*, 21(2), 85-92, 2013.
- Kawakami M., Kobayashi A., Kunihiro K. «Volatile constituents of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by extraction process» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(4), 633-636, 1993.
- Koch I. S., Muller N., de Beer D., Naes T., Joubert E. «Impact of steam pasteurization on the sensory profile and phenolic composition of rooibos (*Aspalathus linearis*) herbal tea infusions» *Food Research International*, 53(2), 704-712, 2013.
- Koch I. S., Muller M., Joubert E., van der Rijst M., Naes T. «Sensory characterization of rooibos tea and the development of a rooibos sensory wheel and lexicon» *Food Research International*, 46(1), 217-228, 2011.
- Koeppen B. H., Roux D. G. «C-Glycosylflavonoids. The chemistry of aspalathin» *Biochemical Journal*, 99(3), 604-606, 1965.
- Kolachi N. F., Kazi T. G., Afridi H. I. et al. «Status of toxic metals in biological samples of diabetic mothers and their neonates» *Biological Trace Element Research*, 143(1), 196–212, 2011.
- Konishi, S, S Miyamoto, e T Taki. «Stimulatory effects of aluminium on tea plants grown under low and high phosphorous supply» *Soil Science and Plant Nutrition (Tokyo)*, 31(2), 361–368, 1985.

- Krafczyk N, Glomb M. A. «Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3368–3376, 2008.
- Krafczyk N., Heinrich T., Porzel A., Glomb M. A. «Oxidation of the Dihydrochalcone Aspalathin Leads to Dimerization» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (15), 6838–6843, 2008.
- Li H. L., Wang W. Y. «Deterioration of nine life elements in brick tea by IPC-AES», *Guang pu xue yu guang pu fen xi Guang pu*, 25(8), 1344-1346, 2005.
- Malgas R. R., Potts A. J., Oetléc N. M., Koelle B., Todde S.W., Verboom G.A., Hoffman M.T. «Distribution, quantitative morphological variation and preliminary molecular analysis of different growth forms of wild rooibos (*Aspalathus linearis*) in the northern Cederberg and on the Bokkeveld Plateau» *South African Journal of Botany*, 76(1), 72-81, 2010.
- Malik J., Szakova J., Drabek O., Balik J., Kokoska L. «Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions» *Food Chemistry*, 111(2), 520–525, 2008.
- Marais C.; van Rensburg W. J., Ferreira D., Steenkamp J. A. «(S)- and (R)-Eriodictyol-6-C-β-D-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*)» *Phytochemistry*, 55(1), 43-49. 2000.
- Marnewick L. J., Panti W. G., Esterhuysen A. J., van Rooyen J. «Rooibos (*Aspalathus linearis*) offers cardiac protection against ischaemia/reperfusion in the isolated perfused rat heart» *Phytomedicine*, 18(14), 1220-1228. 2011.
- Matsumoto H., Hirasawa E., Morimura S., Takahashi E. «Localisation of aluminium in tea leaves. Plant and Cell Physiology», *Handbook of Plant Nutrition* 17(2), 627–631, 1976.
- Mendil D., Bardak H., Tuzen M., Soylak M.. «Selective speciation of inorganic antimony on tetraethylenepentamine bonded silica gel column and its determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry» *Talanta*, 107, 162-166, 2013.
- Miller N., de Beer D, Joubert E. «Production of dihydrochalcone-rich green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract taking into account seasonal and batch-to-batch variation in phenolic composition of plant material» *South African Journal of Botany*, 110, 138-143, 2017.
- Morton J. F. «Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage» *Economic Botany*, 37, 164-173, 1983.
- Mudipalli A., Zelikoff J. T. «Cadmium Carcinogenesis and mechanistic insights» *Essential and Non-essential metals. Chapter 6, Molecular and Integrative Toxicology*, New York University, Tuxedo, New York, USA, Humana Press, 2017.
- Muller C. J. F., Joubert E, de Beer D, Sanderson M., Malherbe C. J., Fey S J., Louw J. «Acute assessment of an aspalathin-enriched green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract with hypoglycemic potential» *Phytomedicine*, 20(1)32-39, 2012.

