



Università degli Studi di Cagliari

SCUOLA DI DOTTORATO IN TOSSICOLOGIA

Tossicologia degli Alimenti e dell'Ambiente

Ciclo XXIII

**STUDIO DEGLI ASPETTI
NUTRIZIONALI E TOSSICOLOGICI DI
MIELI UNIFLORALI**

Settore scientifico disciplinare CHIM/10

Presentata da:

Dott.ssa Ersilia Bifulco

Coordinatore Dottorato:

Prof. Gaetano Di Chiara

Relatori:

Prof. Filippo M. Pirisi

Dott. Carlo I.G. Tuberoso

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
2. IL MIELE	3
2.1 Mieli uniflorali.	5
2.2 Il miele in Sardegna.	8
2.3 Aspetti nutrizionali e salutistici del miele.	13
2.4 Aspetti tossicologici di mieli uniflorali.	15
3 MATERIALI E METODI	20
3.1 Analisi generali.	20
3.1.1 Reagenti e standard.	20
3.1.2 Campioni.	21
3.1.3 Analisi melissopalinologica.	23
3.1.4 Tenore di acqua.	23
3.1.5 Coordinate cromatiche.	24
3.1.6 Analisi statistica.	25
3.2 Caratterizzazione.	25
3.2.1 Estrazione.	25
3.2.2 Separazione mediante TLC.	26
3.2.3 Purificazione con SPE.	27
3.2.4 Separazione mediante HPLC-DAD preparativa.	28
3.2.5 Analisi HPLC-DAD.	29
3.2.6 Analisi HPLC MS/MS.	30
3.2.7 Analisi HPLC-MS Q-TOF.	31
3.2.8 Analisi NMR e IR.	31
3.3 Attività antiossidante.	32
3.3.1 Test <i>in vitro</i> di valutazione dell'attività antiossidante ed antiradicalica.	32
3.3.1.1 Determinazione dei polifenoli totali.	32
3.3.1.2 Attività antiradicalica.	33
3.3.1.3 Attività antiossidante totale.	33
3.3.1.4 Determinazione dell'attività antiossidante dei principi attivi.	34
3.3.2 Test <i>in semi-vivo</i> dell'effetto vasodilatatorio del miele di corbezzolo sul sistema circolatorio.	34
3.3.2.1 Preparazione di campioni di aorta.	34
3.3.2.2 Parte sperimentale.	35
3.3.3 Test <i>in vitro</i> su modelli biologici di valutazione del potere protettivo del miele di corbezzolo.	37

3.3.3.1	Ossidazione del colesterolo.	38
3.3.3.2	Preparazione e ossidazione delle LDL.	38
3.3.3.3	Estrazione dei lipidi ed analisi degli acidi grassi e del colesterolo.	39
3.4	Aspetti tossicologici.	41
3.4.1	Alcaloidi.	41
3.4.2	Preparazione del campione.	41
3.4.3	Purificazione mediante SCX.	41
3.4.4	Composti azotati per HLC-DAD.	42
3.4.5	Validazione del metodo analitico.	42
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	45
4.1	Analisi generali.	45
4.1.1	Analisi melissopalinologica.	45
4.1.2	Parametri tecnologici.	46
4.1.3	Coordinate cromatiche.	47
4.2	Caratterizzazione.	49
4.2.1	Miele di Asfodelo.	50
4.2.2	Miele di Corbezzolo.	54
4.2.3	Miele di Cardo.	62
4.3	Attività antiossidante.	68
4.3.1	Test <i>in vitro</i> dei mieli: FRAP, DPPH e PT.	68
4.3.2	Test <i>in ex-vivo</i> sul miele di corbezzolo: test in organi isolati.	70
4.3.3	Test <i>in vitro</i> su modelli biologici per la valutazione del potere protettivo del miele di corbezzolo dallo stress ossidativo.	72
4.3.4	Attività antiossidante dei principi attivi contenuti nei mieli.	74
4.4	Aspetto tossicologico.	80
5	CONCLUSIONI	83
6	BIBLIOGRAFIA	85

ABBREVIAZIONI

7 β -OH: 5-cholestene-3 β ,7 β -diol

7-cheto: 5-cholesten-3 β -ol-7-one

A1: composto miele di Asfodelo

ABA: acido abscissico

Ach: acetilcolina

AGE: equivalenti di acido gallico

C1, C2, C3 e C4: composti miele di Corbezzolo

DPPH: test di attività antiradicalica / 2,2-difenil-1-picrilidrazil radicale

DQF-COSY: *Double-Quantum Filtered COrrrelation Spectroscopy*

FRAP: *Ferric Reductant Antioxidant Power*

G1 e G2: composto miele di cardo

HGA: acido omogentisico

HMBC: *Heteronuclear Multiple - Bond Correlation*

HP: idroperossidi

HPLC-DAD: *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector*

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IR: spettroscopia ad infrarossi

MYRS: metil siringato

NA: noradrenalina

NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*

PAs: alcaloidi 1,2-deidropirrolizidinici

PT: polifenoli totali

PUFA: acidi grassi polinsaturi

QBA: alcaloidi benzofenantridinici

Q-TOF: *Quadrupole Time of Flight*

ROESY: *Rotating-Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*

SCX: *Strong Cation Exchange*

SPE: *Solid Phase Extraction*

TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TLC: *Thin Layer Chromatography*

1. INTRODUZIONE

Attualmente, il mestiere dell'apicoltore diventa sempre più difficile ed economicamente meno proficuo. La moria delle api, dovuta all'uso di agrofarmaci neonicotinoidi nell'agricoltura, a malattie, all'inquinamento ambientale, ai cambiamenti climatici ecc., provoca diminuzione della produzione di miele ed aumento delle importazioni. In tale modo aumenta il rischio di immettere sul mercato miele con minori garanzie qualitative.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di approfondire le conoscenze sugli aspetti nutrizionali e tossicologici dei mieli uniflorali, in particolare di quelli prodotti in Sardegna. Infatti questo lavoro è stato incentrato sullo studio dei caratteristici mieli uniflorali sardi di asfodelo (*Asphodelus microcarpus* Salzm. e Viv.), corbezzolo (*Arbutus unedo* L.) e cardo (*Galactites tomentosa* Moench).

Inizialmente si è determinata l'unifloralità dei mieli per poi valutare la possibile componente a potenziale azione nutrizionale o tossica delle loro componenti. Per questo scopo è stato messo a punto un metodo HPLC-DAD diretto ed accurato caratterizzato da assenza di *clean-up* del campione. Ciò ha consentito di ottenere un *fingerprinting* di mieli uniflorali, basato sulla caratterizzazione e quantificazione di specifici marcatori (polifenoli, norisoprenoidi, composti azotati, ecc.) tipici della specie botanica di appartenenza.

Per quanto riguarda la valutazione dell'aspetto nutrizionale, sono state valutate le proprietà antiossidanti e antiradicaliche dei mieli uniflorali. Tale scelta deriva dal fatto che gli alimenti ricchi di sostanze antiossidanti riducono il rischio di malattie, tra cui quelle cardiovascolari e neurodegenerative [1,2], e sono importanti nella prevenzione e nella difesa dal danno ossidativo nell'uomo [3-6]. Questo può essere utile per promuovere il consumo del miele e, eventualmente, per individuare specifiche molecole utili ed utilizzabili nella preparazione di integratori o additivi alimentari dotati di effetto protettivo ed antiossidante. Sono state utilizzate diverse metodiche, sia chimiche che biologiche in modo da simulare una reale attività antiossidante. Inoltre, vista la presenza di sostanze

fenoliche nei mieli [7], si è valutato il contenuto di polifenoli totali (PT) con il metodo del Folin-Ciocalteu. Le sostanze polifenoliche rappresentano, infatti, le molecole antiossidanti maggiormente studiate e sono associate a numerosi effetti benefici tra cui: la diminuzione dell'ossidazione delle LDL, la riduzione dell'aggregazione piastrinica [8], e l'aumento della produzione di ossido nitrico [9,10]. Quest'ultimo rappresenta un mediatore endogeno in processi particolarmente importanti come la vasodilatazione (EDRF, *endothelial derived relaxing factor*). L'attività antiossidante è stata valutata mediante due metodiche spettrofotometriche largamente impiegate per questa tipologia di analisi: DPPH (potere antiradicalico) e FRAP (potere antiossidante totale). Il miele di corbezzolo, risultato il più interessante tra quelli studiati, è stato inoltre sottoposto a test in vitro su modelli biologici per valutare il potere protettivo sull'ossidazione del colesterolo e delle LDL (collaborazione con il gruppo di Biologia Sperimentale dell'Università di Cagliari), ed il suo effetto diretto sul sistema cardiovascolare (collaborazione con il Dipartimento di Farmacologia della Facoltà di Medicina dell'Università di Split - Croazia). Inoltre sono state analizzate le proprietà antiossidanti dei *markers* dei mieli, che sono stati identificati mediante l'analisi HPLC-DAD. L'attività di tali molecole è stata confrontata con quella di altre molecole presenti negli alimenti e di nota attività antiossidante.

Infine è stata valutata la presenza di sostanze tossiche come gli alcaloidi 1,2-deidropirrolizidinici (senecionina e senecifillina) e di due alcaloidi benzofenantridinici (sanguinaria e cheleritina) entrambi con documentata presenza nel miele ed azione tossica per l'uomo [11-14]. A tale scopo è stata messa a punto una metodica di estrazione e quantificazione di molecole contenenti composti di azoti, basata su una purificazione su SPE (*solid phase extraction*) e successiva determinazione mediante HPLC-DAD.

2. IL MIELE

Secondo la più recente e completa definizione “il miele è la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti dalle parti vive di piante, o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell’alveare” [15].

Questa definizione riassume una serie di processi biologici e trasformazioni chimiche che, investendo vari campi (botanico, entomologico, ecc.), hanno come risultato la formazione del miele. Il miele è un alimento naturale, prodotto dalle api a partire dal nettare dei fiori o dalla melata, e costituito essenzialmente da una soluzione soprassatura di zuccheri, principalmente fruttosio e glucosio, acqua e piccole quantità di altre componenti: acidi (gluconico, citrico, malico, succinico, acetico, formico, lattico, butirrico, piroglutaminico, amminoacidi), proteine, sali minerali (potassio, sodio, calcio, magnesio, cloruri, solfati, fosfati, etc.), pigmenti (carotene, clorofilla, derivati dalla clorofilla), sostanze ed aromi dei fiori (esteri, aldeidi, alcoli), tannini, enzimi (invertasi, diastasi), fosfati e vitamine [16].

Le fonti alimentari più comuni delle api sono il nettare e la melata. Il nettare è una soluzione zuccherina secreta da particolari tessuti ghiandolari vegetali, chiamati nettarii, usati per attirare gli insetti. Piante diverse producono nettari diversi e, da qui, nascono le diverse varietà di miele. Importante è anche l’accessibilità dei nettarii, infatti alcune specie, pur essendo nettarifere, hanno una conformazione floreale che non rende agevole il bottinaggio (es. nelle Compositae come la *Galactites tomentosa* Moench.). Durante la raccolta del nettare, le api vengono a contatto con il polline che, pertanto, sarà presente nel miele come componente accidentale. Poiché il nettare deriva dalla linfa, in esso saranno contenute anche sostanze provenienti dalla pianta [17].

La melata è una sostanza zuccherina che si trova su alcune piante (abete, pino, larice, quercia, faggio, pioppo, acero, tiglio, salice, castagno, robinia, alberi da frutto) e la cui origine è legata all’intervento di insetti (afidi, cocciniglie e cicaline) chiamati “produttori di melata”. Questi insetti sono in grado di trarre la

linfa dalle piante ed eliminare circa il 90% degli zuccheri in essa contenuti, attraverso l'intestino, sotto forma di gocce che l'ape raccoglie e trasforma in miele.

Il miele è una fonte di zuccheri semplici ed è quindi un cibo altamente energetico e dolcificante che non necessita di nessuna trasformazione per essere consumato.

Le caratteristiche di composizione del miele fissate dalla legge [15] identificano, dal punto di vista chimico-fisico, un prodotto con requisiti minimi di qualità, e la non rispondenza a quanto stabilito può indicare alterazioni (invecchiamento o riscaldamento eccessivo), carenze qualitative (presenza di impurezze) o adulterazioni grossolane del prodotto. La valutazione della conformità del miele ai limiti di composizione fissati dalla norma richiede la disponibilità di metodi di analisi validati [18]. L'alta concentrazione di zuccheri (il miele è un mezzo liquido molto viscoso che non consente il passaggio di aria) e l'acidità (pH compreso tra 4 e 5,5) rendono il miele un ambiente non idoneo alla crescita batterica e quindi un alimento a lunga durata di conservazione. Nonostante questo, devono essere osservate alcune precauzioni affinché il miele non subisca processi di invecchiamento.

Il 5-idrossimetilfurfurale (HMF) è una sostanza assente nel miele fresco ma che si forma per effetto della degradazione degli zuccheri (in particolare del fruttosio) in ambiente acido; il processo avviene molto più rapidamente se il miele viene sottoposto a trattamenti termici. Il tasso di HMF diviene quindi un parametro che permette di valutare la "freschezza" del miele e la normativa [15] ne fissa il limite massimo a 40 mg/kg (per i mieli di dichiarata origine tropicale è 80 mg/kg). Anche gli enzimi presenti nel miele, diastasi ed invertasi, si degradano ad alte temperature, con l'invecchiamento e per l'esposizione alla luce solare. La degradazione di zuccheri ed enzimi provoca la perdita delle caratteristiche organolettiche del miele (odore e sapore di caramello e gusto amaro dovuto alla degradazione del fruttosio), ma non determina alcuna pericolosità per il consumo del prodotto.

Il contenuto in acqua è un parametro che definisce la qualità di un miele. La normativa vigente impone come soglia limite il 21% di umidità.

Al fine di tutelare e valorizzare la qualità del miele, il controllo analitico va esteso a valutazioni che riguardano i parametri chimici e fisici, le caratteristiche organolettiche, l'origine botanica e la specificità geografica. Infatti, il miele è un prodotto fortemente legato al territorio di produzione, in quanto le sue caratteristiche organolettiche e di composizione derivano principalmente dal tipo di flora bottinata dalle api. La valutazione dell'origine botanica di un miele, fatta mediante l'analisi melissopalinoologica, è integrata con diversi metodi fisico-chimici e con l'analisi organolettica.

I laboratori di controllo valutano i livelli di residui di varie sostanze che potrebbero essere pericolose per la salute umana come: antibiotici, sulfamidici, agrofarmaci, metalli pesanti etc.

Fin dall'antichità al miele sono attribuite proprietà curative, infatti la medicina popolare fa ampio ricorso a questo prodotto naturale per curare alcune malattie come quelle respiratorie, abrasioni, scottature e ferite. Le recenti acquisizioni scientifiche hanno messo in evidenza che la capacità antibatterica del miele è dovuta alla presenza di defensina-1, una sostanza prodotta dalle api nel processo di digestione del nettare [19]. Tutto l'alveare ne trae beneficio in quanto la defensina inibisce i batteri e i funghi che potrebbero attaccare la colonia mettendo a rischio la vita delle api.

Infine, il miele contiene sostanze fenoliche [7] in grado di neutralizzare i radicali liberi che nell'uomo danneggiano le arterie ed il DNA causando varie patologie.

2.1 Mieli uniflorali

Le api utilizzano il nettare di numerose specie di piante e il miele così prodotto avrà le caratteristiche di diverse specie botaniche. Nel caso in cui le api utilizzino un nettare predominante, si possono ottenere mieli uniflorali che risultano essere più facilmente identificabili, in quanto le loro caratteristiche organolettiche e fisico-chimiche sono costanti e tipiche della specie botanica. Tra i mieli uniflorali rientrano anche i mieli di melata in quanto provengono, in prevalenza, da un'unica origine anche se non si tratta di una sorgente nettarifera.

I mieli uniflorali hanno prezzi di mercato più elevati rispetto a quelli multiflora a causa di una maggiore difficoltà per l'apicoltore nell'ottenere un miele uniflorale di buona qualità.

La peculiarità dei mieli uniflorali consiste nelle caratteristiche strettamente legate alla composizione del nettare o della melata da cui esso deriva. Possono influire, inoltre, alcuni fattori esterni come la zona di provenienza, le condizioni climatiche, le tecniche apistiche impiegate e le modalità di conservazione. L'origine botanica è l'elemento fondamentale su cui si basa la caratterizzazione del miele ai fini della valorizzazione qualitativa sul mercato.

Sono disponibili schede di caratterizzazione che riportano, per ogni tipo di miele, le caratteristiche compositive, organolettiche e melissopalinoologiche necessarie al loro riconoscimento, nonché le informazioni generali sulla loro origine botanica e geografica. Le schede sono disponibili sia per le produzioni nazionali [20] che per quelle a livello europeo [21].

Per classificare i mieli uniflorali vengono normalmente impiegati tre approcci analitici:

- Analisi fisico-chimiche dei parametri definiti dal D. Lgs 179/2004 [15].
- Analisi sensoriale o organolettica, che consente di giudicarne i difetti sia rispetto ai requisiti organolettici minimi definiti dal D. Lgs 179/2004 [15], che ai profili organolettici definiti per i diversi mieli uniflorali codificati da un "vocabolario" comune agli iscritti all'Albo Nazionale degli Esperti in Analisi Sensoriale del Miele e oggetto di specifiche normative UNI ISO [22].
- Analisi melissopalinoologica [21, 23] che consente di valutare la quantità di polline di una specifica pianta rispetto alla quantità totale di pollini presenti nel miele (origine botanica) fornendo, inoltre, importanti informazioni sullo spettro pollinico corrispondente della zona di produzione del miele (origine geografica).

L'analisi melissopalinoologica viene attualmente considerata il principale indice di classificazione dei mieli uniflorali, anche se presenta numerosi limiti legati al fatto che il polline nel miele può derivare da svariate fonti: raccolta del nettare da parte delle api (inquinamento o arricchimento primario, in relazione

all'origine botanica), fasi successive di elaborazione da parte delle api all'interno dell'alveare (arricchimento secondario), operazioni di smielatura (arricchimento terziario), polline disperso nell'atmosfera (arricchimento quaternario).

Un altro forte elemento di imprecisione nell'analisi dei mieli deriva dal fatto che la quantità di polline che si ritrova nel nettare al momento della raccolta è estremamente variabile. Tali differenze sono dovute alla morfologia dei fiori, alle modalità di bottinatura delle api, alle dimensioni dei granuli pollinici e alla loro stabilità nel tempo.

In relazione al contenuto totale di granuli pollinici nel sedimento (PK), i mieli vengono classificati in classi di rappresentatività pollinica (**tabella 1**).

Tabella 1. Classi di rappresentatività [20].

Classe di Rappresentatività	N° di PK in 10 g di miele	Tipo di miele
I	< 20.000	Mieli a polline iporappresentato
II	20.000 - 100.000	Mieli a polline normalmente rappresentato
III	100.000 - 500.000	Mieli a polline iperrappresentato
IV	500.0 - 1.000.000	Mieli a polline fortemente iperrappresentato e di pressatura
V	> 1.000.000	Mieli di pressatura

I granuli pollinici di una specifica varietà vengono suddivisi in base a classi di frequenza (**Tabella 2**).

Tabella 2. Classi di frequenza [20].

Classe di frequenza	%
Dominante	> 45
Di accompagnamento	45 – 16
Isolato importante	16 – 3
Isolato	< 3

I mieli di castagno ed eucalipto presentano valori molto elevati dei rispettivi pollini, mentre il corbezzolo e l'asfodelo li hanno molto bassi. Per esempio, il miele di asfodelo, che contiene granuli pollinici di colore rosso mattone, è un miele primaverile uniflorale iporappresentato. Questo fatto è

legato alle grandi dimensioni dei granuli pollinici, alla conformazione dei nettarii che non consente l'inquinamento primario del nettare e al fatto che durante l'invecchiamento, i granuli di asfodelo si deteriorano rapidamente [20, 24].

Inoltre, per l'analisi botanica del miele, rivestono particolare importanza le fioriture di accompagnamento, soprattutto per i mieli a contenuto di pollini iporappresentato.

2.2 Il miele in Sardegna

La Sardegna è una delle regioni italiane a più spiccata vocazione nella produzione di miele pregiato per la sua connotazione insulare, per la ricchezza floreale mellifera, per il clima particolarmente mite e per la scarsa presenza di fattori inquinanti. Specie nettarifere endemiche come il corbezzolo, il cardo selvatico, l'eucalipto, la sulla, la lavanda ed il rosmarino contribuiscono ad esaltare le caratteristiche organolettiche dei mieli sardi.

Inoltre, il consumo di questo prodotto nell'isola è molto alto, perché il miele è molto spesso una componente essenziale di numerose specialità dolciarie (Torrone, *Tilliccas*, *Copulettas*, ecc.). Alla produzione del miele sono interessati oltre tremila apicoltori, di cui il 10 per cento dotati di impianti razionali di medie e grandi dimensioni. Spesso si tratta di singole aziende a carattere familiare, ma non mancano le associazioni provinciali dei produttori, dove l'esercizio della professione, viene inteso come strumento di assoluta garanzia sull'origine e sulla genuinità del miele prodotto in Sardegna.

La Sardegna può vantare un'ampia gamma di produzioni uniflorali tipiche come il miele di corbezzolo (*Arbutus unedo* L.), di asfodelo (*Asphodelus microcarpus* Salzm. e Viv.), di cardo (*Galactites tomentosa* Moench) (**Tabella 3, 4, 5**), di sulla (*Hedysarum coronarium* L.) e di eucalipto (*Eucalyptus spp.*). Questi mieli presentano caratteristiche organolettiche ben precise e diversi studi hanno cercato di evidenziarne le differenze chimico-fisiche [20, 24].

In particolare, il miele di corbezzolo, di cui la Sardegna è una delle maggiori produttrici, è facilmente riconoscibile per il suo sapore decisamente amaro ed

inoltre è un miele raro perché il corbezzolo fiorisce solo da novembre a febbraio. Per questi motivi risulta essere il miele più pregiato e costoso.

In questo lavoro l'attenzione si è concentrata su tre tipologie di miele uniflorale (asfodelo, corbezzolo e cardo), sia per il fatto che sono tipici della regione Sardegna, sia perché i dati presenti in letteratura sono piuttosto frammentari e solo per il miele di corbezzolo [25], permettono di caratterizzare il prodotto in maniera esauriente.

Tabella 3. Caratteristiche dei mieli di asfodelo [20, 24].




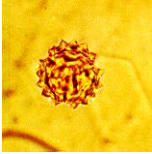
Asfodelo: <i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. et Viv. (sin. Ramosus L.) - Liliaceae (Gigliacee) Caratteristiche specie botanica		
Etimologia del Nome	'a' = non, 'spodos' = cenere, 'elos' = valle (dal greco, per indicare che le piante sopravvivono anche agli incendi). 'microcarpus' = indica i frutti piccoli di questa specie di asfodelo.	
Caratteristiche morfologiche		Pianta erbacea perenne con radici tuberizzate, fusto variamente ramificato (da 50 a 100 cm), foglie alla base della pianta lineari riunite in ciuffi (70-80 cm, glabre e di colore verde glauco), fiori grandi (bianchi con la nervatura mediana rossastra) e frutto di forma ovale.
Fioritura	Fine febbraio-aprile.	
Distribuzione	Tutta l'area del Mediterraneo. In Sardegna è una costante in tutte le aree marginali dell'Isola.	
Habitat	Pianta ubiquitaria. Predilige le zone più soleggiate. Il suo potente apparato radicale gli consente di superare anche grosse avversità climatiche (caldo e siccità) soffrendo però per il freddo eccessivo	
Caratteristiche miele		
Caratteristiche chimico-fisiche	Rif.	Direttiva 2001/110/CE
Caratteristiche melissopalinoologiche	Morfologia granulo pollinico (PK)	
	Classe di rappresentatività	Classe I Pollini iporappresentati < 20.000 PK/10 g
	Classe di frequenza	< 6%
Caratteristiche organolettiche	Stato fisico	Liquido o cristallizzato (cristalli fini e irregolari)
	Sapore	Delicato, gradevole
	Colore	Ambra chiaro con riflessi grigi
	Odore/Aroma	Debolmente aromatico

Tabella 4. Caratteristiche dei mieli di corbezzolo [20, 24].

Corbezzolo: <i>Arbutus unedo</i> L. (Ericaceae)		
Caratteristiche specie botanica		
Etimologia del Nome	'ar' = aspro, e 'butus' = cespuglio (derivazione celtiche per il sapore aspro delle foglie e dei frutti). 'unedo' = mangiane uno solo (Plinio il Vecchio)	
Caratteristiche morfologiche		<p>Arbusto sempreverde ramificato (altezza 1 -8 metri).</p> <p>Foglie di forma ovale lanceolata con margine dentellato.</p> <p>I fiori (15-20) sono riuniti in pannocchie pendule di colore bianco-giallastro o roseo con antere di colore rosso scuro intenso con due cornetti gialli. Sono ricchi di nettare, e per questo motivo, intensamente visitati dalle api.</p> <p>Il frutto è una bacca sferica, rossa a maturità, e ricoperta di tubercoli.</p>
Fioritura	Ottobre-dicembre. I frutti maturano nell'anno successivo rispetto alla fioritura che dà loro origine, la pianta si trova quindi a ospitare contemporaneamente fiori e frutti.	
Distribuzione	È una tipica pianta della macchia mediterranea	
Habitat	Predilige terreni silicei e cresce ad altitudini comprese tra 0 e 800 metri.	
Caratteristiche miele		
Caratteristiche chimico-fisiche	Rif.	Direttiva 2001/110/CE
Caratteristiche melissopalinologiche	Morfologia granulo pollinico (PK)	
	Classe di rappresentatività	Classe I Pollini iporappresentati < 20.000 PK/10 g
	Classe di frequenza	> 8 %
Caratteristiche organolettiche	Stato fisico	Cristallizzazione rapida e irregolare a causa dell'elevata umidità di questo miele
	Sapore	Dolce all'inizio, poi amaro, acido, astringente
	Colore	Ambra quando liquido, marrone quando è cristallizzato
	Odore/Aroma	Pungente, erbaceo, di erbe amare, di fondi di caffè. Gusto amaro astringente. Aroma persistente

Tabella 5. Caratteristiche dei mieli di cardo [20, 24].

Cardo: <i>Galactites tomentosa</i> Moench (Asteraceae)		
Caratteristiche specie botanica		
Etimologia del Nome	'Gala' = latte (dal greco per il colore bianco della fitta peluria) 'Tomentoso' = peloso	
Caratteristiche morfologiche		Pianta erbacea con fusto tomentoso eretto, alto fino a 70 cm, ramificato superiormente. Le foglie tomentose sono pennatosette, dotate di spine robuste, ordinate sui margini. Capolini composti di fiori tubulari bianco-lilla o rosa-porpora. I frutti sono acheni dotati di pappo biancastro.
Fioritura	Aprile - luglio	
Distribuzione	Tipica del mediterraneo	
Habitat	Pianta erbacea infestante (terreni incolti, aridi, pascoli e bordi delle strade)	
Caratteristiche miele		
Caratteristiche chimico-fisiche	Rif.	Direttiva 2001/110/CE
Caratteristiche melissopalinoologiche	Morfologia granulo pollinico (PK)	
	Classe di rappresentatività	Classe I Pollini iporappresentati < 20.000 PK/10 g
	Classe di frequenza	Dal 2 al 20%
Caratteristiche organolettiche	Stato fisico	Liquido o cristallizzato
	Sapore	leggermente acido e amaro, abbastanza persistente.
	Colore	Varia da ambra chiaro a più scuro con tonalità arancio e riflessi verdastri quando liquido e da beige chiaro a più scuro con tonalità giallo-arancio se cristallizzato.
	Odore/Aroma	Aroma persistente. Fragranza con connotazioni floreali e fruttate.

2.3 Aspetti nutrizionali e salutistici del miele

Il miele presenta un valido aspetto nutrizionale: è stato calcolato che 100 g di miele forniscono 320 kcal grazie all'alta concentrazione di monosaccaridi (glucosio e fruttosio) che ne determinano anche una facile digeribilità.

Un altro aspetto nutrizionale del miele, e degli alimenti in genere, è la valutazione dell'attività antiossidante e antiradicalica. Lo stress ossidativo è un tipo particolare di stress chimico che si verifica come conseguenza dello sbilanciamento del rapporto ossidanti/antiossidanti, e che produce alterazioni a livello di DNA, proteine, carboidrati e lipidi. La natura ha predisposto dei sistemi di difesa attuati grazie a sostanze dotate di proprietà antiossidanti che comprendono meccanismi enzimatici e non-enzimatici [26]. Questi ultimi composti, assunti con la dieta, possono agire indipendentemente o in sinergia, mediante diversi meccanismi d'azione. Pertanto, un'adeguata alimentazione è in grado di contrastare gli effetti dei danni ossidativi.

Dall'enorme mole di dati presenti in letteratura, risulta che gli alimenti ricchi di sostanze antiossidanti riducono il rischio di alcune malattie tra cui quelle cardiovascolari, principalmente l'aterosclerosi [1, 27], e neurodegenerative [2]. L'ipertensione arteriosa, oggi, è una delle malattie maggiormente diffusa nei paesi industrializzati, e può essere tenuta sotto controllo adottando un'adeguata alimentazione ed uno stile di vita più sano.

Inoltre, da un punto di vista della salubrità e qualità degli alimenti, gli antiossidanti contribuiscono a minimizzare l'apporto di grassi ossidati (notoriamente fattori negativi), e concorrono a preservare le caratteristiche nutrizionali e sensoriali dell'alimento stesso.

La composizione del miele è piuttosto variabile, e dipende, principalmente, dalla sua origine floreale. Oltre agli zuccheri e all'acqua, nel miele è presente una vasta gamma di componenti minori, molti dei quali noti per le loro proprietà antiossidanti [7, 28] come gli acidi fenolici, i flavonoidi [29, 30], alcuni enzimi (glucosio ossidasi, catalasi e perossidasi) [31], l'acido ascorbico, i prodotti della reazione di Maillard [32], i carotenoidi [33], gli acidi organici [34], gli amminoacidi e le proteine [35].

Il miele, come fonte di antiossidanti, è risultato essere efficace contro le reazioni di ossidazione deteriorative degli alimenti come l'ossidazione lipidica [36, 31] e l'imbrunimento enzimatico di frutta e verdura [37].

Il miele non è solo un'alternativa alimentare allo zucchero, ma anche una fonte di micronutrienti che esplicano numerose attività nell'organismo. Alcune delle sostanze in esso contenute, in particolare i composti fenolici, conferiscono al miele un buon potere antiossidante, antinfiammatorio, batteriostatico ed antibatterico [38,39].

L'aterosclerosi. È una malattia multifattoriale che colpisce le arterie di medio e grosso calibro. Secondo l'ipotesi ossidativa, i fattori scatenanti sarebbero collegati all'ossidazione del colesterolo e delle LDL (*low density lipoprotein*) [40-42].

L'attacco da parte dei radicali liberi ai lipidi poliinsaturi presenti nelle membrane biologiche, determina l'avvio del processo di perossidazione lipidica, un processo di deterioramento O₂-dipendente, che porta alla compromissione dell'integrità delle membrane biologiche [43]. Questo processo è implicato nella modificazione ossidativa delle LDL e gioca un ruolo fondamentale nell'aterogenesi [44].

Le molecole lipidiche più suscettibili all'attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi (UFA), in particolare i polinsaturi (PUFA) presenti nei fosfolipidi, ed il colesterolo.

Durante la perossidazione lipidica delle membrane biologiche e delle lipoproteine [45], vengono prodotti ossisteroli come il 7 α -idrossicolesterolo (7 α -OH) e il 7 β -idrossicolesterolo (7 β -OH) che possono essere considerati degli indicatori molecolari del processo perossidativo [46]. Gli ossisteroli mostrano diverse azioni nocive, come citotossicità, angiotossicità, carcinogenicità, mutagenicità, inibiscono la mitosi, incrementano l'apoptosi e hanno effetti pro-ossidanti [47, 48]. Una dieta eccessivamente ricca di colesterolo comporta anche una maggiore esposizione dell'organismo agli ossisteroli, che possono formarsi durante la lavorazione e la conservazione di cibi come carni e prodotti lattiero-caseari [49].

Inoltre il Cu^{2+} è in grado di indurre perossidazione lipidica nelle LDL, reagendo con gli idroperossidi dei lipidi (agenti riducenti) presenti nelle LDL [50, 51], e dare origine al radicale perossile (LOO^\bullet) e alcossile (LO^\bullet) che possono causare l'ossidazione dei PUFA. Lo studio dell'ossidazione delle LDL in presenza di questo metallo è un modello importante per la comprensione dei fenomeni ossidativi che avvengono in alcune patologie [52].

2.4 Aspetti tossicologici di mieli uniflorali

Il miele, secondo la definizione contenuta nel *Codex Alimentarius*¹, può essere considerato un prodotto naturale per eccellenza. A causa dell'industrializzazione e dell'evoluzione della sua produzione, il miele, oltre alle sostanze acaricide che spesso vengono utilizzate all'interno dell'alveare e che possono residuare, può presentare contaminazioni da parte di altre sostanze inquinanti. Infatti, l'alveare è un potenziale accumulatore naturale di contaminanti che l'ape raccoglie dal territorio. Le sostanze a potenziale azione tossica per l'uomo, che si ritrovano nel miele, possono derivare sia da trattamenti irregolari da parte degli apicoltori per la cura delle malattie delle api (antibiotici, sulfamidici e agrofarmaci), sia dall'ambiente nel quale le api raccolgono il polline (agrofarmaci e metalli pesanti) oppure direttamente dalla pianta in quanto presenti nel nettare [17] e nella linfa. Tra queste ultime rientrano l'amigdalina nel miele di mandorla [53], alcuni diterpeni (graianotossine) nel Rododendro (*Rhododendron ponticum*) [54] e negli allori (*Kalmia latifolia* – *Kalmia angustifolia*), alcaloidi 1,2 deidropirrolizidinici nelle Boraginaceae e nel genere Senecio [11], alcaloidi benzofenantridinici nelle Papaveraceae [12], nicotina nel miele di tabacco e tiglio (*Tilia cordata*) [55] e caffeina nei mieli di arancio e di agrumi (che costituiscono i due classici prodotti derivati dal genere Citrus) [56, 57].

Oggetto di questo studio sono gli alcaloidi 1,2 deidropirrolizidinici (PAs) e benzofenentridinici (QBA).

¹ Raccolta di norme internazionali - creato dalla FAO (Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura) e dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) - sulla produzione ed il commercio dei prodotti alimentari.

Il programma internazionale sulla sicurezza chimica (IPCS) ha determinato che gli alcaloidi della pirrolizidina presenti nei prodotti alimentari sono una minaccia per la salute umana [58]. L'esposizione a lungo termine di piccole dosi di PAs nella normale dieta umana, può derivare dal consumo di piante o alimenti (miele, latte e uova) [59, 60] e può causare malattie veno-occlusive epatiche [61]. I PAs sono molecole epatotossiche, mutagene, carcinogene e genotossiche [13] al punto che la *German Federal Health* limita (nei prodotti vegetali) l'esposizione orale di alcaloidi della pirrolizidina o loro N-ossidi a 0,1 µg al giorno, mentre per le donne in gravidanza ed allattamento è totalmente sconsigliato [62, 11]. In Olanda, il limite massimo di PAs è stato fissato a di 0,1 µg per 100 g di cibo (1 ppb) [63, 13]. In Australia e Nuova Zelanda il *Food Standards Australia-Nuova Zelanda* (FSANZ) propone la dose di 1 µg di alcaloidi della pirrolizidina su kg di massa corporea al giorno [64, 11].

Nei paesi sottosviluppati la fonte principale di queste intossicazioni è il grano contaminato con semi di piante produttrici di PAs tra cui *Senecio burchellii*, *Senecio ilicifolius*, *Heliotropium popovii*, *Heliotropium europaeum* e *Crotalaria spp* [60].

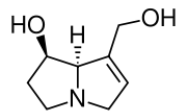
I PAs sono metaboliti secondari di più di 300 specie vegetali, appartenenti alle famiglie delle Boraginaceae (*Heliotropium*), Compositae (*Senecio*) e Leguminosae (*Crotalaria*) [65]. Il contenuto di PAs nelle piante varia a seconda delle specie vegetali e delle condizioni climatiche [61]. Dati di letteratura riportano che circa il 3% delle piante da fiore contengono alcaloidi tossici pirrolozidinici [60]. La loro presenza protegge le piante dal pascolamento: molti alcaloidi hanno un sapore amaro e gli animali imparano a riconoscere e ad evitare le specie che li producono.

Nel 2002 Edgar *et al.* [11] conclusero che i generi che contengono piante produttrici di PAs rappresentano una parte significativa di tutte le piante utilizzate nella produzione di miele. I PAs sono stati ritrovati in mieli uniflorali di: *Borago*, *Cynoglossum*, *Echium*, *Myosotis*, *Petasites*, *Senecio*, *Tussilago*, *Ageratum*, *Chromolaena*, *Crotalaria*, *Eupatorium* e *Heliotropium*. Mieli uniflorali derivati da questi generi di piante possono contenere fino a parecchi µg di PAs per grammo, e quindi sono maggiormente a rischio rispetto a quelli multiflorali.

Ad esempio, anche se con metodiche che hanno mostrato basse efficienze di estrazione, nel miele di *Senecio jacobea* sono stati trovati fino a 3,9 µg/g di PAs mentre il miele di *Echium plantagineum* ne possiede 0,95 µg/g [11].

Il termine 'alcaloidi della pirrolizidina' (alcaloidi 1,2 deidropirrolizidinici) descrive un gruppo di oltre 350 composti che mostrano come struttura base una delle quattro necine: platinecine, retronecine (**Figura 1**), eliotridine o otonecine.

Figura 1. Struttura della retronecina

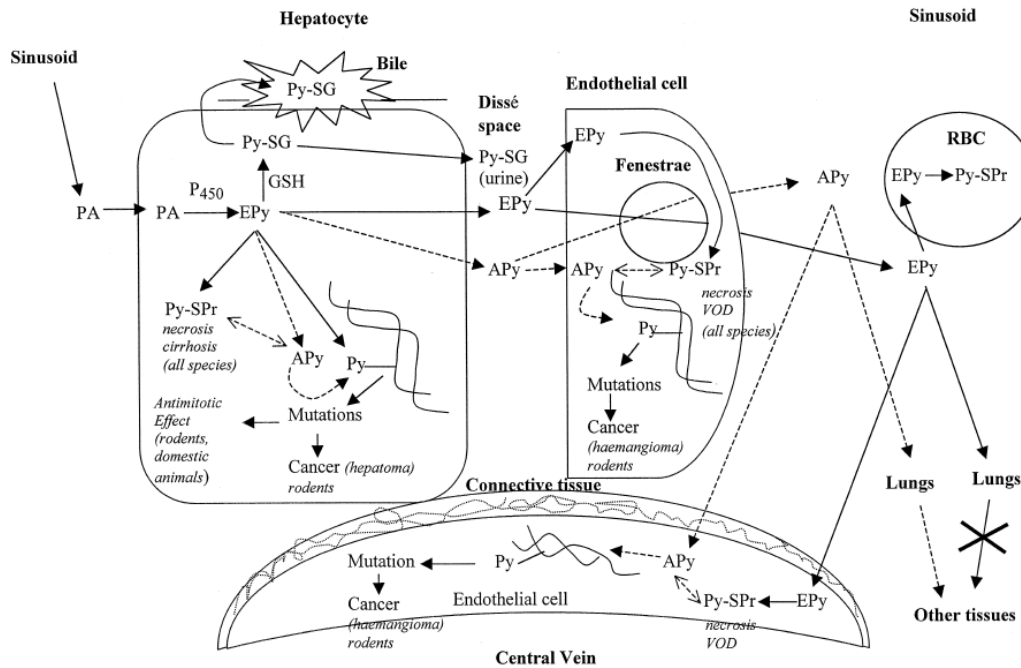


I PAs sono caratterizzati dalla la presenza di un gruppo azotato eterociclico a reazione alcalina. Queste sostanze derivano, di solito, da vegetali e possiedono forti azioni fisiologiche sull'uomo e animali. I PAs, durante il loro percorso di detossificazione, vengono trasformati nei loro rispettivi N-ossidi [61] in quanto, essendo più idrofili, vengono escreti più facilmente [66]. Tuttavia questo non può essere applicato a tutti i PAs: per esempio l'N-ossido delle riddelline è un metabolita tossico [67].

Alcune piante della famiglia delle borraginaceae contengono nelle radici alcaloidi della pirrolizidina molto pericolosi [68]. Le parti sotterranee delle piante del genere senecio (Compositae - Asteraceae) contengono, quasi sempre, un alcaloide fortemente tossico, la senecionina. I PAs sono agenti alchilanti altamente reattivi e sembrano accumularsi nei semi, mentre i rispettivi N-ossidi dominano nelle parti verdi della pianta.

Intossicazioni acute causate da PAs sono caratterizzate da epatotossicità e necrosi epatica emorragica [13]. E' dimostrato che, più che un'intossicazione acuta, è l'accumulo nel tempo degli alcaloidi contenuti che può dare veno-occlusione nel fegato e cirrosi epatica [65] (**Figura 2**).

Figura 2: Meccanismo di tossicità dei PAs (PA alcaloidi pirrolizidinici, EPY estere pirrolico, APy alcool pirrolico, GSH glutazione, Py-SG pirrolo-glutazione coniugato, Py-SPr pirrolo legato alla proteina, RBC globulo rosso) [65].

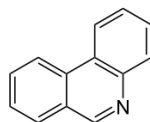


Un'altra famiglia di alcaloidi studiata, e che ha una potenziale azione tossica è quella degli alcaloidi benzofenantridinici (QBA), che sono stati ritrovati in mieli prodotti da piante appartenenti alla famiglia delle papaveraceae come *Eschscholzia cham* e *Macleaya cordata* [12]. Sono molecole dotate di attività antimicrobica, antinfiammatoria e pro-apoptotica [69-71] ma allo stesso tempo, sono considerate tossiche in quanto possiedono attività genotossica ed epatotossica [72, 14].

Queste sostanze provocano un cambiamento del sapore e della qualità del miele e sono potenzialmente rischiosi per la salute [12].

Gli alcaloidi benzofenantridinici (QBA), sottogruppo della iso-chinolina, descrivono un gruppo di sostanze aventi come struttura chimica la fenantridina (**Figura 3**).

Figura 3. Struttura del fenantridina



I QBA, presenti nelle parti ipogee (sotterranee) e nel lattice (la colorazione va dall'arancione al rosso sangue), a causa del loro azoto quaternario della struttura planare e policiclica, possono reagire con i gruppi nucleofili ed anionici degli aminoacidi di diverse biomolecole, recettori ed enzimi. Ad esempio, questi alcaloidi si legano ai microtubuli, inibiscono diversi enzimi tra cui la sodio-potassio-ATPasi, favoriscono la fosforilazione ossidativa e sono in grado di intercalarsi nelle regioni del DNA ricche in guanina-citosina [71].

Attualmente, gli esperimenti presenti in letteratura sulla ricerca di PAs nel miele sono condotti sempre con purificazioni SPE ed indagini HPLC-MS caratterizzate da bassi tassi di recupero [13, 73]. Luo et al. [12] propongono un metodo HPLC-MS, diretto ed accurato, per la ricerca nel miele di due alcaloidi QBA (sanguinaria e cheleritina).

Gli alcaloidi pirrolizidinici e benzofenentridinici costituiscono un rischio serio per la salute delle popolazioni esposte attraverso i prodotti alimentari [12, 13]. Essi sono presenti in numerose piante che si trovano nelle erboristerie e vengono utilizzate a scopo medicamentoso ed alimentare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Analisi generali

3.1.1 Reagenti e standard.

Tutti gli standard e i solventi usati erano di grado analitico. Metanolo, acetato di etile, acetonitrile, triclorometano, acido acetico, n-esano, acido formico, acido cloridrico, idrossido d'ammonio, reattivo di Folin-Ciocalteu e le TLC (silica gel, 20x20 cm, 60 F254) sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania). Gli standard di 5-idrossimetilfurfurale (HMF), acido (\pm)-2-cis,4-*trans* abscissico, acido fenil lattico e 7,8-dimethylalloxazine (lumicrome), 2,2-difenil-1-picrilidrazil radicale (DPPH), acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carbossilico (Trolox), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), cloruro ferrico esaidrato, solfato ferroso eptaidrato, acetato di sodio triidrato, idrossido di sodio, acido clorogenico, acido *trans*-caffeico, acido *trans*-p-cumarico, acido siringico, (+)catechina, (-) epicatechina, procianidina B1, procianidina B2, *trans*-resveratrolo, acido siringico, lipoproteine a bassa densità (LDL), acidi grassi, colesterolo, 5-cholesten-3 β -ol-7-one (7-cheto), 5-cholestene-3 β ,7 β -diol (7 β -OH), reagente Bradford, albumina, desferal (deferoxamine mesylate salt) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Fluka (Milano, Italia). Il carbonato di sodio, l'acido fosforico 85% e il CuSO₄·5H₂O sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia). Lo standard di acido (\pm)-2-*trans*, 4-*trans* abscissico è stato acquistato dalla A.G. Scientific, Inc (San Diego, California, USA). Gli standard di acido gallico, acido omogentisico, acido chinurenico, metil siringato, dei flavonoidi (quercetina, miricetina, canferolo, quercetina-3-*O*-glucoside, miricetina-3-*O*-glucoside, quercetina-3-*O*-rutinoside, canferolo-3-*O*-glucoside), degli antociani (delfinidina-3-*O*-glucoside, cianidina-3-*O*-glucoside, peonidina-3-*O*-glucoside, petunidina-3-*O*-glucoside, malvidina-3-*O*-glucoside) e degli alcaloidi (sanguinarina, chelitrina, senecionina e senecifillina) sono stati acquistati dalla Extrasynthes (Geney, Francia). Le membrane per dialisi (Spectra Por float-a-lyzer) sono state prodotte da Prodotti Gianni (Milano, Italia). L'acido cis, trans-13-hydroperoxy-octadeca-dienoic (c,t-13-HPODE) e l'acido cis, trans-9-hydroperoxy-octadeca-dienoic (c,t-9-HPODE) sono stati acquistati da Cascade (Cascade Biochem. Ltd., Londra, UK).