- Muller M., De Beer D., Truzzi C., Annibaldi A., Carloni P., Girolametti F., Damiani E., Joubert E., «Sensory profile, color, turbidity, phenolic composition and Z-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3-phenylpropenoic acid, Fe and Al content of cold-brewed rooibos - comparison with regular hot and boiled brews», *LWT - Food Science and Technology*, submitted 2020.
- Nair A. R., Degheselle O., Smeets K., Van kerkhove E., e Cypers A. «Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)?» *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6116–6143, 2013.
- Naithani V., Kakkar P. «Evaluation of heavy metals in Indian Herbal teas» *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75,197-203, 2005.
- Nkono N. A., Asubiojo O. I. «Trace elements in bottled ans soft drinks in Nigeria-A preliminary study» *Science of the Total Environment*, 208(3), 161-163, 1997.
- Ochmański W., Barabasz W. «Aluminum-occurrence and toxicity for organisms» *Przegland Lekarski* 57(11), 665-668, 2000.
- Packer L., Weber S. U., Rimbach G. «Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling» *Journal of Nutrition*,131(2), 369-373, 2001.
- Paz-Rodriguez B., Domínguez-GonzálezM.R., Aboal-Somoza M., Bermejo-Barrera P.. «Application of High Resolution-Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry (HR-CS FAAS): Determination of trace elements in tea and tisanes» *Food Chemistry*, 170, 492-500, 2015.
- Poirier J., Semple H., Davies J., Lapointe R., Dziwenka M., Hiltz M. «Double-blind, vehicle-controlled randomized twelve-month neurodevelopmental toxicity study of common aluminum salts in the rat» *Neuroscience*,193, 338-362, 2011.
- Rainey C. J., Nyquist L. A., Christensen R. E., Strong P. L., Cluver B. D., Coughlin J. R. «Daily boron intake from the American diet» *Journal of the American Dietetic Association*, 99(3), 335–340, 1999.
- SARC Rooibos Council. «Rooibos industry fact sheet 2019» 2019.
- Schwalfenberg G., Genuis S. J., Rodushkin I. «The Benefits and Risks of Consuming Brewed Tea: Beware of Toxic Element Contamination» *Journal of Toxicology*, Article ID 370460, 8 pages, 2013.
- Sears M. E., Genuis S. J. «Environmental determinants of chronic disease and medical approaches: recognition, avoidance, supportive therapy, and detoxification» *Journal of Environmental and Public Health*, Article ID 356798, 15 pages, 2012.
- Shimamura N, Miyase T, Umehara K, Warashina T, Fujii S «Phytoestrogens from *Aspalathus linearis*» *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(6), 1271-1274, 2006.

- Manzimase S. «Evaluation of rooibos waste plant material» *Thesis of Master of Science in Food and Science, Department of Food Science Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University*, 2018.
- Son M. J., Minakawa M., Miura Y., Yagasaki K. «Aspalathin improves hyperglycemia and glucose intolerance in obese diabetic ob/ob mice» *European Journal of nutrition* 52(6), 1607-1619, 2013.
- Touyz L. Z., Smit A. A. «Herbal tea infusions their acidity, fluoride and calcium concentrations.» *The Journal of the Dental Association of South Africa*, 37(11), 737-739, 1982.
- Valter, K. «Vse o caji pro cajomily» *Prague:Granit Ltd*, 2001.
- Van Acker S. A., Van Balen G. P., Van den Berg D., Bast A., Van der Vijgh W. J. «Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids» *Biochemical Pharmacology*, 56(8), 935-943, 1998.
- Van Wyk B. E., Gorelik B. «The history and ethnobotany of Cape herbal teas» *South African Journal of Botany*, 110, 18-38, 2017.
- Von Gadow A., Joubert E., Hansmann C. F. «Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea» *Food Chemistry*, 60(1), 73-77, 1997.
- Walters N. A., De Viliers A., Joubert E., de Beer D. «Phenolic profiling of rooibos using off-line comprehensive normal phase countercurrent chromatography × reversed phase liquid chromatography» *Journal of Chromatography A*, 1490, 102-114, 2017.
- Watanabe T., Dessein S., Smets E., Robbrecht E. «A comparative study of metal levels in leaves of some Al-accumulating Rubiaceae» *Annals of Botany*, 91(6), 657–663, 2003.
- WHO (World Health Organization). «Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors» Geneva, Switzerland, pp. 1–180, 2002.
- WHO (World Health Organization). «Guidelines for drinking-water quality», (3rd ed.). *Health criteria and other supporting informations (vol.1)*, 2004.
- Wong M. H., Zhang Z. Q., Wong J. W., Lan C. Y. «Trace metal contents (Al, Cu and Zn) of tea: Tea and soil from two tea plantations, and tea products from different provinces of China» *Environmental Geochemistry and Health*, 20(2), 87–94, 1998.
- Wood C. M., Farrel A., Brauner C. J. «Fish Physiology: Homeostasis and toxicology of essential metals» *Volume 31A, 1st edition, Academic Press*, 2012.