L'acqua ultrapura (18 mΩ) è stata ottenuta con un apparato Milli-Q (Millipore, Milano, Italia).

3.1.2 Campioni.

Sono stati analizzati 159 campioni di miele uniflorale di origine floreale e geografica differente (asfodelo, corbezzolo, cardo, eucalipto, sulla, agrumi, lavanda, castagno e melata di cisto) prodotti in Sardegna nelle annate 2004-2009 da apicoltori professionisti (**Tabella 6**). Tutti i mieli erano stati precedentemente selezionati in base ad analisi sensoriale [15, 22] e melissopalinologica (*vedi sez. 3.1.3*). Inoltre sono stati analizzati, per effettuare uno *screening* più ampio delle tipologie di miele, 52 campioni (erica, acacia, salvia, timo, girasole, tiglio, marruca, sideritis, castagno e melata) forniti dal CRA (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Bologna) e prodotti nel periodo 2004-2009.

Tabella 6. Elenco dei campioni di miele analizzati

	Campioni	n°	Anno produzione	Luogo di Produzione
1	Asfodelo	39	2004-2009	Sardegna - Italia (CRA)
2	Corbezzolo	36	2005-2009	Sardegna
3	Cardo	30	2004-2009	Sardegna
4	Eucalipto	22	2004-2009	Sardegna - Italia (CRA)
5	Sulla	15	2007-2009	Sardegna
6	Agrumi	8	2004-2009	Sardegna
7	Lavanda	2	2009	Sardegna
8	Erica	9	2005-2006	Italia (CRA)
9	Acacia	6	2008	Italia (CRA)
10	Salvia	2	2008	Italia (CRA)
11	Timo	3	2008	Italia (CRA)
12	Girasole	2	2008	Italia (CRA)
13	Tiglio	2	2008	Italia (CRA)
14	Marruca	2	2008	Italia (CRA)
15	Sideritis	2	2008	Italia (CRA)
16	Cisto	6	2009	Sardegna
17	Castagno	14	2008-2009	Sardegna - Italia (CRA)
18	Melata	11	2008	Italia (CRA)

I campioni sono stati conservati a 4°C in bottiglie di vetro scuro. Le analisi per valutare l'aspetto tossicologico dei mieli, sono state effettuate esclusivamente sui mieli sardi, in quanto sono gli unici di cui si possiede un campionamento consistente, e sui campioni di acacia (utilizzata come bianco) forniti dal CRA.

I campioni di nettare (**Tabella 7**) di *Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv. (n = 3) sono stati raccolti nell'aprile 2008 in zone diverse della Sardegna, dal centro (Borore) al settentrione (Ploaghe). I campioni di nettare di *Arbutus unedo* L. (n = 4) sono stati raccolti nell'inverno di diverse annate in quattro diverse zone della Sardegna rappresentanti le aree di maggior produzione di miele di corbezzolo. Entrambi i campionamenti di circa 2500 fiori ciascuno sono stati effettuati, in triplicato, dalle 4 alle 12 del pomeriggio cioè durante il flusso principale di nettare, utilizzando particolari pipette a due bulbi [74] dal gruppo del Prof. I. Floris (Dipartimento Protezione Piante, Sez. Entomologia Agraria, Università degli Studi di Sassari).

A causa della conformazione dei fiori di *G. tomentosa* Moench, non è stato possibile raccogliere direttamente il nettare e, per questo motivo, sono stati impiegati approcci diversi. In primo luogo sono stati analizzati, in triplicato, campioni di miele grezzo ottenuto sotto raccolta controllata, effettuata con arnie nuove in un'areale costituito da oltre il 90% di *galactites tomentosa* in fioritura precoce. Il campionamento è stato effettuato dal gruppo del Prof. Floris in due momenti diversi (9 e 25 maggio 2010) all'inizio del periodo di fioritura della *G. tomentosa*. Inoltre è stato eseguito un esperimento direttamente sui fiori di *G. tomentosa* raccolti nel mese di maggio 2009 nelle campagne intorno a Sestu (CA) e si è analizzato un miele di cardo prodotto in Sicilia nel 2009 per verificare le eventuali similitudini o differenze con i mieli prodotti in Sardegna.

Tabella 7. Elenco dei campioni analizzati

Campioni	Tipologia	Periodo di produzione	Luogo di Produzione
Asfodelo	Nettare	26 Aprile 2008	Ploaghe (SS)
		26 Aprile 2008	Borore (NU)
		21 Aprile 2008	Ploaghe IV (SS)
Corbezzolo	Nettare	10 Dicembre 2007	Berchideddu (OT)
		17 Dicembre 2008	Palamadula (SS)
		07 Gennaio 2009	Berchideddu (OT)
		07 Gennaio 2009	Berchidda (OT)
Cardo	Miele grezzo	9 Maggio 2010	Sardara (VS)
		25 Maggio 2010	Sardara (VS)
	Fiori	Maggio 2009	Sestu (CA)

3.1.3 Analisi melissopalinoologica.

Le analisi melissopalinoologiche, sia qualitative che quantitative, sono state realizzate seguendo il metodo dell'*International Commission of Bee Botany* [21, 23], dal gruppo del Prof. Floris.

3.1.4 Tenore di acqua.

Il processo di trasformazione del nettare in miele ha inizio quando l'ape bottinatrice, rientrando nell'alveare, passa ad un'ape di casa la goccia di materia prima raccolta. La stessa goccia di nettare viene poi rapidamente passata da un'ape all'altra, e questo processo, che si svolge per 15-20 minuti, provoca la riduzione dell'elevato contenuto iniziale di acqua grazie all'aria relativamente calda e secca all'interno dell'alveare e all'estesa superficie che occupa la goccia di nettare lungo la ligula allungata dell'ape. La goccia, ancora per qualche aspetto immatura, è poi collocata negli alveoli dei favi, dove il suo contenuto di acqua viene ulteriormente abbassato tramite un processo di evaporazione. Con questo processo si ottiene il miele maturo, cioè con contenuto di acqua sufficientemente basso da garantirne la stabilità (inferiore al 18%). A questo punto la cella viene sigillata dalle api mediante un opercolo di cera. Complessivamente, quindi, l'azione dell'ape porta ad una riduzione del contenuto di acqua mediante evaporazione, fino a raggiungere un valore compatibile con la conservabilità del miele.

Per la determinazione del tenore di acqua è stato impiegato un rifrattometro portatile che permette la lettura della percentuale di acqua dal 12 al 26% (*ATAGO Hand Refractometer Honey, Atago Co. Ltd, Tokyo, Giappone*) [75, 76].

3.1.5 Coordinate cromatiche.

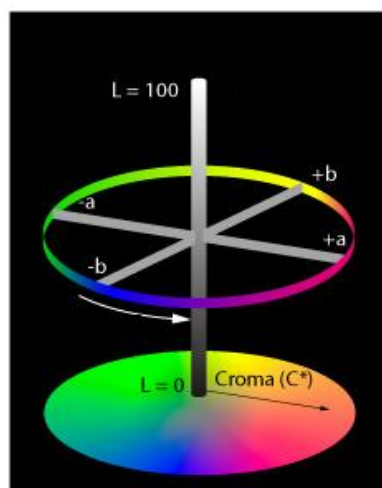
Attualmente, la standardizzazione delle caratteristiche colorimetriche appartiene alle esigenze della moderna produzione e commercializzazione degli alimenti poiché spesso, quello che percepiamo attraverso il solo senso della vista diventa discriminatorio per gusto ed olfatto. Questo parametro è stato studiato perché il colore è importante per il consumatore che non è invogliato all'acquisto se l'alimento subisce variazioni di colore.

Il colore è un parametro che dipende fondamentalmente dal tipo di miele, ma può essere influenzato dall'invecchiamento del prodotto o da lavorazioni non accurate (riscaldamento eccessivo).

Per rendere il dato relativo al colore il più possibile oggettivo, la CIE (Commissione Internazionale per l'Illuminazione) ha fissato una serie di condizioni standard per la valutazione dei colori [77].

La **Figura 4** mostra uno schema esemplificativo delle coordinate cromatiche CIE $L^*a^*b^*C^*h^*$, un sistema che permette di valutare i principali attributi del colore di una matrice.

Figura 4. Coordinate cromatiche CIE $L^*a^*b^*C^*h^*$



Per questa analisi è stato impiegato uno spettrofotometro UV-visibile Varian Cary 50 Scan (Varian, Leini, Torino) collegato a un PC e i dati sono stati elaborati con un apposito software Cary Win UV Color Application v. 2.00. I valori di trasmittanza sono stati acquisiti nell'intervallo 380-780 nm, utilizzando l'illuminante D65 e un angolo di osservazione di 10°. I campioni sono stati letti tal quali in cuvette di polistirene di grado ottico da 10 mm (Kartell 01937-00). Nel caso di mieli cristallizzati, è stato necessario omogeneizzare e fluidificare i campioni, utilizzando un bagnetto ad ultrasuoni per 60 min (temperatura dell'acqua 45°C).

3.1.6 Analisi statistica.

I dati sono stati espressi come media di tre replicati e le differenze statisticamente significative sono state determinate con l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) e il test di Duncan ($p < 0,05$), utilizzando il software GenStat v. 7.1 (VSN International Ltd., Herts, U.K.).

3.2 Caratterizzazione

3.2.1 Estrazione.

La procedura migliore per ottenere composti puri dal miele è stata l'estrazione iniziale del miele con acetato di etile [78-80]. Inizialmente è stata messa a punto una metodica che prevedeva la solubilizzazione del miele in acqua e successiva estrazione con acetato di etile. Infatti, per i campioni di asfodelo e corbezzolo, 5 g di miele, sono stati solubilizzati in 5 mL di acqua ultra pura, in provette con tappo a vite da 40 mL. Sono poi stati aggiunti 5 mL di acetato di etile ed infine si è miscelato per 5 minuti con l'agitatore rotante. Le estrazioni sono state effettuate su un totale di 500 g e le frazioni di acetato di etile, riunite insieme in un pallone da vuoto, sono state portate a secco utilizzando flusso di azoto. L'estratto concentrato del miele è stato utilizzato per la purificazione su TLC (asfodelo e corbezzolo) e per l'HPLC preparativa (corbezzolo).

Per il miele di cardo si è effettuata l'estrazione mediante acetato di etile. Un kg di miele è stato estratto, per 5 volte, con 300 mL di acetato di etile. Le frazioni di acetato di etile, riunite insieme in un pallone da vuoto, sono state portate a secco utilizzando un evaporatore rotante (*Heidolph VV 2000*). L'estratto concentrato del miele è stato utilizzato per la purificazione in colonna. L'estratto è stato usato per la purificazione su tre differenti colonnine SPE (*Solid Phase Extraction*): C₁₈, SiOH e NH₂.

3.2.2 Separazione mediante TLC.

Per il miele di asfodelo, la TLC (*thin-layer chromatography*) su gel di silice è stata sviluppata con esano-acetato di etile (7,5:2,5 v/v) mentre, per il miele di corbezzolo, con esano-acetato di etile-acido formico (3:6:1 v/v/v). Le bande corrispondenti ai composti **A1** e **C2** (per le strutture *vedi oltre, sezione 4.2 - tabella 14*), evidenziate a $\lambda = 254$ e $\lambda = 366$ nm, sono state grattate (25 laste ognuna) ed estratte con acetato di etile (**Tabella 8**). L'estratto, mandato a secco mediante flusso di azoto, è stato solubilizzato con una miscela di acqua:acetonitrile 70:30 (v/v)), filtrato per rimuovere l'eventuale gel di silice presente (Acrodisc CR 13 mm, 0,45 μ m PTFE membrane, Pall Life Science, Varese) ed analizzate tramite HPLC-DAD, NMR, LC-Q TOF e HPLC-MS/MS. Con tale metodica di estrazione sono stati ottenuti circa 9 mg di composto puro per ciascuna banda.

Tabella 8 – Caratteristiche cromatografiche

	TLC	HPLC-DAD
	R_f (<i>Rapporto rispetto al fronte</i>)	t_R (<i>Tempo di ritenzione</i>)
Asfodelo (A1)	0,72	18,0
Corbezzolo (C2)	0,84	14,8

3.2.3 Purificazione con SPE.

La procedura migliore per ottenere il composto puro a $t_R=18,0$ (**G2**) (vedi sezione 4.2 - **tabella 14**) dal miele di cardo, è stata la purificazione su tre differenti colonnine SPE (*Solid Phase Extraction*): C_{18} , SiOH e NH_2 .

- ✓ **SPE C_{18}** . L'estratto è stato sospeso con 1-2 mL di acqua con l'ausilio del bagno a ultrasuoni. Il campione è stato purificato utilizzando una colonna SPE C_{18} (*Varian Bond Elut 500mg, 3mL*) precedentemente attivata con metanolo (2 mL x 2 volte) e lavata con acqua ultra pura (2 mL x 3 volte). La prima frazione è stata eluita con acqua mentre la seconda con una miscela di acqua e metanolo 50:50 (v/v) perché una miscela più lipofila aumenta l'eluizione. La terza frazione è stata eluita con metanolo puro. L'analisi HPLC-DAD di queste tre frazioni mostra che con questa metodica si ha una buona purificazione dell'incognito **G2** del cardo che ritroviamo abbondante nella seconda frazione.
- ✓ **SPE SiOH**. Dopo il primo passaggio in SPE C_{18} , è stata effettuata una seconda purificazione in SPE gel di silice (SiOH) (*JT Baker Bakerbond SPE 40 μ m APD, 60A, 3mL*). La seconda frazione (acqua/metanolo 50:50) della precedente purificazione su C_{18} , non è utilizzabile tal quale in quanto è necessario eliminare l'acqua che interferirebbe nella nostra separazione. È stato eliminato il metanolo tramite evaporatore rotante e, successivamente, l'acqua attraverso estrazioni in provetta con acetato di etile, fino a che il residuo acquoso è diventato incolore (5 mL x 3 volte). L'acetato di etile è stato eliminato con l'evaporatore rotante, ed il residuo è stato sospeso in cloroformio (1-2 mL) con l'aiuto del bagno a ultrasuoni ed estratto fino a che non è diventato incolore. La cromatografia in gel di silice è stata sviluppata con cloroformio come fase mobile. La colonna è stata attivata con una miscela di $CHCl_3/CH_3OH$ (90:10; v/v), e sono stati effettuati successivi lavaggi con $CHCl_3$. La prima frazione è stata raccolta eluendo con $CHCl_3$. La seconda frazione è stata eluita con una miscela $CHCl_3/CH_3OH$ 90:10 (v/v). L'analisi HPLC-DAD di queste frazioni mostra che la molecola **G2** si trova in elevata concentrazione nella seconda frazione.
- ✓ **SPE NH_2** . L'ultimo passaggio su colonna SPE viene effettuato su NH_2 (*Varian Bond Elut 500mg, 3 mL*), colonna che ci permette di avere una buona

separazione del composto di interesse. La colonna è stata attivata con una miscela CH₃CN:CH₃OH 90:10 (v/v) e lavata con CH₃CN (v/v). Il campione derivante dalla seconda frazione della colonna in gel di silice, è stato svaporato in evaporatore rotante per eliminare il cloroformio. Il campione concentrato è stato, successivamente, ripreso con 1 mL di CH₃CN e immesso in colonna. La prima frazione è stata eluita con CH₃CN fino a quando l'anello bruno in testa non fosse eluito. La seconda frazione è stata eluita sempre con CH₃CN, ed è stata raccolta fino a quando la banda scura superiore coprì i 2/3 della colonna. La terza frazione è stata eluita con una miscela CH₃CN:CH₃OH 90:10 (v/v). Tutte le frazioni raccolte sono state svaporate e il residuo ripreso con 1 mL di CH₃OH. L'analisi HPLC-DAD mette in evidenza l'efficacia delle purificazioni; infatti troviamo il composto **G2** in elevata concentrazione nella seconda frazione con una purezza dell'90%.

Al termine delle tre purificazioni in SPE, da 1 kg di miele di cardo si sono ottenuti circa 8 mg di composto **G2** puro utilizzato per l'analisi LC-MS/MS, LC-Q TOF, IR e NMR.

3.2.4 Separazione mediante HPLC-DAD preparativa.

La separazione TLC di 2 composti presenti nel miele di corbezzolo a t_R 21,9 e 23,1 min (**C3** e **C4**) (vedi sezione 4.2 - **tabella 14**) non è stata soddisfacente per cui si è effettuata l'analisi HPLC-DAD preparativa (**Tabella 9**). È stato impiegato un sistema HPLC Varian serie ProStar munito di un modulo pompe 230, un autocampionatore 410 con loop da 100 μ L e un detector a serie di diodi SpectroSystem UV 6000lp (ThermoSeparation, San Jose, CA, USA) impostato a $\lambda = 280$ nm. La separazione è stata ottenuta tramite una colonna Polaris C8 (PN 2010 – 250 x 100 mm, 5 μ , Varian, Milano) usando come fase mobile acido fosforico 0,2 M ed acetonitrile 70:30 (v/v) ad un flusso costante di 3 mL/min. Gli estratti di miele ottenuti portando a secco l'acetato di etile (vedi paragrafo 3.2.1) sono stati solubilizzati con una soluzione H₂O:CH₃CN 70:30 (v/v) ed iniettati.

Le frazioni eluite corrispondenti ai tempi di ritenzione di 13,3 e 14,1 min (**C3** e **C4**) sono state raccolte. Dopo circa 50 iniezioni HPLC, ciascuna frazione è stata estratta con 5 mL di acetato di etile e 0,5 g di NaCl, recuperando la fase organica.

I composti puri (ca. 10 mg ciascuno) sono stati ottenuti dopo aver eliminato l'acetato di etile tramite flusso di azoto e, successivamente, analizzati tramite HPLC-DAD, NMR, LC-Q TOF e HPLC-MS/MS.

Tabella 9 – Caratteristiche cromatografiche molecole del corbezzolo

	HPLC-DAD-PREP	HPLC-DAD
	t_R (tempo di ritenzione)	t_R (tempo di ritenzione)
Corbezzolo (C3)	13,3	21,9
Corbezzolo (C4)	14,1	23,1

3.2.5 Analisi HPLC-DAD.

I composti fenolici del miele e l'HMF sono stati dosati direttamente su campioni opportunamente diluiti (miele di corbezzolo, melate, castagno 1:10 p/v; altri mieli 1:5 p/v) con acqua ultrapura e filtrati con setti di cellulosa acetato GD/X da 0,45 μm , 25mm \varnothing (Whatman, Milano). Le analisi sono state effettuate con lo stesso sistema HPLC-DAD Varian serie ProStar descritto precedentemente (vedi paragrafo 3.2.4), ma utilizzando un volume di iniezione di 10 μL . La separazione è stata ottenuta con una colonna Phenomenex Synergi Hydro-RP C18 80A (150x 4,60 mm, 4 μm Chemtek Analitica, Anzola Emilia, Bologna) usando come fase mobile una miscela di acido fosforico 0,22 M (solvente A) ed acetonitrile (solvente B) ad un flusso costante di 1 mL/min miscelati secondo la seguente programmata:

Tempo Min	A %	B %
0	90	10
5	90	10
20	65	35
40	10	90
50	10	90

Prima di ogni iniezione il sistema è stato stabilizzato per 10 min alle concentrazioni iniziali A/B (90:10, v/v).

Le soluzioni madre di standard sono state preparate in metanolo mentre le soluzioni di lavoro in acqua ultrapura. Le rette di taratura sono state costruite con il metodo dello standard esterno, correlando l'area dei picchi con la

concentrazione. I valori di correlazione (*r*) erano compresi tra 0,9993 e 0,9999 nell'intervallo 1 - 100 mg/kg. L'acido fenilattico è stato dosato a 210 nm, l'HMF (5-idrossimetilfurfurale), il metil siringato, l'acido omogentisico, gli acidi abscissici, l'unedone, e il lumicrome a 280 nm.

3.2.6 Analisi HPLC MS/MS.

Le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC-MS/MS Varian (Varian Palo Alto, CA, USA) costituito da uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo 1200 L munito di sistema di ionizzazione elettrospray (*electrospray ionization*, ESI). Sono state effettuate rapide identificazioni con infusione diretta nello spettrometro di massa del composto, oppure iniettando 10 μ L di campione impiegando per la separazione una colonna Licrocart Purosher Star RP-18e (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) utilizzando acqua ultrapura e acetonitrile 60:40 (v/v) come fase mobile al flusso di 0,4 mL/min. Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato usato il sistema Varian MS Workstation version 6.6.

Il sistema è stato ottimizzato per lavorare in modalità positiva o negativa (**Tabella 10**); il tempo di scansione è stato di 0,2 s e le molecole di analita deprotonate sono state ottenute dallo ione precursore tramite una collisione indotta con argon in modalità MRM (*multiple reaction monitoring*).

Tabella 10 – Ottimizzazione sistema HPLC-MS/MS

	Asfodelo A1	Corbezzolo			Cardo G2
		C2	C3	C4	
<i>rT</i> (min)	18,0	14,8	21,9	23,1	18,0
ESI	-	+	-		+
Ione precursore (<i>m/z</i>)	211,0	241,1	263,3		243,0
Potenziale del capillare	-55V	-40 V	-55V		+75V
Gas di Desolvatazione	Aria a 300° C	Azoto a 300° C	Aria a 300° C		Azoto a 300° C
Temperatura dell'API	44° C	40° C	43° C		55° C
Argon (mTorr)	2,18	2,18	2,18		2,40
Voltaggio del Detector	1.200 V	1.500 V	1.050 V		1.350 V

3.2.7 Analisi HPLC-MS Q-TOF.

Per alcuni composti si è reso necessario l'utilizzo di una tecnica cromatografica ad alta risoluzione. Il composto **C1** del miele di corbezzolo ed il composto **G2** del miele di cardo (*vedi sezione 4.2 - tabella 14*) sono stati analizzati con un sistema HPLC Agilent serie 1200 munito di una colonna Agilent Zorbax 300 SB-C18 5 μm , 43 mm x 75 μm (Agilent, California, USA). La miscela eluente era composta da (A) acqua ultrapura contenente 0,1% di acido formico e (B) acetonitrile al flusso 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Il gradiente per il composto del corbezzolo partiva a $t = 0$ min con 5% di B per arrivare al 100% di B in 10 min mentre quello del composto del cardo partiva a $t = 0$ min con 20% di B per arrivare al 100% di B in 10 min. I campioni sono stati analizzati in ESI in modalità positiva usando un Agilent 6520 *Time of Flight* (TOF) MS. I dati dello spettro di massa sono stati acquisiti nell'intervallo m/z 100 – 1.000, con un tempo di acquisizione di 1,35 spectra/s, considerando una media di 10.000 transienti. I parametri della sorgente erano: temperatura del *drying gas* 250 °C, flusso del *drying gas* 12 L/min per **C1** e 5 L/min per **G2**. Pressione del nebulizzatore 45 psi, e voltaggio del frammentatore 150 V. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante il software *Agilent MassHunter Workstation Acquisition v. B.02.00*.

3.2.8 Analisi NMR e IR.

Per il composto **A1** del miele di asfodelo (*vedi sezione 4.2 - Tabella 14*), gli spettri sono stati registrati a 300 K con uno spettrometro Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) operando a 600 MHz per ^1H e 150 MHz per ^{13}C .

Per i composti **C2**, **C3** e **C4** del miele di corbezzolo e **G2** del miele di cardo gli spettri NMR sono stati registrati a 25 °C con uno spettrometro *Varian Unity INOVA* 400 MHz, operando a 400 MHz per ^1H e 100 MHz per ^{13}C .

I composti **C2**, **C3** e **C4** sono stati misurati in CDCl_3 mentre **G2** in $\text{DMSO}-d_6$ e gli spettri confrontati con i solventi non deuterati.

I dati sono stati processati utilizzando un software Topspin v. 1.3 software package. Le analisi NMR sono state condotte dal *Dr. Filippo Cottiglia* del

Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico della Facoltà di Farmacia dell'Università di Cagliari.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro *FT-IR Perkin-Elmer* 2000 utilizzando pastiglie di KBr.

3.3 Attività antiossidante

3.3.1 Test in vitro di valutazione dell'attività antiossidante ed antiradicalica.

Il potere antiossidante è stato determinato mediante due metodiche largamente impiegate per questa tipologia di analisi: il DPPH (potere antiradicalico) e il FRAP (potere antiossidante totale). Inoltre, vista la presenza di sostanze fenoliche nel miele e la loro importanza come molecole antiossidanti (*vedi sezione 2.3*), si è valutato il contenuto di polifenoli totali (PT) con il metodo del Folin-Ciocalteu e sono stati dosati i singoli composti fenolici presenti nel miele mediante analisi HPLC-DAD.

La valutazione del potere antiossidante è stata effettuata sia sui mieli tal quali, che su sostanze presenti nel miele, e definiti per poter valutare meglio il contributo delle singole molecole sul potere antiossidante del miele.

3.3.1.1 Determinazione dei polifenoli totali.

Il contenuto totale di sostanze fenoliche (PT) nei mieli è stato ottenuto mediante la determinazione spettrofotometrica con il reattivo di Folin-Ciocalteu [78]. A 100 µL di campione opportunamente diluito con acqua ultrapura (miele corbezzolo, melate, castagno 1:10 p/v; altri mieli 1:5 p/v) sono stati aggiunti 500 µL di reattivo di Folin-Ciocalteu in un matraccio tarato da 10 mL. Dopo 5 min sono stati aggiunti 3 mL di Na₂CO₃ al 10%, si è quindi portato a volume con acqua ultrapura e si è lasciato reagire per 90 min. I campioni sono stati centrifugati e poi analizzati alla lunghezza d'onda di 725 nm utilizzando cuvette di quarzo da 10 mm con lo spettrofotometro Varian Cary 50 Scan. La retta di calibrazione è stata costruita con l'acido gallico alle seguenti concentrazioni: 400/200/100/50/20/10 mg/L ed il contenuto di polifenoli del campione, corretto in funzione delle diluizioni, è stato espresso come mg/kg di acido gallico equivalente (AGE).

3.3.1.2 Attività antiradicalica.

L'attività antiradicalica dei mieli è stata determinata usando il metodo del radicale DPPH [78]. Si tratta di un'analisi spettrofotometrica in cui la decolorazione della soluzione è stechiometrica rispetto al numero di elettroni catturati. Il dato fornisce la misura della capacità del campione analizzato di bloccare l'attività dei radicali liberi. 50 μ L di campione opportunamente diluito con acqua ultrapura (miele corbezzolo, melate, castagno 1:10 p/v; altri mieli 1:5 p/v), sono dissolti in 2,0 mL di DPPH (0,04 mmol/L in metanolo). La miscela viene agitata vigorosamente, lasciata reagire per 60 min al buio a temperatura ambiente e successivamente letta con lo spettrofotometro a $\lambda = 517$ nm, usando cuvette di polistirene di cammino ottico di 10 mm. La curva di calibrazione è stata costruita con il Trolox, un analogo idrosolubile della vitamina E, alle diluizioni di 0,8/0,4/0,2/0,1/0,05/0,02 mmol/L ed i risultati, corretti in funzione delle diluizioni, sono stati espressi in capacità antiossidante equivalente di Trolox (TEAC, mmol/kg).

3.3.1.3 Attività antiossidante totale.

Il FRAP è un test diretto a valutare la capacità antiossidante totale del campione [78, 81]. Viene misurata la variazione di assorbanza a 593 nm dovuta alla formazione di una soluzione colorata in blu del Fe^{II} -tripiridiltriazina, quando il complesso Fe^{III} -tripiridiltriazina di color rossastro viene ridotto. Si tratta di un'analisi spettrofotometrica nella quale la retta di calibrazione viene costruita con uno standard di solfato ferroso alle concentrazioni di 4/2/1/0,5/0,2/0,1 mmol/L. A 2 mL di FRAP sono stati aggiunti 20 μ L di standard o di campione opportunamente diluito con acqua ultrapura (miele corbezzolo, melate, castagno 1:10 p/v; altri mieli 1:5 p/v) e, dopo 4 min di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati letti a $\lambda = 593$ nm con lo spettrofotometro, utilizzando cuvette di polistirene di cammino ottico di 10 mm. I risultati, corretti in funzione delle diluizioni, vengono espressi in mmol Fe^{2+} /kg.

3.3.1.4 Determinazione dell'attività antiossidante dei principi attivi.

Per determinare l'attività antiossidante di composti caratteristici presenti nel miele (*markers*) ed individuati con l'analisi HPLC-DAD (*vedi sezione 3.2.5*), sono state applicate le metodiche spettrofotometriche precedentemente descritte (FRAP e DPPH) direttamente sui principi attivi puri.

Ogni *marker* è stato analizzato alle concentrazioni di 100, 50, 20 e 10 ppm in acqua per il FRAP ed in metanolo per il DPPH. L'analisi quantitativa è stata effettuata con il metodo dello standard esterno dal quale si ricava l'attività antiossidante espressa in mmol Fe²⁺ o mmol TEAC per ogni g di sostanza pura.

3.3.2 Test in *semi-vivo* dell'effetto vasodilatatorio del miele di corbezzolo sul sistema circolatorio.

Tra le 18 tipologie di miele analizzate in questo lavoro il miele di corbezzolo possiede il più alto contenuto in polifenoli totali (*vedi sezione 4.3.1*). Sulla base di queste osservazioni si è testato l'eventuale effetto vasodilatatorio di questo miele su un modello sperimentale di aorta applicato a due specie animali: ratto e porcellino d'india.

3.3.2.1 Preparazione di campioni di aorta.

L'esperimento, condotto presso il gruppo del Prof. M. Boban della facoltà di Medicina dell'Università di Spilt (Croazia), è stato approvato dall'*Ethics Committee of the University of Split School of Medicine* nel mese di marzo 2010.

Un ratto maschio *Wistar* e un porcellino d'India ciascuno del peso di circa 300±20 g hanno ricevuto un'iniezione intraperitoneale di uretano 20% (1,2 g/kg) e sono stati decapitati dopo che vi era più alcuna risposta agli stimoli. E' stata prelevata l'aorta discendente da ciascun animale e, dopo l'eliminazione del tessuto grasso [82], è quindi stata tagliata in 4 parti (3-4 mm). Le parti di aorta sono state messe in una soluzione di *Krebs-Henseleit* (soluzione che riproduce il fluido extracellulare) formata da: NaCl 120 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 2,5 mM; NaHCO₃ 25 mM and glucosio 10 mM.

3.3.2.2 Parte sperimentale.

Il sistema (**Figura 5**) è formato da otto camere, ognuna delle quali riproduce le normali condizioni del sistema circolatorio. L'esperimento è stato condotto simultaneamente per entrambi i tessuti animali. In ciascuna camera viene deposto un pezzo di aorta montato tra due ganci di acciaio chirurgico ed immerso in circa 20 mL di soluzione di *Krebs-Henseleit*. In ogni camera viene mantenuta la temperatura di 37° C e inoltre viene fatto fluire ossigeno alla pressione di 1 kPa [10, 83].

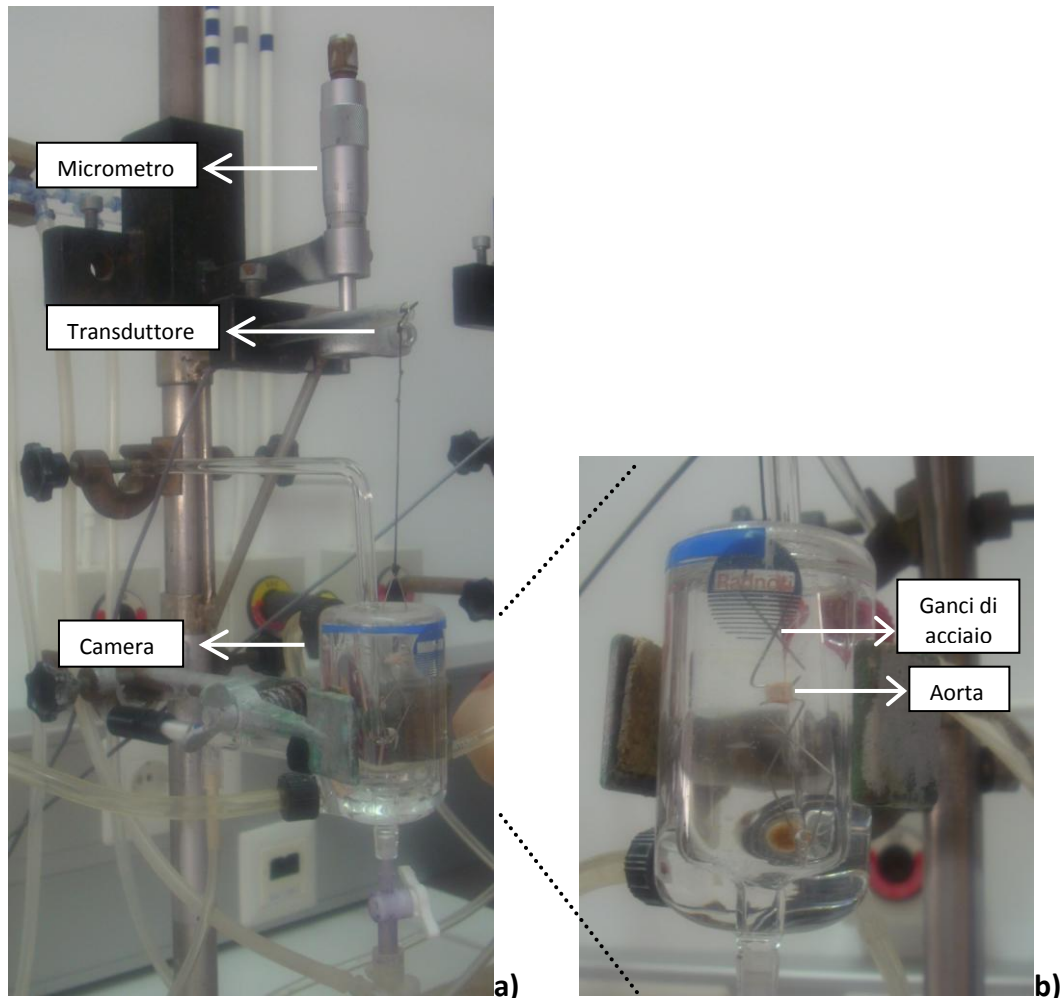
Figura 5. Sistema per isolare i vasi sanguigni.



La porzione di aorta (**Figura 6 a-b**) è stata inserita nel sistema e mantenuta tesa posizionando i cavi di acciaio in modo che un gancio rimanesse fermo, mentre l'altro fosse collegato ad un sistema di trasduzione della forza (*force-displacement transducer*, Fort-100), che permette la misurazione di forze molto piccole. Per poter valutare l'effetto vasodilatatore o vasocostrittore dell'aorta in seguito ad uno stimolo, è stato utilizzato un sistema di amplificazione della forza Transbridge 4M connesso con un computer software graphpad. Durante la

vasocostrizione la forza risultante sarà maggiore; durante la vasodilatazione succede il contrario.

Figura 6. a) Ingrandimento del Sistema. b) Ingrandimento della camera del campione.



Il sistema è stato lasciato stabilizzare per circa 30 minuti durante il quale si è cambiata la soluzione di Krebs- Henseleit per 3 volte ed è stata imposta la forza di zero mN (milli Newton) su ogni campione.

I campioni di aorta sono stati precontratti per valutare la vitalità del vaso (*smooth muscle cell*) utilizzando una soluzione di KCl 60mM (400 μ L) introdotta all'interno di ogni camera (20mL di Krebs-Henseleit). Dopo aver valutato la vitalità del vaso, la soluzione di Krebs-Henseleit è stata cambiata da ogni camera per 3 volte in modo da riportare la forza a zero mN. E' stata ripetuta la precontrazione con KCl e poi di nuovo stabilizzato il sistema.

I campioni di aorta sono stati precontratti nuovamente con noradrenalina (NA) 10^{-6} e 10^{-7} mol/L rispettivamente per i campioni di ratto e porcellino d'India. Sono stati introdotti 100 μ L di NA all'interno di ogni camera (20mL di Krebs-Henseleit). La NA come il KCl agisce sulle cellule muscolari lisce ed in questo modo si può valutare nuovamente la vitalità del vaso. La vasocostrizione indotta da KCl nei ratti è più potente di quella indotta da NA. Nei porcellini d'India avviene il contrario.

Una volta che la vasocostrizione indotta da NA si stabilizza, viene aggiunta al sistema acetilcolina (Ach) 10^{-6} e 10^{-5} mol/L, rispettivamente per i campioni di ratto e porcellino d'India, senza lavare le camere. L'acetilcolina, neurotrasmettitore che possiede recettori nell'endotelio, produce vasodilatazione e quindi diminuzione della forza. In questo modo viene valutata la vitalità dell'endotelio. Inoltre se la percentuale di vasocostrizione indotta dall'NA e quella di vasodilatazione indotta dall'Ach sono le stesse, vuol dire che il sistema sta funzionando bene e quindi si può procedere con l'analisi dei campioni.

Prima di iniziare con l'analisi della matrice da testare sul sistema, è stata cambiata la soluzione di Krebs-Henseleit da ogni camera per 3 volte in modo da eliminare tutto l'NA e Ach e riportare la forza a zero mN.

Per valutare il potere vasodilatatorio di un composto si introduce nuovamente all'interno di ogni camera NA in quanto la vasodilatazione indotta da un composto viene espressa come percentuale di diminuzione della vasocostrizione indotta da NA.

E' stato introdotto, in ogni camera, 20 μ L di miele di *Arbutus unedo* L. precedentemente diluito in acqua ultra pura. Si è iniziata l'analisi a partire da 1 mg/kg.

3.3.3 Test in vitro su modelli biologici del potere protettivo del miele di corbezzolo.

In collaborazione con il gruppo della Dott.ssa L. Rosa del Dipartimento di Biologia Sperimentale, Sez. Patologia Sperimentale dell'Università degli Studi di Cagliari, sono stati effettuati esperimenti su modelli biologici, utilizzando come

indicatori i prodotti specifici del processo ossidativo, per poter comprendere meglio i possibili meccanismi d'azione che un composto antiossidante può esercitare. Per questo motivo è stato valutato l'effetto protettivo del miele di corbezzolo e dell'acido omogentisico sul colesterolo. E' stato inoltre valutato il potere protettivo dell'acido omogentisico sull'ossidazione delle LDL in presenza di Cu^{2+} .

3.3.3.1 Ossidazione del colesterolo.

Il saggio di ossidazione del colesterolo è stato condotto in "stato secco" [84, 85]. Brevemente, 0,5 mL (2586 nmol) di una soluzione di colesterolo (2 mg/mL in CH_3OH) sono stati essiccati sotto vuoto e poi incubati in un bagno a 140°C per 1 o 2 h (controlli ossidati) sotto l'esposizione di luce artificiale. I controlli (colesterolo non ossidato) sono stati tenuti a 0°C al buio. In un set diverso di esperimenti, diverse aliquote di miele di corbezzolo (25, 50, 100 μg in CH_3OH) o HGA (1-40 μM in CH_3OH) sono state aggiunte a 0,5 mL di soluzione di colesterolo (2 mg/mL in CH_3OH) essiccate sotto vuoto ed incubate in bagno a 140°C per 1 o 2 h. L'ossidazione è stata bloccata tramite raffreddamento ed aggiunta di 1 mL di CH_3OH .

Le analisi del colesterolo, 7-ketocholesterol (7-cheto) e 7β -idrossicolesterolo (7β -OH) sono state effettuate con un cromatografo liquido Agilent Technologies 1100. La separazione è stata effettuata con una colonna Chrompack Inertsil 5 ODS-3 (150 mm \times 3 mm) utilizzando CH_3OH come fase mobile ad un flusso di 0,4 mL/min. L'identificazione del colesterolo (203 nm), del 7β -OH (203 nm) e 7-cheto (245 nm) è stata effettuata mediante software A.10.02 Chemstation Agilent.

3.3.3.2 Preparazione e ossidazione delle LDL

La soluzione di LDL era costituita da 150 mM NaCl, pH 7,4 e 0,01% EDTA. Al fine di rimuovere l'EDTA prima dell'ossidazione, le LDL sono state dializzate con tampone fosfato salino (PBS, circa 800 mL), pH 7,4 a 4°C al buio utilizzando una membrana da dialisi (Spectra/Por Float-A-lyser) in estere di cellulosa rigenerata, con un range di esclusione molecolare da 10.000 dalton. La dialisi è stata

effettuata su un agitatore piatto in una camera fredda mantenuta a 4° C, e la soluzione di dialisi è stata cambiata circa ogni ora per almeno cinque volte. La frazione di LDL è stata rimossa e portata ad una concentrazione finale di 1 mg proteine/mL in PBS.

La quantità di LDL recuperate dopo la dialisi è stata valutata sulla base del contenuto proteico misurato secondo il metodo di Bradford [86] utilizzando sieroalbumina bovina come standard. Le LDL sono state conservate a 4° C sotto azoto al buio fino all'uso (entro 2 giorni). Aliquote di 125 µg di LDL sono state incubate in assenza ed in presenza di CuSO₄ 5 µM in 1 mL di PBS, utilizzando provette in vetro (125 × 20 mm), a 37° C in bagno per 2 h, esposti all'aria e luce artificiale [87]. I controlli sono stati tenuti a 0° C al buio. Le LDL sono state pre-trattate per 10 minuti a concentrazioni crescenti di HGA (10, 15, 20, 25 e 50 µM in etanolo) prima dell'esposizione al Cu²⁺.

Per il controllo sono stati aggiunti uguali volumi di etanolo e la concentrazione massima finale di CH₃CH₂OH è stata del 4% questo per non interferire nel processo di ossidazione. Sono state effettuate 5 serie di trattamenti: a) controllo LDL; b) controllo LDL in etanolo; c) LDL trattate con HGA (50 µM) per 2 h; d) LDL esposte a Cu²⁺ 5 µM per 2 h; e) LDL trattate per 10 min HGA (10-50 µM) e successivo trattamento Cu²⁺ per 2 h. L'ossidazione è stata arrestata per raffreddamento e si è proceduto quindi all'estrazione dei lipidi.

3.3.3.3 Estrazione dei lipidi ed analisi degli acidi grassi e del colesterolo.

I lipidi totali sono stati estratti dalle LDL in PBS utilizzando il metodo descritto da Folch *et al.* [88] con l'aggiunta di 12 mL di una soluzione di CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v). La separazione del colesterolo, degli acidi grassi liberi e dei loro prodotti ossidativi è stata ottenuta tramite saponificazione [87]: 7 mL della frazione CHCl₃ (contenenti i lipidi) di ciascun campione sono stati essiccati sotto vuoto e disciolti in 5 mL di etanolo a cui si sono aggiunti 100 µL di soluzione Desferal (25 mg/mL in H₂O), 1 mL di una soluzione acquosa di acido ascorbico (25% p/v) e 0,5 mL di KOH 10N . Le miscele sono state lasciate al buio a temperatura ambiente per 14 h. Sono stati aggiunti 10 mL di n-esano e 7 mL di

H₂O e centrifugati per 1 h. E' stata prelevata la fase in esano (frazione insaponificabile) contenente colesterolo, 7-cheto e 7 β -OH, e dopo evaporazione sotto vuoto del solvente, il residuo è stato disciolto in 300 μ L di CH₃OH e analizzati in HPLC.

Dopo l'aggiunta di ulteriori 10 mL di n-esano, i campioni sono stati acidificati con HCl 37% sino a pH 3-4 e quindi centrifugati per 1 h. La fase di esano (frazione saponificabile) con acidi grassi liberi ed idroperossidi (HP) è stata portata a secco sotto vuoto. Una parte del residuo secco è stato sciolto in 300 μ L di CH₃CN con 0,14% CH₃COOH (v/v) e analizzata in HPLC. Il recupero degli acidi grassi e del colesterolo durante la saponificazione è stato calcolato utilizzando una miscela standard di 1 mg di trioleina, trigliceridi e colesterolo disciolti in 5 mL di etanolo.

Le analisi degli acidi grassi insaturi, del colesterolo e dei loro prodotti ossidativi sono state effettuate con un sistema HPLC Agilent Technologies 1100. Colesterolo, 7 β -OH e 7-cheto, sono stati misurati come descritto per il saggio di colesterolo. La separazione cromatografica degli acidi grassi insaturi e HP, rilevati a 234 e 200 nm rispettivamente, è stata effettuata utilizzando una colonna Eclipse XDB-C18 (150 mm \times 4,6 mm, 3,5 μ m) dotata di precolonna (12,5 mm \times 4,6 mm, 5 μ m) Zorbax XDB-C18 Eclipse (Agilent Technologies), utilizzando una fase mobile di CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (75:25:0,12; v/v/v) ed un flusso di 2,3 mL/min. La temperatura della colonna è stata mantenuta a 37° C.

La vitamina E (α -tocoferolo) è stata misurata utilizzando un sistema HPLC munito di una pompa P1000 Thermo Separation Products (Milan, Italy) dotata di rilevatore elettrochimico INTRO (Antec Leyden, Leiden, Paesi Bassi) [87] ed iniettore automatico Triathlon (Spark Holland BV, AJ Emmen, Paesi Bassi). Per la separazione è stata utilizzata una colonna C-18 Hewlett Packard ODS Hypersil (100 \times 2,1 mm, 5 μ m) ed una fase mobile di CH₃OH/CH₃COONa 0,05 M pH 5,5 (95:5, v/v) con un flusso di 0,3 mL/min. Il detector è stato settato a 0,6 V e gli UV spettri sono stati elaborati con il software Agilent Chemstation A.10.02. I coefficienti di correlazione erano maggiori di 0,995.

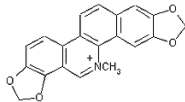
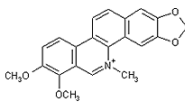
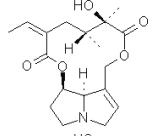
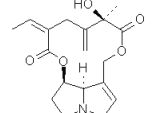
3.4 Aspetti tossicologici

3.4.1 Alcaloidi

Gli alcaloidi sono composti organici, generalmente solidi, bianchi, amari, fortemente basici che formano sali insolubili in acqua. La maggior parte degli alcaloidi sono sostanze cristalline ben definite che si uniscono agli acidi per formare sali.

Come descritto nella *sezione 2.4*, i principali alcaloidi tossici ritrovati nel miele appartengono alla classe degli alcaloidi 1,2-deidropirrolizidini (PAs) e benzofenentridinici (QBA). In **tabella 11** sono elencate le caratteristiche chimiche dei PAs e QBA presi in esame in questa tesi.

Tabella 11. Caratteristiche degli alcaloidi in esame

Nome	Classe	Formula bruta	Peso molecolare	Formula di struttura
Sanguinarina	QBA	$[C_{20}H_{14}NO_4]^+$	367,79	
Cheliritrina	QBA	$[C_{21}H_{18}NO_4]^+$	348,38	
Senecionina	PAs	$C_{18}H_{25}NO_5$	335,41	
Senecifillina	PAs	$C_{18}H_{23}NO_5$	333,39	

3.4.2 Preparazione del campione.

I campioni di miele (5 g) sono stati solubilizzati in 10 mL di una soluzione di HCl al 0,5 N con l'ausilio del bagnetto ad ultrasuoni. Per i campioni di corbezzolo sono stati utilizzati 2,5 g in 15 mL di HCl al 0,5 N.

3.4.3 Purificazione mediante SCX.

Per questa purificazione sono state utilizzate colonnine SCX (*Strong Cation Exchange*, Varian Bond Elut 500mg, 3mL) precedentemente attivate con una soluzione 80:20 (v/v) di CH_3OH/HCl 0,5 N (4 mL). Una volta immesso il campione,

la colonna è stata lavata con acqua ultra pura (4 mL). Il campione è stato eluito con 2 mL di una miscela 80:20 (v/v) di CH₃OH/NH₃ e 2 mL di acqua ultra pura, in un matraccio da 5 mL, portato a volume con acqua ultra pura. Per il recupero quantitativo di alcune molecole è stato necessario effettuare una precedente eluizione con una miscela 80:20 (v/v) di CH₃OH/HCl 0,5 N (4 mL) in un matraccio da 5 mL e portato a volume con la stessa miscela di eluizione. Le frazioni sono state analizzate mediante un sistema HPLC-DAD.

L'eluizione con 2 differenti miscele (acida e basica) ha permesso il recupero quantitativo di composti come il lumicrome che viene eluito esclusivamente con miscela acida e l'acido chinurenico e la caffeina che vengono eluiti con entrambe le miscele.

3.4.4 Composti azotati per HPLC-DAD.

I composti azotati del miele sono stati dosati utilizzando la stessa metodica HPLC-DAD descritta precedentemente (*vedi sezione 3.2.5*). Le soluzioni di standard sono state preparate in metanolo, mentre le soluzioni di lavoro in acqua ultrapura. La senecionina e la senecifillina sono stati dosati a 210 nm, l'acido chinurenico ed il lumicrome a 360 nm, la caffeina, la sanguinaria e la cheleritrina a 280 nm.

3.4.5 Validazione del metodo analitico.

L'adozione di un metodo non ufficiale impone di sviluppare i parametri di prestazione caratteristici del metodo e calcolarli mediante la validazione. In questo lavoro è stata messa a punto e validata, in accordo con la Decisione 2002/657/EC [89], una metodica analitica HPLC-DAD per la separazione e determinazione di molecole azotate.

Specificità. Per valutare la selettività del metodo per l'analisi dei campioni di miele è stato utilizzato un campione di miele di Acacia come bianco. Il miele è stato estratto con il metodo descritto nella sezione "Separazione con SPE" e analizzato in HPLC-DAD. I risultati mostrano che in esso non vi è nessuna interferenza sui tempi di ritenzione dei composti di interesse. La specificità del

metodo HPLC-DAD è stata monitorata con il tempo di ritenzione, lo spettro UV-Vis e la purezza dei picchi.

Linearità. La retta di calibrazione HPLC-DAD è stata costruita con il metodo dello standard esterno, correlando l'area dei picchi con la concentrazione. I valori di correlazione (r) erano compresi tra 0,9975 e 0,9999 in un intervallo compreso tra 2 e 40 mg/kg per il lumicrome, tra 5 e 20 mg/kg per la senecifillina, tra 0,2 e 5 per l'acido chinurenico e la caffeina e tra 0,5 e 5 mg/kg per tutti gli altri analiti. È stata calcolata la pendenza media, l'intercetta media e le corrispondenti deviazioni standard % (RDS %).

Accuratezza: prove di recupero. Sono state effettuate delle prove di recupero (a tre differenti concentrazioni) sia in solvente che in matrice con le quali si è misurata la percentuale di recupero in modo da valutare l'efficienza e la selettività del metodo. Ogni standard di alcaloide è stato aggiunto a diverse concentrazioni al campione di acacia (bianco). È stata effettuata la purificazione su SCX e la quantificazione in HPLC-DAD. La percentuale di recupero è stata calcolata confrontando le concentrazioni di recupero (in matrice) con quelle degli standard (in solvente).

Precisione. Sono state effettuate 5 iniezioni a tre diverse concentrazioni nello stesso giorno ed i valori della deviazione standard sono stati calcolati per determinare la precisione *intra-day*. Le stesse analisi sono state ripetute anche in giorni diversi per determinare la precisione *inter-day*.

Limiti di determinazione e quantificazione. Il limite di determinazione (LOD) è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere rilevata, ma non necessariamente determinata quantitativamente, nelle condizioni sperimentali del metodo. L'LOD è stato determinato diluendo concentrazioni note di standard, fino a quando le risposte medie erano circa 3,3 volte il livello di rumore.

Il limite di quantificazione (LOQ) è la più bassa concentrazione analitica che può essere determinata quantitativamente con accettabile precisione ed esattezza nelle condizioni sperimentali del metodo. L'LOQ è stato determinato diluendo concentrazioni note di standard, fino a quando le risposte medie sono state circa 10 volte il livello di rumore di fondo.

Questi parametri vengono calcolati nel seguente modo:

$LOD = 3,3 * \text{deviazione standard del Bco} / \text{pendenza}$

$LOQ = 10 * \text{deviazione standard del Bco} / \text{pendenza}$

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi generali

4.1.1 Analisi melissopalinologica.

Le caratteristiche melissopalinologiche hanno confermato l'origine botanica dei campioni analizzati.

Asfodelo. L'analisi dei pollini ha mostrato chiaramente che il miele di asfodelo è un tipico miele iporappresentato, cioè un miele con un tenore di pollini di *Asphodelus* molto basso, inferiore al 10%. Il numero di granuli pollinici in 10 g di miele (PK/10 g) è risultato piuttosto basso, al di sotto di 20.000 (classe I). L'analisi melissopalinologica ha individuato la presenza di 31 diversi tipi di polline tipici di questo miele [90]: *Asphodelus*, *Brassica f.* <20; *Capsella*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus incanus*, *Cistus salvifolius*, *Citrus*, *Cupressus*, *Cynoglossum*, *Echium*, *Erica arborea gr.*, *Eucalyptus*, *Galactites*, *Graminaceae* <37; *Hedysarum*, *Lavandula stoechas*, *Leopoldia*, *Ononis spinosa*, *Papaver*, *Pinus*, *Pistacia*, *Plantago*, *Prunus f.*, *Pyrus amygdaliformis*, *Quercus ilex gr.*, *Rhamnus f.*, *Rubus f.*, *Salix*, *Trifolium campestre*, *Trifolium incarnatum*, *Vicia*. Le percentuali di polline di Asfodelo nel sedimento erano nella maggior parte dei casi al di sotto del 3% (da 0.1 a 2,6%) e solo in alcuni campioni la percentuale era superiore al 3% (da 3,3 a 5,2%). Il polline di Asfodelo è altamente iporappresentato, confermando che l'approccio botanico per la classificazione di miele monoflorale talvolta è fuorviante. È interessante osservare che, in alcuni casi, quando la percentuale di polline di Asfodelo supera il 3%, il sedimento è stato caratterizzato dalla presenza di polline proveniente da altre piante di nettarifere (es. *Lavandula stoechas*).

Corbezzolo. Nei campioni di miele di corbezzolo sono stati identificati 65 elementi differenti (pollini e spore) tipici di questo miele [90]. La percentuale media di polline di *Arbutus* è stata $37,62 \pm 2,29$ e il polline più frequente è stato quello di *Eucalyptus*, un tipico polline contaminante, trovato in tutti i campioni in concentrazioni variabili dal 0,32 % al 62,41 %. Tra gli altri pollini, i più frequenti sono stati quelli di *Quercus*, *Hedera*, *Rubus*, *Citrus*, *Ononis*, *Pistacia*, *Rosmarinus*, *Echium*, *Cistus*, *Trifolium*, *Hedysarum* e *Lotus*.

Cardo. Nei campioni di miele di cardo dall'analisi melissopalino-logica sono stati identificati oltre 32 elementi differenti (pollini e spore) tipici di questo miele [90]. Le percentuali di polline di *G. tomentosa* sono state comprese tra il 5 e 25%. Tra gli altri pollini, i più frequenti sono stati quelli di *acacia*, *Borago*, *Brassica*, *Capsella*, *Cistus*, *Citrus*, *Echium*, *Eucalyptus*, *Hedysarum*, *Lotus*, *Matricaria*, *Olea/Phyllirea*, *Ononis*, *Papaver*, *Smyrnum*, *Trifolium* e *Vicia*.

4.1.2 Parametri tecnologici.

Per quanto riguarda il tenore di acqua i valori di tutti i campioni (**Tabella 12**) sono conformi ai limiti legali [15].

I valori di umidità del nettare, come ci aspettavamo, mostrano un tenore di acqua più elevato rispetto ai rispettivi mieli. Inoltre, il miele grezzo di cardo, raccolto prematuramente ha mostrato tenori di acqua superiori, e ciò a dimostrazione che il periodo di raccolta è molto importante per assicurare una buona conservabilità del miele.

Tabella 12 – Analisi dei parametri tecnologici: umidità e 5-idrossimetilfurfurale (HMF)

Tipologia		Miele		Nettare/Miele grezzo
		HMF* mg/kg	Umidità* %	Umidità %
Asfodelo	Max	37,1	18,5	56,3
	Min	0,5	15,2	46,4
	Media	15,8 ± 11,2	16,4 ± 0,9	50,8 ± 5,0
Corbezzolo	Max	25,9	19,4	74,6
	Min	7,8	14,3	86,2
	Media	18,5 ± 6,2	17,4 ± 1,2	84,6 ± 6,9
Cardo	Max	1,6	16,9	23,2
	Min	35,2	14,6	22,3
	Media	25,7 ± 13,0	15,5 ± 0,7	22,7 ± 0,6

* Conforme Decreto Legislativo 21/05/2004 [15].

Il contenuto di HMF (5-idrossimetilfurfurale) dei mieli analizzati (**Tabella 2**) rientravano ampiamente nel limite legale (40 mg/kg), e ciò sta ad indicare che la tecnologia di produzione dei mieli analizzati è risultata essere appropriata e che i

prodotti non hanno subito trattamenti che ne abbiano accelerato il processo di invecchiamento.

4.1.3 Coordinate cromatiche.

Indicazioni più interessanti sono state fornite dalla determinazione del colore attraverso il sistema di coordinate cromatiche CIE $L^*a^*b^*C^*h^*$ che permette di valutare i principali attributi del colore di una matrice.

I dati riportati in **Tabella 13**, relativi alle coordinate cromatiche, mostrano come il miele di asfodelo presenta valori di luminosità (L^*) particolarmente elevati, mentre i valori di a^* e b^* denotano un prodotto di colore giallo pallido.

Tabella 13. Coordinate Cromatiche CIE $L^*a^*b^*C^*h^*$

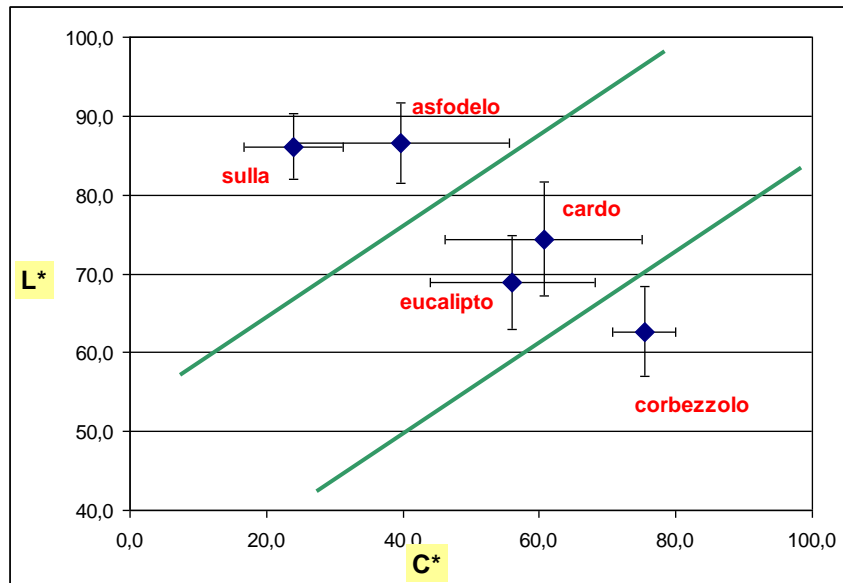
N° Campioni	Campione	COLORE									
		L^*	$\pm ds$	a^*	$\pm ds$	b^*	$\pm ds$	C^*	$\pm ds$	h^*	$\pm ds$
39	Asfodelo	86,5	4,9	-1,6	1,7	36,9	18,1	37,0	18,0	85,7	24,3
36	Corbezzolo	62,0	0,7	15,0	0,2	73,3	0,6	75,0	0,6	78,5	0,2
30	Cardo	74,4	7,2	4,4	7,3	60,2	13,7	60,7	14,4	86,9	5,2
22	Eucalipto	68,9	5,7	6,1	4,7	55,4	11,5	56,2	11,7	84,3	3,1
15	Sulla	86,1	4,2	-1,8	0,5	23,9	7,4	24,0	7,4	94,6	1,4

Il miele di corbezzolo presenta valori di luminosità (L^*) particolarmente bassi, ed i valori di a^* e b^* denotano un prodotto dal colore ambrato mentre il miele di cardo è risultato essere un miele chiaro e luminoso con un valore medio di L^* di 74,4. Per quanto riguarda la coordinata C^* i valori mostrano come questo tipo di miele abbia una tinta decisamente più diluita (bassi valori di C^*) rispetto ad altri mieli scuri analizzati.

I dati numerici forniti dalla metodica CIE $L^*a^*b^*C^*h^*$ sono in perfetto accordo con le percezioni visive riscontrate dal *panel test*.

Mettendo in relazione le coordinate L^* e C^* otteniamo la migliore differenziazione tra le tipologie di mieli uniflorali (**Figura 7**). In questo modo si possono discriminare a gruppi le tipologie di miele ed il miele di corbezzolo è il miele maggiormente differenziato dagli altri in quanto è un miele molto scuro.

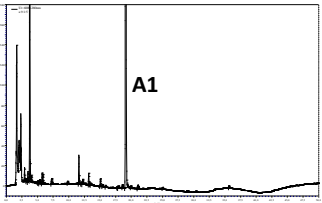
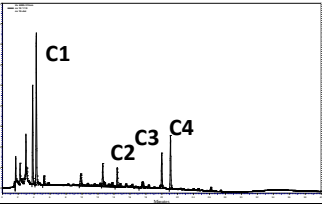
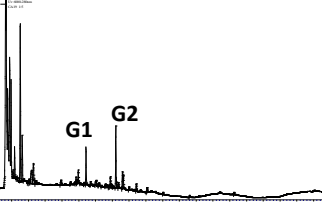
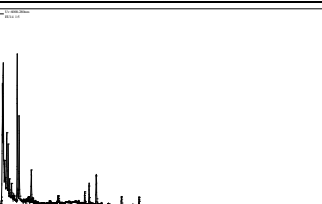
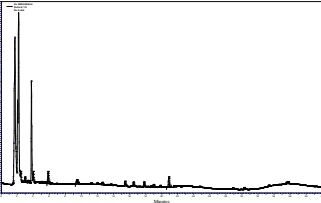
Figura 7 – Coordinate CIE L*C* di diverse tipologie di miele uniflorale.



4.2 Caratterizzazione

L'analisi HPLC-DAD ha permesso di effettuare un *fingerprinting* dei mieli dimostrandosi particolarmente efficace per discriminare i caratteristici mieli uniflorali sardi di asfodelo (*Asphodelus microcarpus* Salzm. e Viv.), corbezzolo (*Arbutus unedo* L.) e cardo (*Galactites tomentosa* Moench) da altri mieli come quelli di eucalipto e sulla (Tabella 14).

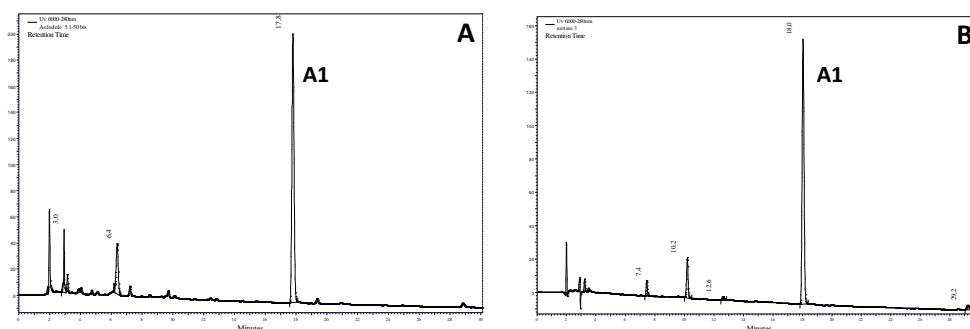
Tabella 14. *Fingerprinting* dei mieli sardi (280 nm)

<p>Asfodelo (<i>Asphodelus microcarpus</i> Salzm. e Viv.)</p>	
<p>Corbezzolo (<i>Arbutus unedo</i> L.)</p>	
<p>Cardo (<i>Galactites tomentosa</i> Moench)</p>	
<p>Eucalipto (<i>Eucalyptus</i> spp.)</p>	
<p>Sulla (<i>Hedysarum coronarium</i> L.)</p>	

4.2.1 Miele di Asfodelo

L'analisi HPLC-DAD del miele di asfodelo a 280nm ha evidenziato un composto con $t_R = 18,0$ (**A1**) assente in altri mieli uniflorali della Sardegna (*Arbutus unedo*, *Hedysarum coronarium*, *Eucalyptus* spp., *Galactites tomentosa*). È interessante osservare che le analisi HPLC-DAD ha evidenziato la presenza dello stesso composto nel nettare (**Figura 8**).

Figura 8. Cromatogramma del miele (A) e nettare di asfodelo (B) (280nm)



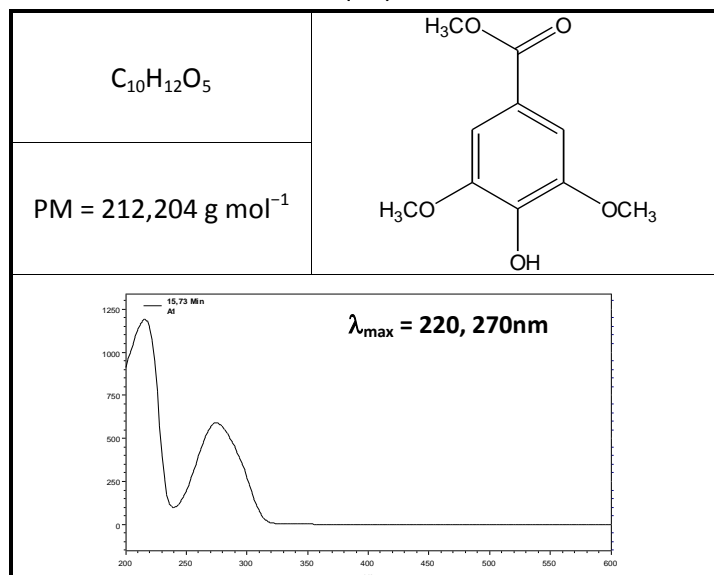
Lo spettro di ^1H NMR ha mostrato la presenza di due singoletti a δ 3,91 e δ 3,87 indicativi di gruppi metossilici. L'integrazione ha mostrato la presenza di sei protoni per il primo singoletto (due gruppi metossilici simmetrici) e tre protoni per il secondo singoletto. Nello stesso spettro, un singoletto a δ 7,30 ha rivelato la presenza di due protoni aromatici indicativi di due metini simmetrici. Un singoletto a δ 5,88 è stato assegnato a un idrossile fenolico. Il composto puro, ottenuto attraverso separazione su TLC, è stato analizzato con HPLC-MS/MS. Il sistema è stato ottimizzato per lavorare in modalità negativa ed ha fornito un picco corrispondente allo ione precursore di m/z 211,0. Le transizioni MS/MS osservate (**Tabella 15**) per lo ione precursore 211,0 (m/z) (195,8 e 180,1) corrispondono alla perdita di un metile (OH) e di un gruppo di metossile (OCH_3) rispettivamente.

Tabella 15. Transizioni MS/MS del composto **A1**

	t_R (min)	Transizioni MS/MS (m/z)
Asfodelo (A1)	18,0	211,0 \rightarrow 195,8 (CE +20 eV) 211,0 \rightarrow 180,1 (CE +30 eV)

Il composto **A1** isolato su TLC è stato caratterizzato come 3,5-dimetossi-4-idrossibenzoato di metile (metil siringato, MYRS, $C_{10}H_{12}O_5$) (**Tabella 16**).

Tabella 16. Formula, peso molecolare (PM) e spettro UV-Vis del Metil siringato (MYRS) (**A1**)



La conferma è stata ottenuta effettuando le stesse analisi con lo standard puro di metil siringato.

I livelli di metil siringato nei miele di asfodelo, misurati attraverso l'analisi HPLC-DAD, variavano da 405,5 a 133,5 mg/kg (**Tabella 17**). Nei campioni di nettare i livelli di MSYR andavano da 127,7 a 203,6 mg/kg.

Tabella 17. Analisi quantitativa (mg/kg) del MYRS nel miele e nettare di asfodelo

Metil siringato	Miele (n=39)	Nettare (n=3)
Max	405,5	203,6
Min	133,5	127,7
Media	224,0 ± 61,35	104,5 ± 86,7

Considerando che l'umidità del nettare e del miele di asfodelo sono mediamente 50,8 e il 16,4% e che il metil siringato presente nel nettare e miele arriva a 203,6 e 405,5 mg/kg, il miele di asfodelo contiene in media circa l'80% dell'originale metil siringato del nettare.

Su 9 campioni (6 prodotti nel 2006 e 3 nel 2007) sono stati analizzati i livelli di metil siringato dopo un anno dal campionamento. Come si può notare dalla **tabella 18** [78] i valori non presentavano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

Tabella 18. Analisi quantitativa (mg/kg) del MYRS nel miele di asfodelo dopo 1 anno

	Metil siringato			Metil siringato		
	$t = 0$			$t = 12 \text{ mesi}$		
	Max	Min	Media	Max	Min	Media
n=6 (2007)	287,7	186,6	237,0±44,3	280,2	169,4	224,0±45,9
n=3 (2008)	288,4	185,6	220,7±58,6	279,7	176,1	212,7±58,1

Metil siringato (MSYR). L'acido siringico è un comune costituente delle piante [91], ma l'estere metilico corrispondente è raro. Il metil siringato è stato ritrovato nella vite [92], nelle foglie di *Cestrum parqui* [93] e nelle radici di *Taraxacum formosanum* [94]. È stato ritrovato anche nei mieli uniflorali di acacia, rapa, castagno, trifoglio, fiori di tiglio, denti di leone, girasole e abete [95]. I livelli di MSYR variavano da 0,093 (miele di colza) a 5,044 mg/kg. Il metil siringato è stato trovato anche nel miele di timo [96]. La presenza di metil siringato nel miele manuka (*Leptospermum scoparium*) è stata descritta in diversi lavori [33, 97-99], e Weston et al [97] ne riportano la percentuale come il 70% p/p della frazione fenolica, con un valore medio di 0,6 mg/kg.

È interessante notare che il MSYR è stato rilevato in mieli ottenuti da piante appartenenti a diverse famiglie botaniche, ma solo nel miele di Asfodelo raggiunge il livello più alto. Inoltre, in letteratura, il MSYR viene determinato tramite analisi GC previa metilazione e in questo modo non è facile distinguere tra l'estere metilico e l'acido libero [91, 96]. D'Arcy et al. [100] attraverso analisi GC e GC-MS (senza derivatizzazione) di mieli di *Eucaliptus leucoxylon* e *Eucaliptus mellidora* trovarono un livello medio di metil siringato pari a 0,8 mg/kg. Inoltre, l'acido siringico è stato trovato nei mieli di *Leptospermum poligalifolium* [101], *Malaleuca quinquenervia*, *Guioa semiglauca*, *Lephostemon conferta* [102], *Castanea sativa* Miller, *Robinia pseudoacacia* L., *Lavandula* sp., *Brassica napus* L., *Helianthus annuus* L., *Eucaliptus* sp. e *Tilia* sp. e anche in mieli di erica [103],

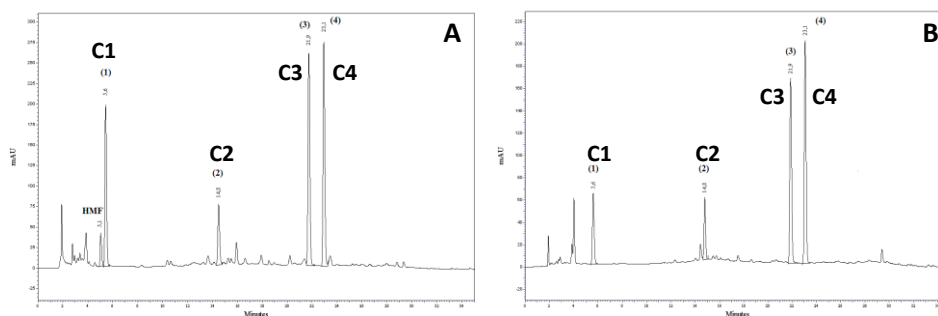
trifoglio e grano saraceno [104]. Questi dati dimostrano che in un gran numero di mieli uniflorali si riscontrano livelli di metil siringato al di sotto di 5 mg/kg.

I livelli medi di MSYR nel miele di asfodelo sono di circa 224,0 mg/kg ed è per questa ragione che questo composto può essere utilizzato come marcatore dell'origine botanica di questo miele [78]. Nonostante il fatto che MSYR sia stato trovato in diversi mieli, non si è a conoscenza di nessuna pubblicazione sulla sua origine botanica. Russell *et al.* [98] hanno suggerito che il MSYR sia un componente comune della lignina e che potrebbe originarsi dalla linfa della pianta piuttosto che dal nettare. Inoltre, la pianta di Manuka è spesso infestata da *Eriococcus orariensis* (insetti produttori di melata) e da *Capnodium walteri* Sacc. (*sooty mold fungus*) e probabilmente il metil siringato potrebbe essere raccolto come melata. Inoltre, particolari funghi sono in grado di degradare la lignina, utilizzando enzimi ligninolitici come la laccasi [105]. La laccasi è un enzima largamente diffuso nelle piante superiori, funghi, alcuni insetti e battei. La rottura della barriera di lignina è un processo enzimatico mediato da piccole molecole, e il metil siringato costituisce un substrato tipico della laccasi [106]. D'altro canto, è noto che i derivati dell'acido benzoico possono essere prodotti attraverso la via dell'acido scichimico [91], ed il MYSR [93, 94] e la sua forma glucosilata [107] sono stati trovati in estratti di diverse piante.

4.2.2 Miele di Corbezzolo

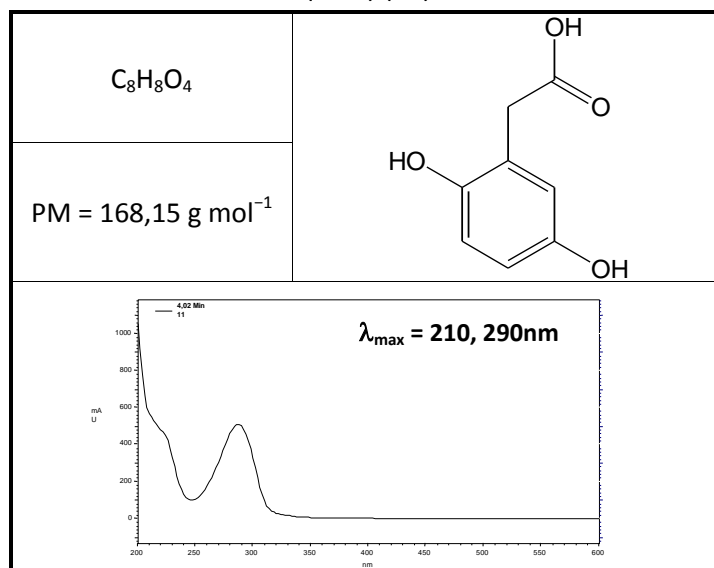
Le analisi HPLC-DAD sul miele di corbezzolo mostrano quattro principali composti con tempo di ritenzione (t_R) di 5,6 (**C1**), 14,8 (**C2**), 21,9 (**C3**) e 23,1 (**C4**) min (**Figura 9A**). È interessante osservare che le analisi HPLC-DAD del nettare hanno evidenziato gli stessi composti (**Figura 9B**).

Figura 9. Cromatogramma a 280nm miele (A) e nettare di corbezzolo (B)



Il primo picco con $t_R = 5,6$ min (**C1**) è risultato essere l'acido omogentisico (acido 2,5-diidrossifenil acetico, HGA, $C_8H_8O_4$), il *marker* classico del miele di corbezzolo [25] (**Tabella 19**).

Tabella 19. Formula, peso molecolare (PM) e spettro UV-Vis dell'acido omogentisico (HGA) (**C1**)



Il picco a $t_R = 14,8$ min (**C2**), purificato mediante TLC, è stato analizzato tramite NMR, HPLC-MS/MS e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HR-MS Q-TOF). L'analisi HPLC-MS/MS per il composto **C2** è stata ottimizzata in modalità positiva dando come risultato lo ione precursore $[M+H]^+$ a m/z 241,1. Le

transizioni MS/MS osservate per lo ione precursore di m/z 241,1, usando Argon come gas di collisione, sono riportate in **tabella 20**.

Tabella 20. Transizioni MS/MS del composto **C2** del miele di corbezzolo

	t_R (min)	Transizioni MS/MS (m/z)
Corbezzolo (C2)	14,8	241,1 → 109,0 (CE -14 eV)
		241,1 → 137,0 (CE -10 eV)
		241,1 → 153,0 (CE -10 eV)
		241,1 → 111,0 (CE -16 eV)

Il composto **C2** è stato purificato mediante TLC preparativa ottenendo un prodotto semisolido incolore. La rotazione ottica, misurata in MeOH a 25°C utilizzando un polarimetro Perkin-Elmer 241, risulta essere di $[\alpha]_D^{25} + 20,0$ e lo spettro UV-Vis misurato in CH₃OH è caratterizzato da un massimo di assorbanza a $\lambda_{max} = 245$ nm.

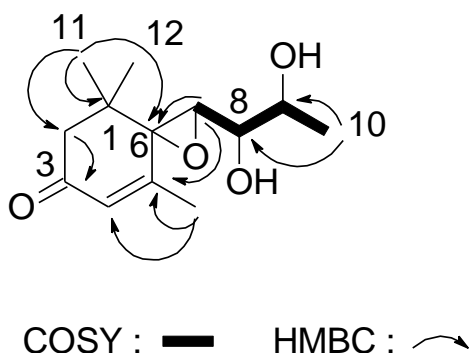
L'analisi Q-TOF ha confermato la massa esatta del composto **C2** con un valore di $[M+H]^+$ m/z 241,1437, corrispondente alla formula C₁₃H₂₁O₄ (calcolato: 241,2876). Le analisi NMR hanno evidenziato 13 segnali di carbonio dallo spettro ¹³C NMR del composto **2** (**Tabella 21**), di cui quattro CH₃, un CH₂, quattro CH, e 4 carboni quaternari, corrispondente alla formula molecolare di C₁₃H₂₀O₄ confermata mediante l'analisi HR-MS (Q-TOF). Lo studio dello spettro ¹H NMR attraverso esperimenti (HSQC, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C HMBC e ROESY) ha permesso di assegnare i protoni attaccati ad ogni atomo di carbonio.

Tabella 21. Dati dello spettro ^1H e ^{13}C NMR del composto **C2** in CDCl_3 (δ ppm; J , Hz)

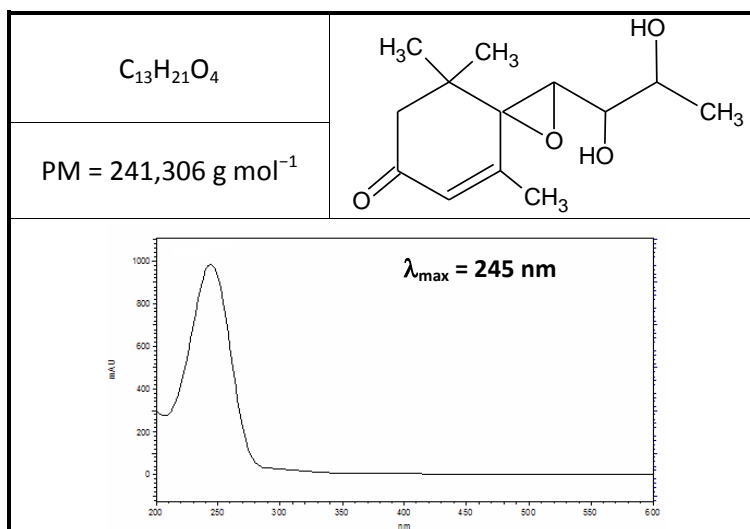
Posizione	C2	
	δ_{C}	δ_{H}
1	37,1 s	
2	51,2 t	2,38, dd (17,1, 1,2) H-2 α 2,50, br d (17,1) H-2 β
3	197,0 s	
4	129,6 d	6,03, d (1,2)
5	161,2 s	
6	68,7 s	
7	66,0 d	3,10, d (8,7)
8	72,1 d	4,01 dd (8,7, 3,9)
9	69,2 d	3,84, m
10	19,7 q	1,25, d (6,6)
11	25,7 q	1,22, s
12	26,9 q	1,01, s
13	19,7 q	1,78, d (1,2)

In tale modo è stato possibile risalire alla struttura del composto **C2** (**Figura 10**). La configurazione assoluta o relativa della molecola non può essere determinata a causa della difficoltà di ottenere un derivato cristallino utilizzabile per la determinazione della struttura ai raggi X.

Figura 10. Principali segnali ^1H - ^1H -COSY e ^1H - ^{13}C HMBC del composto **C2**



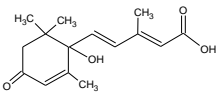
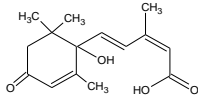
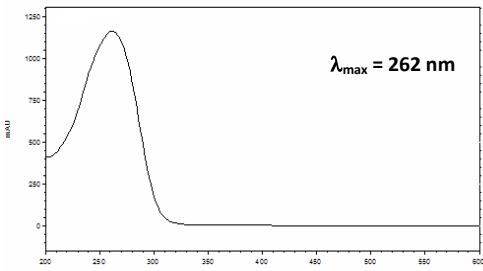
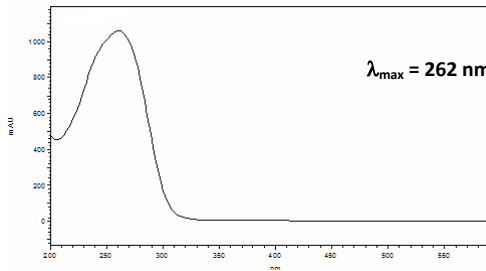
Il composto **C2** è stato identificato come 2-(1,2-diidrossi propil)-4,8,8-trimetil-1-ossaspiro[2.5]oct-4-en-6-one, e gli è stato dato il nome comune di unedone (**Tabella 22**).

Tabella 22. Formula, peso molecolare (PM) e spettro UV-Vis dell'Unedone (**C2**)

Le transizioni MS/MS principali dell'Unedone (**Tabella 20**) osservate per lo ione precursore $[M+H]^+$ a m/z 241,1 corrispondono alla perdita: della catena laterale ($C_4H_7O_2$) per il frammento 153,0, della catena laterale compreso l'ossigeno epossidico ($C_4H_7O_3$) per il frammento 137,0 e della catena laterale compreso l'ossigeno epossidico ($C_4H_7O_3$) e due metili (CH_3) per il frammento 111,0.

I composti **C3** e **C4** hanno mostrato spettro UV-Vis sovrapponibile con un massimo di assorbimento a $\lambda_{max} = 262$ nm. Anche l'analisi HPLC-MS/MS ha fornito lo stesso valore di 264,0 m/z . In virtù di questi risultati, si è supposto che i due composti potessero essere isomeri. L'analisi NMR dei composti purificati tramite HPLC preparativa ha dimostrato che i composti erano due isomeri dell'acido abscissico (ABA): acido (\pm)2-*trans*,4-*trans* abscissico (**C3**) ed acido (\pm) 2-*cis*,4-*trans* abscissico (**C4**) (**Tabella 23**).

Tabella 23. Formula, peso molecolare (PM), e spettro UV-Vis degli ABA (**C3** e **C4**)

2-trans,4-trans ABA (C3)		2-cis,4-trans ABA (C4)	
$C_{15}H_{20}O_4$		$C_{15}H_{20}O_4$	
PM = 264,3162 g mol ⁻¹		PM = 264,3162 g mol ⁻¹	
	$\lambda_{max} = 262 \text{ nm}$		$\lambda_{max} = 262 \text{ nm}$

Le analisi HPLC MS/MS, effettuate ottimizzando il sistema in modalità negativa, hanno dato come risultato lo ione precursore $[M-H]^-$ m/z 263,3. Le transizioni MS/MS (**Tabella 24**) osservate per lo ione precursore 263,3 (m/z) (203,0 e 218,8 per entrambi gli isomeri e 152,8 per il *c,t*-ABA) corrispondono alla perdita di un gruppo acetato $[CH_2COOH]^+$ per il frammento 203,0, e di un gruppo formiato $[COOH]^+$ per il frammento 218,8 e la catena laterale $[C_6H_8O_2]^+$ per il frammento 152,8. Quindi oltre che dal tempo di ritenzione, i due isomeri possono essere differenziati dal fatto che solo il *c,t*-ABA perde l'intera catena laterale. La conferma è stata ottenuta effettuando le stesse analisi degli standard puri di *t,t*-ABA (**C3**) e *c,t*-ABA (**C4**).

Tabella 24. Transizioni MS/MS di composti incogniti (**C3** e **C4**) del miele di corbezzolo

	t_R (min)	Transizioni MS/MS (m/z)
Corbezzolo (C3)	21,9	263,3 → 203,0 (CE +28 eV) 263,3 → 218,8 (CE +18 eV)
Corbezzolo (C4)	23,1	263,3 → 152,8 (CE +16 eV) 263,3 → 203,0 (CE +28 eV) 263,3 → 218,8 (CE +18 eV)

L'analisi quantitativa HPLC-DAD effettuata sul nettare ha mostrato elevati tenori di acido omogentisico (**C1**) ($120,5 \pm 23,0$ mg/kg), seguiti da *c,t*-ABA (**C4**)

(78,0 ± 33,6 mg/kg), *t,t*-ABA (**C3**) (63,2 ± 26,6 mg/kg) e unedone (15,7 ± 2,5 mg/kg) (**C2**) (Tabella 25).

Tabella 25. Analisi quantitativa (mg/kg) dei marcatori del miele e nettare di corbezzolo

		HGA (C1)	Unedone (C2)	<i>t,t</i>-ABA (C3)	<i>c,t</i>-ABA (C4)
Miele (n=36)	Max	590,3	75,6	218,4	227,4
	Min	256,9	19,2	123,8	114,3
	Media	410,0 ± 78,2	44,6 ± 29,5	164,4 ± 24,5	179,0 ± 29,7
Nettare (n=4)	Max	142,9	18,9	89,3	108,6
	Min	92,6	12,9	40,1	47,9
	Media	120,5 ± 23,0	15,7 ± 2,5	63,2 ± 26,6	78,0 ± 33,6

Nel miele sono stati riscontrati valori decisamente più elevati di acido omogentisico (**C1**) (410,0 ± 78,2 mg/kg), *c,t*-ABA (**C4**) (179,0 ± 29,7 mg/kg), *t,t*-ABA (**C3**) (164,4 ± 24,5 mg/kg) e unedone (**C2**) (44,6 ± 29,5 mg/kg). I tenori di acido omogentisico confermano i dati di letteratura [25]. Il quantitativo totale di acidi abscissici nel miele è compreso tra 238,1 e 445,8 mg/kg, con un valore medio di 343,4 mg/kg.

Acido omogentisico (HGA), acidi abscissici (ABA) ed Unedone. L'acido omogentisico (HGA), metabolita della fenilalanina e tirosina, è un composto aromatico strutturalmente correlato alle catecolammine e altri precursori delle melanine, in un'ampia varietà di organismi superiori, compresi i mammiferi, uccelli, pesci, anfibi e piante. Nell'uomo, è totalmente degradato in maleilacetoacetato da un enzima chiamato omogentisato 1, 2-diossigenasi [108] e successivamente in acetacetato e fumarato. Il deficit di questo enzima, causato da una mutazione, è associato ad una patologia detta alcaptonuria che si manifesta sia con l'escrezione di grandi quantità di HGA nelle urine sia con la deposizione di questo composto in diversi tessuti [109, 110]. La presenza di benzoquinoni nelle urine, formati dall'ossidazione dell'HGA, comportano un cambiamento di colore sia nelle urine che nei tessuti. Grazie al suo anello aromatico, l'HGA è coinvolto nei bilanciamenti redox. L'HGA induce effetti mutageni e citotossici che sembrano verificarsi tramite un meccanismo

ossidativo basato sulla capacità di questo composto di sottoporsi ad autossidazione, portando alla formazione di chinoni e produzione di radicali e provocando artrite alkaptonurica [111-113]. Nelle piante superiori, come le radici di mais, l'HGA è coinvolto nella via biosintetica dei plastoquinoni e tocoferoli [114]. Inoltre l'HGA (410,0 mg/kg) già da tempo è stato considerato *marker* utile per la definizione dell'origine botanica del miele di Corbezzolo [25].

L'acido abscissico (ABA) fa parte della classe dei norisoprenoidi derivati del cicloesene a 13 atomi di carbonio e formati dalla degradazione dei carotenoidi. Gli acidi abscissici sono fitormoni delle piante superiori: inibiscono la crescita, promuovono lo stato dormiente del seme, controllano la chiusura degli stomi e aiutano le piante a superare le condizioni di stress [115]. La presenza di ABA nei mieli è nota poiché è stato ritrovato in diversi mieli uniflorali. Entrambi gli isomeri sono stati individuati nei mieli di *Eucalyptus* spp. [101, 102, 116], salice (*Salix*) [33, 96], erica (*Erica* spp.) [117], acacia (*Robinia pseudoacacia*) [118] e *Brassica* spp. [119]. In questi mieli, il *t,t*-ABA (**3**) è compreso tra 0,182 a 310 mg/kg, mentre il *c,t*-ABA (**4**) tra 0,56 e 106 mg/kg. Il solo isomero *c,t*-ABA (**4**) è stato trovato nei mieli di erica (*Calluna vulgaris*) [33], timo (*Thymus* spp.) [96], tiglio (*Tilia europea*) [119], grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*), trifoglio (*Melilotus* spp.), soia (*Glycine max*), tupelo (*Nyssa aquatica*), camenerio (*Epilobium angustifolium*) e acacia (*Robinia pseudoacacia*) [7, 104]. In questi mieli, l'isomero *c,t*-ABA (**4**) è compreso fra 2,31 e 12 mg/kg, rispettivamente nei mieli di trifoglio e tupelo. L'isomero *t,t*-ABA (**3**) non è mai stato trovato da solo nei mieli. I dati disponibili nella letteratura scientifica evidenziano che la più alta concentrazione di acidi abscissici finora riscontrata è di 328,7 mg/kg nel miele di manuka [101], mentre tutti gli altri mieli presentano valori intorno ai 148 mg/kg, che sono circa la metà di quello trovato nel miele di corbezzolo. Il miele di corbezzolo è caratterizzato dalla presenza dell'isomero *c,t*-ABA (**4**), $179,0 \pm 29,7$ mg/kg. In letteratura è riportato per il miele di salice una concentrazione di *c,t*-ABA di 106 mg/kg [96]. È interessante osservare che il rapporto *c,t*-ABA:*t,t*-ABA nel miele di corbezzolo oscilla tra 1,0 e 1,2. Il rapporto ABA di circa 1:1 non è comune e solo i mieli di erica e colza mostrano un simile rapporto [119], ma questi hanno tenori di acidi abscissici minori di 11 mg/kg. In altri mieli, gli isomeri

ABA hanno rapporti che vanno da 0,1 per manuka [101] e girasole [102] a 7,9 per l'acacia [119].

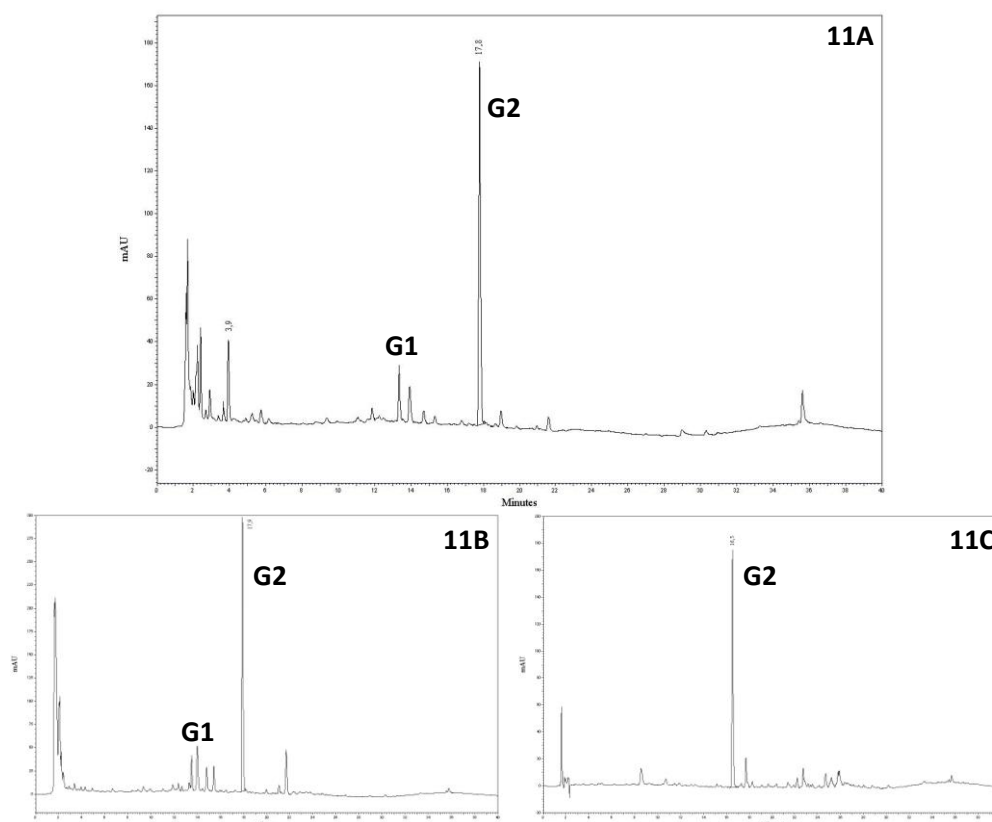
L'unedone è un derivato epossidico dell'acido abscissico e risulta essere una nuova molecola naturale. Tale composto non è mai stato trovato in altri mieli e ciò potrebbe farlo utilizzare come *marker* del miele di corbezzolo. Sarà necessario proseguire con ulteriori studi per verificare il meccanismo di formazione dell'unedone dall' ABA.

L'alto tenore degli isomeri dell'ABA, (che fra di loro sono presenti sempre in rapporto di circa 1:1), in concomitanza con la presenza di acido omogentisico e di unedone consente di proporre questo *pool* di molecole come *markers* specifici per l'origine botanica del miele di corbezzolo [79].

4.2.3 Miele di Cardo.

Le analisi HPLC-DAD del miele di cardo evidenziano la presenza costante di due principali composti con tempo di ritenzione (t_R) di 14,4 (**G1**) e 18,0 (**G2**) min (**Figura 11A**). I campioni di miele grezzo ottenuti in condizioni controllate hanno mostrato la presenza dei composti **G1** e **G2** (**Figura 11B**). La molecola **G2** è stata individuata anche negli estratti acquosi dei fiori di *G. tomentosa* (**Figura 11C**).

Figura 11. Cromatogramma a $\lambda=280\text{nm}$ del miele (**A**), miele grezzo (**B**) e fiori (**C**) di cardo.

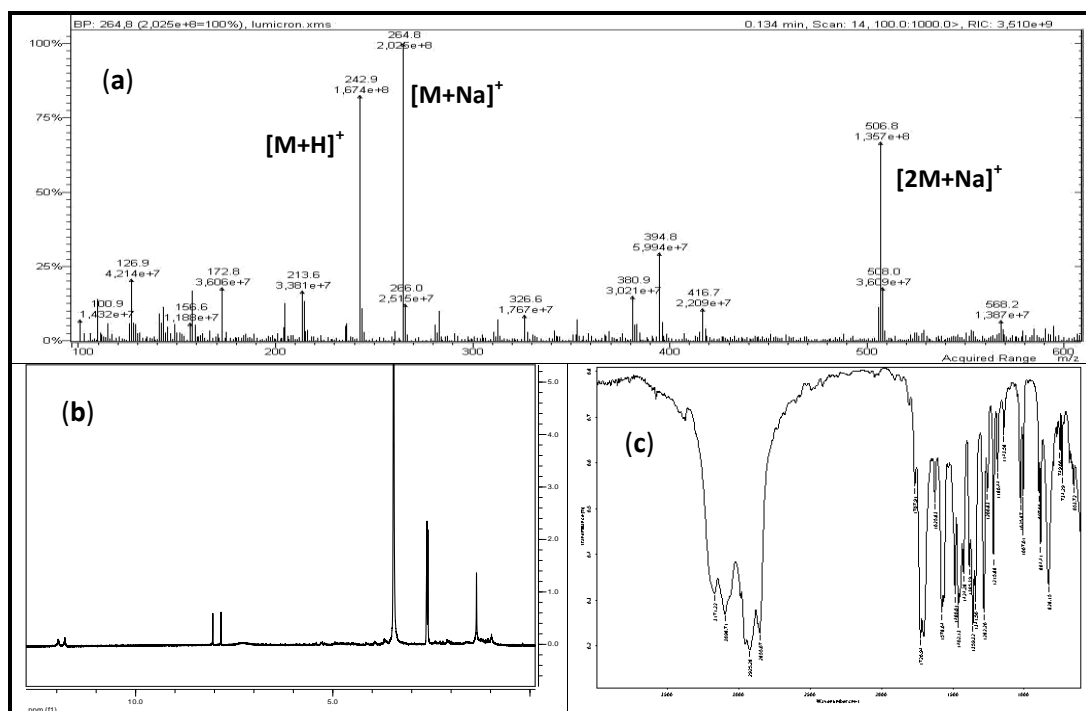


Il primo picco con $t_R = 14,4$ min è risultato essere l'acido fenilattico (**G1**) (**Tabella 28**) composto presente anche in altri mieli [33, 103]. La conferma della struttura è stata ottenuta per confronto con uno standard di acido fenil lattico per co-cromatografia.

Il picco a $t_R = 18,0$ min (**G2**), caratterizzato da $\max \lambda = 210, 260, 350$ e 400 nm (**Tabella 28**), non risultava essere noto. Tale composto, purificato su SPE, è un prodotto di colore giallo brillante con scarsa solubilità nella maggior parte dei solventi, ed è stato analizzato tramite NMR, IR, HPLC-MS/MS e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HR-MS Q-TOF).

L'analisi HPLC-MS/MS (**Tabella 26a**) per il composto **G2** è stata ottimizzata in modalità positiva dando come risultato lo ione precursore $[M+H]^+$ a m/z 242,9 e due addotti ($[M+Na]^+ = 264,8$ e $[2M+Na]^+ = 506,8$) che indicano che il peso molecolare del composto **G2** è 242,0.

Tabella 26. Spettro MS (a), 1H NMR (b) e IR (c) del composto **G2**



Le transizioni MS/MS osservate per lo ione precursore di m/z 243,0, usando argon come gas di collisione, sono quelle riportate in **Tabella 27**.

Tabella 27. Transizioni MS/MS del composto **G2**

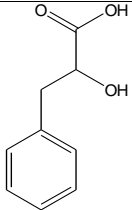
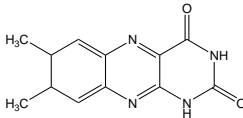
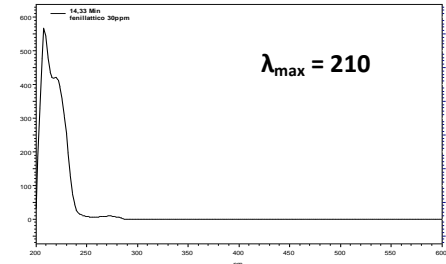
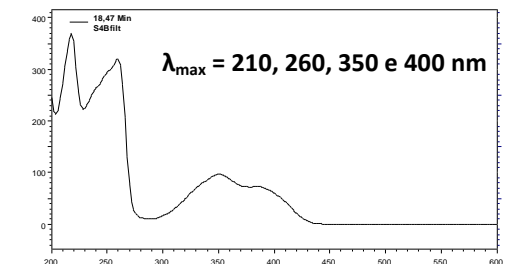
	t_R (min)	Transizioni MS/MS (m/z)
Cardo (G2)	18,0	243,0 \rightarrow 197,9 (CE -34 V)
		243,0 \rightarrow 171,8 (CE -44 V)
		243,0 \rightarrow 144,9 (CE -26 V)
		243,0 \rightarrow 241,7 (CE -44 V)
		243,0 \rightarrow 199,6 (CE -30 V)

L'analisi HR-MS (Q-TOF) ha confermato la massa esatta del composto **G2** con un valore di $[M+H]^+$ m/z 243,0874 corrispondente alla formula $C_{12}H_{10}N_4O_2$

(valore calcolato 243,0882). Lo spettro ^1H NMR del composto **G2** (Tabella 26b) ha mostrato due metili singoletti a 2,50 e 2,52 ppm, due protoni aromatici a 7,74 e 7,95 ppm e due segnali di protone *downfield* a 11,69 e 11,87 ppm. I segnali di δ a 11,69 e 11,87 sono stati assegnati facilmente ai protoni immidici con una banda di assorbimento a 3582 cm^{-1} rilevabile nello spettro IR. Inoltre lo spettro IR ha mostrato la presenza anche di un gruppo carbonilico al 1728 cm^{-1} (Tabella 26c).

Lo spettro di ^{13}C NMR ha rivelato la presenza di due carbonili (125,9 and 128,8 ppm), due metili (19,7 e 20,3 ppm) e otto carboni quaternari (160,7; 150,1; 146,6; 144,7; 141,7; 138,9; 138,4; 130,7 ppm). Un'analisi dettagliata degli esperimenti NMR di 1D e 2D (DQF-COSY, HSQC, HMBC) ha consentito di identificare il composto **G2** come 7,8-dimethylalloxazine, conosciuta anche come lumicrome (Tabella 28).

Tabella 28. Formula, peso molecolare (PM) e spettro UV-Vis dell'acido fenilattico e del lumicrome (**G1** e **G2**)

Acido fenilattico (G1)		Lumicrome (G2)	
$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$		$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$	
PM = $166,1766\text{ g mol}^{-1}$		PM = $243,0882\text{ g mol}^{-1}$	
			

I dati degli spettri del composto **G2** sono in accordo con quelli riportati in letteratura [120, 121]. Il confronto diretto con i dati ottenuti dallo standard commerciale di lumicrome ha dato conferma della struttura del composto **G2**.

La transizione m/z 198,0 osservata nell'analisi HPLC-MS/MS corrisponde al frammento $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}$ dovuto alla perdita di HNCO come suggerito da Phillips *et al.*, [122]. La formazione della transizione m/z 198 si verifica sia in ESI^+ che in ESI^-

[123] con la differente perdita di HCONH_2 dallo ione $[\text{M}+\text{H}]^+$ e di HNCO dallo ione $[\text{M}-\text{H}]^-$.

I campioni di miele di cardo sono stati analizzati in HPLC-DAD per valutare il tenore di acido fenilattico (**G1**) e lumicrome (**G2**); i dati sono riportati in **Tabella 29**.

Tabella 29. Analisi quantitativa (mg/kg) dei marcatori del campioni di cardo

		Acido fenil lattico (G1)	Lumicrome (G2)
Miele (n=30)	Max	692,2	72,1
	Min	121,7	12,3
	Media	406,4±133,2	27,5±9,3
Miele di Sicilia (n=1)	-	528,6	20,8
Miele grezzo (n=2)	09/05/2010	191,3	10,1
	25/05/2010	269,6	22,8

Entrambi **G1** e **G2** sono presenti nel miele prodotto in Sicilia (**Tabella 29**) indicando come essi siano dei marcatori del miele di cardo, a prescindere dalla zona di produzione.

Il tenore medio di questi composti è risultato $406,4 \pm 133,2$ mg/kg per l'acido fenilattico e $27,5 \pm 9,3$ mg/kg per il lumicrome. È stata trovata una correlazione statisticamente significativa ($R^2=0,7845$) tra i rapporti mutui delle concentrazioni dei composti **G1** e **G2**; ciò sta ad indicare che, presumibilmente, i due composti sono entrambi presenti nella flora che origina i mieli.

I campioni di miele grezzo prodotti in condizioni controllate hanno mostrato la presenza degli stessi composti; le loro concentrazioni sono minore a causa dell'alto contenuto di acqua del miele grezzo (vedi **Tabella 2**). Poiché la molecola **G2** è presente anche negli estratti acquosi dei fiori di cardo (vedi **Figura 11C**), ciò fornisce la prova decisiva della presenza di tale molecola nella *G. tomentosa*.

Acido fenil lattico e lumicrome. L'acido fenil lattico è un composto che si ritrova comunemente nel miele. Si trova in alta concentrazione nei miele uniflorali di *heather* (*Erica* o *Calluna* 828,3 mg/kg), *ling heather* (*Erica* o *Calluna* 875,4 mg/kg)

[103] e di manuka (*Leptospermum scoparium* 234,0 mg/kg) [33]. Quantitativi minori si trovano nel miele di limone (*Citrus limon* Burm 26,4 mg/kg), castagno (*Castanea sativa* Miller 47,9 mg/kg), di *Echium plantagineum* (46,7 mg/kg) [103] e nel miele di trifoglio (*Trifolium repens* 19,0 mg/kg) [33]. Inoltre questo acido è stato ritrovato nei mieli di acacia (*Robinia pseudoacacia* L.), bell heather (*Erika o Calluna*), fior di sulla, lavanda (*Lavandula* sp.), rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.), arancio (*Citrus aurantium* L.), semi di colza (*Brassica napus* L.), girasole (*Helianthus annuus* L.) ed eucalipto (*Eucalyptus* sp.) con una concentrazione non superiore a 10,5 mg/kg [33, 103].

Inoltre, durante l'analisi sensoriale (Panel Test) è stato osservato che l'odore ed il sapore di dell'acido fenil lattico sono fortemente correlati con le note sensoriali tipiche di questo miele [24, 90].

Il lumicrome (*7,8-dimethylalloxazin*) è un prodotto di decomposizione della riboflavina che si forma in presenza di luce in ambiente neutro o acido [124].

Fisiologicamente l'equilibrio riboflavina-lumicrome è controllato da diversi meccanismi, come per esempio l'attività della dodecina [125]. Come la riboflavina, il lumicrome agisce da fotosensibilizzatore generando ossigeno singoletto in presenza di luce in alimenti acquosi come il latte di soia [126]. La capacità del lumicrome di produrre ossigeno singoletto in acqua è stata esaminata sotto i raggi UVA [127].

Batteri, piante ed alghe secernono comunemente riboflavina o lumicrome. Diversi studi indicano che la riboflavina può essere degradata a lumicrome nella rizosfera da *Pseudomonas* [128, 129]. Il lumicrome è stato purificato e identificato da culture di *S. meliloti* come un composto che stimola la respirazione radicale [122]. Il lumicrome stimola in modo significativo lo sviluppo in piante di legumi e cereali [130, 131], riduce la conduttanza stomatica nei fagioli [132] e rafforza la fotosintesi in mais e soia [133, 134]. Questi dati mettono in evidenza come il lumicrome abbia importanti funzioni di regolamentazione nelle piante in fatto di crescita e di sviluppo, rappresentando un importante composto utile nel migliorare la fotosintesi e il tasso di crescita delle piante. Inoltre, il lumicrome stimola la metamorfosi in larve di ascidia di

Halocynthia roretzi [121]. Questa sostanza potrebbe inoltre essere coinvolta nel meccanismo di assorbimento della riboflavina da parte del fegato [135], nonché della captazione della stessa a livello renale [136] ed a livello del colon [137]. Nell'uomo il lumicrome è stato rilevato come prodotto del catabolismo della riboflavina, e lo ritroviamo nelle feci. Esso si forma grazie all'azione della microflora intestinale, ma anche come fotoprodotto nel tessuto dermale [138].

Nonostante le numerose evidenze della presenza di lumicrome negli organismi animali e vegetali, non sono noti studi che riportino la presenza di tale molecola nel miele. I dati qui riportati, quindi, rappresentano un'importante novità perché, considerando l'acido fenil lattico ed il lumicrome quali *markers* specifici, essi possono permettere di caratterizzare il miele di cardo in maniera univoca [80].

4.3 Attività antiossidante

4.3.1 Test in vitro dei mieli: FRAP, DPPH e PT

La **Tabella 30** riporta i valori di polifenoli totali e attività antiossidante dei mieli analizzati, disposti in ordine decrescente di contenuto in polifenoli totali (PT).

Tabella 30. Attività antiossidante (FRAP e DPPH) e polifenoli totali (PT) nei campioni di miele

N°	Campione	PT*		FRAP*		DPPH*	
		mg AGE [#] /kg	±ds	mmol Fe ²⁺ /kg	±ds	mmol TEAC ^{###} /kg	±ds
35	Corbezzolo	1098,6	330,1	12,0	2,1	4,6	0,8
11	Melata	826,9	239,1	8,2	2,8	1,6	0,6
9	Erika	635,8	93,6	5,0	0,9	1,5	0,3
14	Castagno	619,4	153,6	6,6	2,7	1,2	0,3
3	Timo	522,3	30,4	3,0	0,6	0,6	0,2
6	Cisto	427,2	27,1	4,8	1,1	1,0	0,4
2	Tiglio	360,9	11,9	2,8	0,1	0,5	0,1
22	Eucalipto	356,8	60,4	3,4	2,3	0,5	0,2
38	Asfodelo	352,1	70,6	4,3	1,1	0,5	0,3
2	Marruca	342,4	11,3	2,0	0,3	0,2	0,1
2	Girasole	331,0	3,7	2,2	0,1	0,5	0,0
2	Salvia	297,4	92,6	1,9	1,3	0,3	0,0
8	Agrumi	272,3	86,3	1,5	0,4	0,2	0,1
27	Cardo	250,1	63,3	1,6	0,5	0,5	0,2
2	Sideritis	222,9	13,1	0,5	0,1	0,1	0,1
6	Acacia	200,3	39,3	0,4	0,3	0,0	0,0
2	Lavanda	185,3	1,0	1,1	0,1	0,0	0,0
15	Sulla	147,7	36,1	1,2	0,6	0,1	0,2

[#]AGE : Gallic Acid Equivalent

* media di tre replicati

^{###}TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

I valori di polifenoli totali e attività antiossidanti hanno evidenziato alcune peculiarità interessanti, in particolare per il miele di corbezzolo e di melata. Il contenuto in polifenoli totali nel miele di corbezzolo arriva a 1098,59 mg AGE/kg con attività antiossidante totale ed antiradicalica pari a 11,99 mmol Fe²⁺/kg e 4,65 mmol TEAC/kg rispettivamente. Altri mieli ad elevato contenuto di polifenoli sono quelli di melata, erica, castagno e timo (827, 636, 619 e 522 AGE mg/kg rispettivamente). Il contenuto in polifenoli totali nei mieli di corbezzolo e melata risulta essere quasi tre volte superiori a quello di altri alimenti, quali i vini bianchi e l'arancia rossa (368,4 e 697,4 mg AGE/L rispettivamente). Il miele di asfodelo, tipico della Sardegna, presenta valori di attività antiradicalica e attività

antiossidante modesti, se confrontati con quelli ottenuti per il miele di corbezzolo. Infatti, i valori di DPPH sono circa 9 volte inferiori rispetto a quello di corbezzolo. I mieli con minore contenuto di polifenoli totali e con minore attività antiossidante totale e antiradicalica sono il miele di sulla, lavanda ed acacia (**Tabella 30**).

Inoltre, poiché il miele è un alimento formato prevalentemente da zuccheri (circa 80%) ed acqua (circa 17%), si è voluto valutare la possibile interferenza di queste sostanze sui valori ottenuti dalle metodiche antiossidanti. E' stato preparato un "miele artificiale" (costituito da fruttosio 40%, glucosio 35%, acido gluconico 1% e acqua 24%) e analizzato con i test del FRAP e del DPPH. I risultati hanno evidenziato che il miele artificiale possiede una bassissima attività antiossidante totale (FRAP: 0,10 mmol Fe²⁺/kg) e un'attività antiradicalica non determinabile, e quindi entrambe trascurabili nella valutazione del dato finale.

Mettendo in rapporto i risultati di attività antiossidante (FRAP/DPPH) dei campioni di miele (**Tabella 31**) si può notare che il miele di corbezzolo e di cardo posseggono un rapporto di circa 2,5, al contrario di quello di marruca in cui il potere antiradicalico è 10 volte inferiore rispetto a quello antiossidante totale.

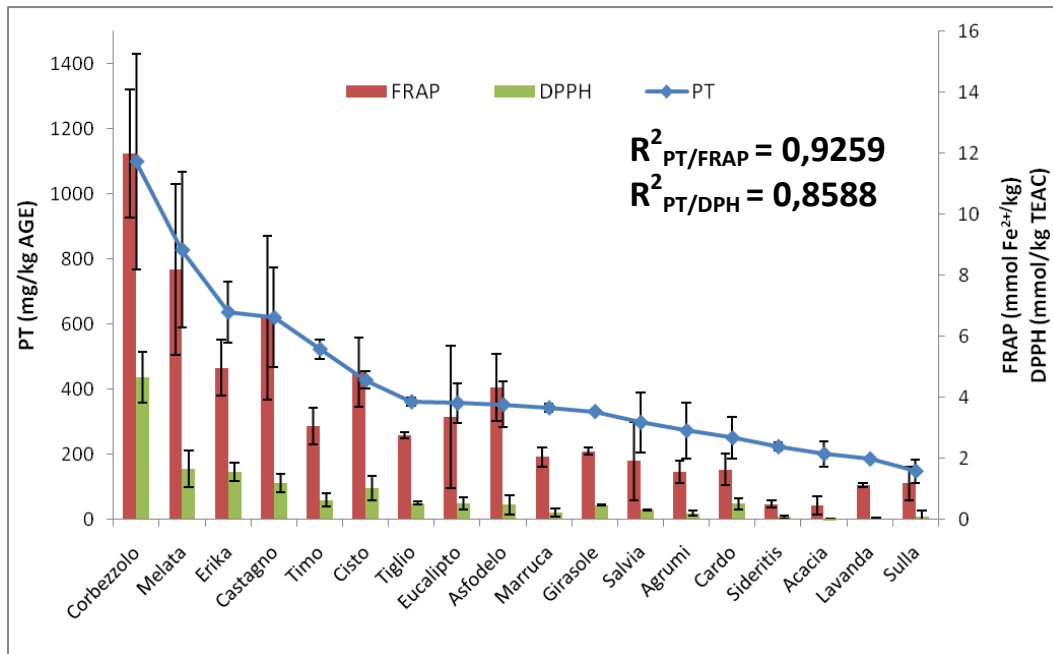
Tabella 31. Rapporti FRAP/DPPH nei campioni di miele

Campione	FRAP/DPPH	Campione	FRAP/DPPH
Corbezzolo	2,6	Marruca	9,3
Melata	5,0	Girasole	4,8
Erica	3,2	Salvia	6,2
Castagno	5,6	Agrumi	7,7
Timo	4,8	Cardo	3,2
Cisto	4,8	Sideritis	6,7
Tiglio	5,2	Lavanda	> 100
Eucalipto	6,4	Acacia	> 100
Asfodelo	9,2	Sulla	17,1

L'analisi statistica dei dati ha messo in evidenza una correlazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra tenore di polifenoli e attività antiossidante ed antiradicalica. Mettendo in relazione PT/FRAP (**Figura 12**) è stata ottenuta una correlazione altamente significativa con $R^2 = 0,9259$, mentre

tra PT/DPPH la correlazione risulta essere inferiore, ma significativa, con un $R^2=0,8588$. Tali correlazioni evidenziano come i polifenoli totali siano responsabili dell'attività antiossidante ed antiradicalica e che tali valori sono direttamente collegati all'origine floreale dei mieli.

Figura 12. Correlazioni (R^2) tra PT/FRAP e PT/DPPH nel miele.



Questi dati confermano che il potere antiossidante è direttamente correlato alla presenza di componenti di natura polifenolica, come già trovato da altri autori [139, 140].

Per questo motivo abbiamo valutato il potere antiossidante delle molecole presenti e caratteristiche delle matrici in questione tal quali, per cercare di capire quale potesse essere il contributo che ogni singola molecola esercita sull'attività antiossidante del prodotto finale (vedi sezione 4.3.4).

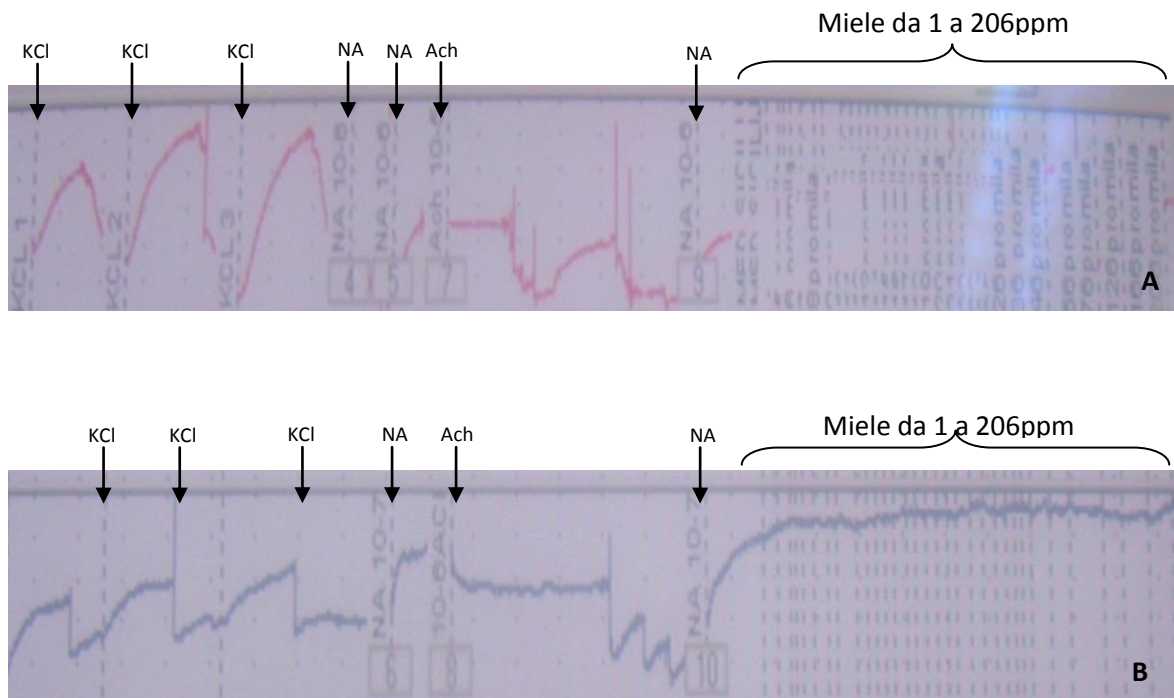
4.3.2 Test in *ex-vivo* sul miele di corbezzolo: test degli organi isolati.

In **figura 13** è mostrata la reazione dell'aorta in seguito all'aggiunta sia delle diverse sostanze utilizzate per valutare la reattività dell'organo (KCl, NA e Ach) sia del miele. Dopo l'emissione di KCl nel sistema, si è osservato un

aumento della forza. Il KCl, infatti, induce vasocostrizione, e ciò sta ad indicare che il vaso è funzionante. I successivi lavaggi confermano questa situazione in entrambi gli esperimenti.

L'aggiunta di NA produce vasocostrizione. Da notare il differente meccanismo fisiologico di vasocostrizione nei 2 sistemi animali: nei campioni di ratto KCl>NA (**Figura 13**) mentre nei campioni di porcellino d'India NA>KCl (**Figura 13**). Questo effetto di vasocostrizione fornisce un'ulteriore conferma della vitalità del vaso. L'aggiunta di Ach produce vasodilatazione.

Figura 13. Risultati analisi aorta di ratto (A) e porcellino d'India (B).
In ascisse il tempo ed in ordinate la forza in mN.



La percentuale di vasocostrizione indotta dall'NA è paragonabile a quella di vasodilatazione indotta dall'Ach e ciò sta a significare che l'endotelio. Inoltre nel campione di ratto, si manifesta una superiore vasodilatazione endotelio-dipendente rispetto a quella osservata nei campioni di porcellino d'India [83].

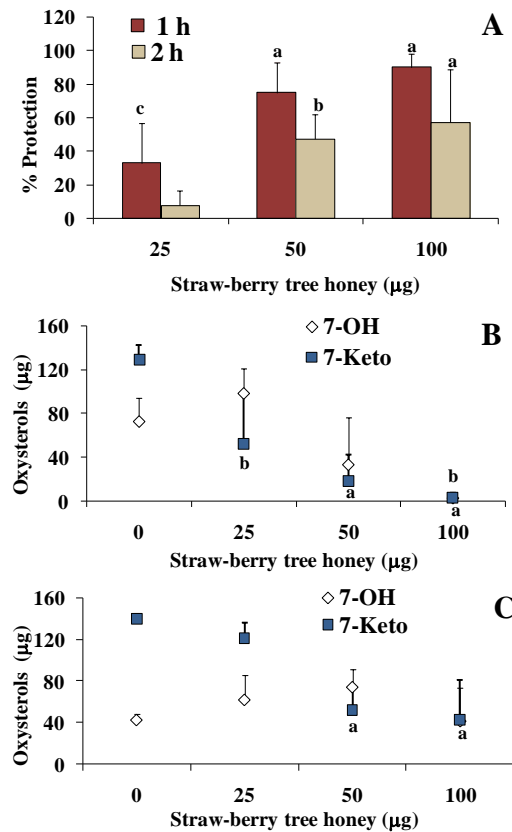
Dopo l'aggiunta di NA, indispensabile per dare una stima del valore di vasodilatazione del campione, è stato aggiunto miele di *Arbutus unedo* L. a partire da 1 ppm fino a 206 ppm. Si nota che l'aggiunta del miele non provoca alcun cambiamento. Tale modello evidenzia che l'attività antiossidante del miele

di corbezzolo non si esplica per via diretta sull'endotelio del vaso, come invece succede per altri alimenti come il vino rosso, o estratti di piante [10, 141].

4.3.3 Test *in vitro* su modelli biologici di valutazione del potere protettivo del miele di corbezzolo dallo stress ossidativo.

Per valutare meglio l'attività antiossidante osservata nel miele di corbezzolo è stato testato il suo effetto protettivo in test biochimici di stress ossidativo (140° C) senza l'utilizzo di solventi di ossidazione del colesterolo. A questa temperatura il colesterolo è un olio e più dell'80% scompare entro 1 h di riscaldamento [84, 85]. La diminuzione del livello di colesterolo e la sua trasformazione nei suoi prodotti ossidati (7-cheto e 7 β -OH) sono stati misurati come indicatori del processo ossidativo. La **Figura 14A** mostra l'attività antiossidante (% protezione) ottenuta in presenza di diverse quantità di miele di corbezzolo (25-100 μ g) durante l'ossidazione del colesterolo (per 1 h e 2 h).

Figura 14. Ossidazione del colesterolo a 140°: % protezione del miele di corbezzolo (A); valori (μ g) di 7-cheto e 7 β -OH a 1 h (B) e a 2 h rispettivamente (C).



L'attività antiossidante è stata misurata come percentuale di protezione del colesterolo, ed è stata calcolata considerando la percentuale di consumo di sterolo in presenza dell'antiossidante in relazione al consumo totale di colesterolo senza l'antiossidante (100% del consumo o 0% di protezione). La **Figura 14** mostra anche i valori (μg) di 7-cheto e 7 β -OH formati durante l'ossidazione del colesterolo a 140° per 1 h (**Figura 14B**) e 2 h (**Figura 14C**) in assenza (punto 0) o in presenza di miele.

Il miele di corbezzolo ha mostrato un'attività significativa di inibizione della degradazione del colesterolo da 25 μg per 1 h (protezione del 30%) e 50 μg per 2 h (55%), prevenendo efficientemente la formazione del 7-cheto.

4.3.4 Attività antiossidante dei principi attivi contenuti nel miele.

La **Tabella 32** riporta i valori di FRAP e DPPH riferiti a un grammo di composto puro. Si può osservare come l'acido gallico possieda il potere antiossidante più elevato (FRAP: 38,2±1,8 mmol Fe²⁺/g e DPPH: 17,5±0,9 mmol TEAC/g).

Tabella 32. Attività antiossidante e antiradicalica delle molecole pure

Composto	FRAP*		DPPH*		FRAP/DPPH
	mmol Fe ²⁺ /g		mmol TEAC [#] /g		
	media	± ds	media	± ds	
Acido gallico	38,2	1,8	17,5	0,9	2,2
Acido caffeico	19,9	2,0	8,2	0,4	2,4
Acido Ascorbico (Vitamina C)	16,2	1,2	4,8	0,6	3,4
Acido omogentisico	16,0	0,4	5,9	0,4	2,7
BHA (butilidrossianisolo)	15,1	0,8	3,7	0	4,1
Metil siringato	13,4	2,8	0,2	0,1	89,3
Resveratrolo	12,8	0,8	2,7	0,1	4,7
Malvidina-3-O-glu (oenina)	9,5	0,3	2,8	0,2	3,3
BHT (butilidrossitoluolo)	7,4	0,5	2,1	2,3	3,5
Acido <i>c,t</i> -ABA	<0,001	0,0	n.r.		
Acido <i>t,t</i> -ABA	<0,001	0,0	n.r.		
HMF	n.r.		n.r.		
Acido fenil lattico	n.r.		n.r.		
Lumicrome	n.r.		n.r.		
Riboflavina (Vitamina B ₂)	n.r.		n.r.		
Acido kinurenico	n.r.		n.r.		

[#] TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

*media di 3 replicati
n.r. = non rilevato

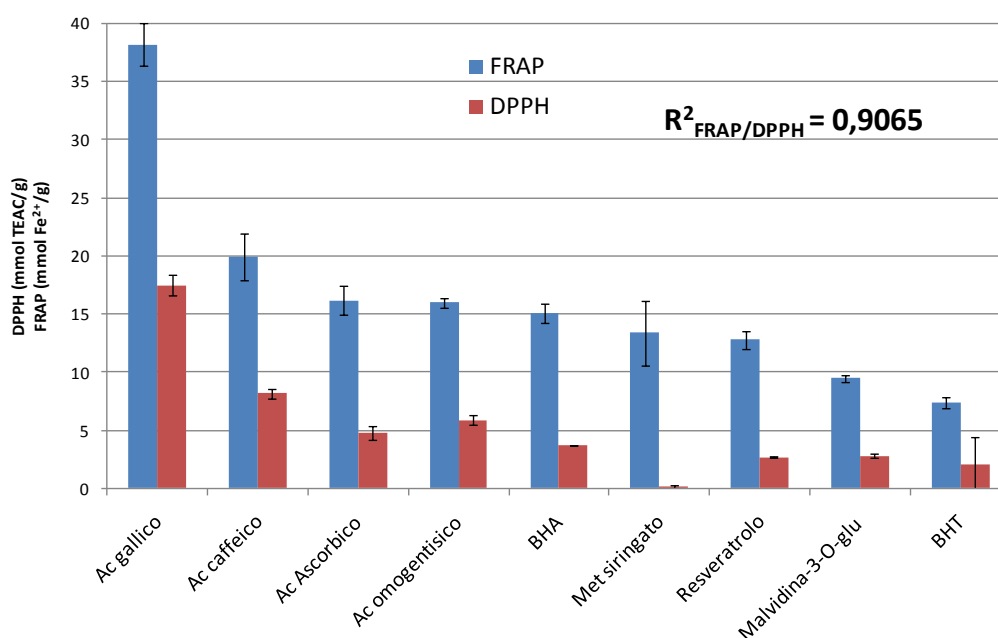
È interessante osservare come gli acidi abscissici, molto abbondanti nel miele di corbezzolo non risultano essere determinanti per l'attività antiossidante di questi prodotti. Stesso discorso vale per i *markers* del miele di cardo (acido fenil lattico e lumicrome), che nonostante la loro struttura potesse far ipotizzare un carattere di tipo antiossidante, le metodiche utilizzate hanno escluso questa possibilità.

Prendendo in considerazione il rapporto FRAP/DPPH (**Tabella 32**) possiamo notare che un elevato valore di tale rapporto, come nel caso del metil siringato (89,3), è dato da un'elevata attività antiossidante totale (13,4 mmol Fe²⁺/g) e un

basso potere antiradicalico (0,2 mmol TEAC/g). Altre molecole, come l'acido gallico, presentano invece bassi valori del rapporto FRAP/DPPH indicando sia una buona attività antiossidante totale che un buon potere antiradicalico.

L'acido omogentisico ed il metil siringato hanno mostrato valori di attività antiossidante paragonabili al resveratrolo (nota molecola trovata nell'uva e vino rosso) all'acido ascorbico e al BHA (tipici conservanti alimentari), ma superiori a quella del BHT (conservante alimentare sintetico). Inoltre esiste una correlazione statisticamente significativa tra le 2 tecniche antiossidanti ($R^2=0,9065$) (Figura 15).

Figura 15. Correlazione (R^2) tra PT/FRAP e PT/DPPH di molecole pure.



Partendo dal presupposto che il mantenimento di adeguati livelli ematici di antiossidanti sia alla base della prevenzione dagli effetti nocivi dei radicali liberi, si evince che in un alimento gli antiossidanti siano in grado di interagire tra loro con azione sinergica ed efficacia decisamente maggiore a quella dimostrata dal singolo antiossidante. Quest'ultimo, invece, sbilanciando il sistema redox, potrebbe produrre ulteriori danni [142].

Valutare il contributo di ciascuna di questi composti sull'attività antiossidante dei singoli prodotti alimentari non è facile. Prima di tutto, le molecole dosate quantitativamente attraverso l'analisi HPLC-DAD non

rappresentano la totalità dei composti che possono intervenire negli equilibri redox. In secondo luogo, la presenza di più molecole che possono intervenire sugli equilibri redox, può attivare sinergie o inibizioni dei meccanismi coinvolti. Ad esempio, dati in letteratura riportano che i derivati della reazione di Maillard (derivati furanici, pirazine, ecc.), che si formano per riscaldamento di matrici contenenti zuccheri, hanno un forte potere antiossidante ma con la nostra metodica l'HMF risulta non avere tale attività [143].

Se prendiamo in considerazione il miele di corbezzolo, quello con attività antiossidante più elevata (vedi **Tabella 11**), risulta che il composto fenolico più abbondante è l'acido omogentisico. Questa molecola ha un buon potere antiossidante (FRAP: $16,03 \pm 0,41$ mmol Fe^{2+}/g ; DPPH: $5,85 \pm 0,35$ mmol TEAC/g) e dovrebbe contribuire in maniera consistente a determinare l'elevata attività antiossidante del miele di corbezzolo. Ipoteticamente, si può valutare il contributo che l'acido omogentisico apporta all'attività antiossidante di tale miele. L'attività antiossidante totale del miele di corbezzolo è di $11,99$ mmol Fe^{2+}/kg (vedi **Tabella 11**) e, mediamente, in un kg di miele di corbezzolo sono presenti circa 410 mg di acido omogentisico: sapendo che 1g di acido omogentisico ha un attività antiossidante di $16,03$ mmol Fe^{2+}/g , possiamo affermare che questa molecola è responsabile del 55% dell'attività antiossidante totale del miele stesso. Ciò indica che nel miele sono presenti altre molecole che contribuiscono al suo buon poter antiossidante.

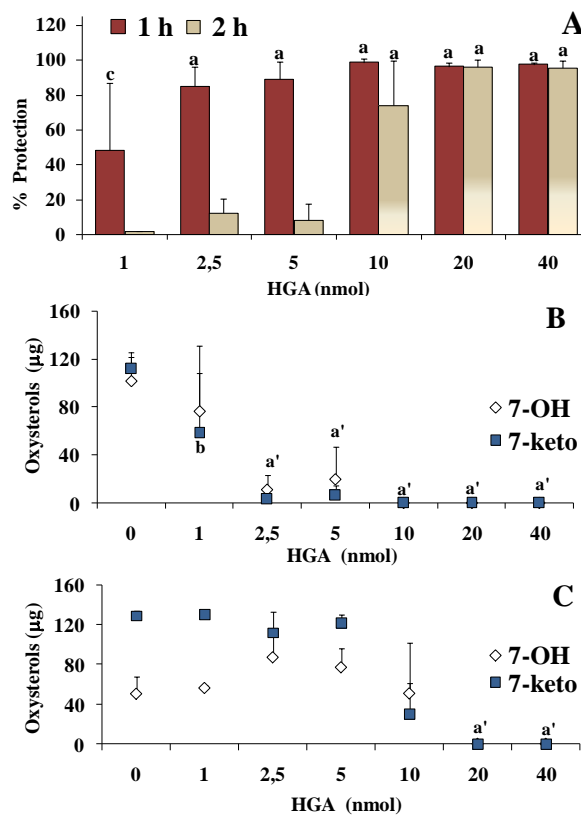
Il metil siringato, che caratterizza il miele di asfodelo, risulta avere un buon potere antiossidante totale ($13,40 \pm 2,82$ mmol Fe^{2+}/g) ed uno scarso potere antiradicalico ($0,15 \pm 0,14$ mmol TEAC/g). Facendo lo stesso ragionamento, considerando che in un kg di miele di asfodelo ritroviamo circa 224 mg di metil siringato, possiamo dire che quest'ultimo è responsabile del 67% dell'attività antiossidante totale del miele stesso.

L'acido fenil lattico e lumicrome non risultano avere attività antiossidante con questo tipo di analisi (FRAP e DPPH) giustificando in qualche modo lo scarso potere antiossidante del miele di cardo.

Tra le molecole *markers* dei mieli l'acido omogentisico (HGA) è quello che ha mostrato i valori più interessanti di attività antiossidante e antiradicalica (16,0 mmol Fe²⁺/g e 5,9 mmol TEAC/g rispettivamente).

La **Figura 16** mostra l'attività antiossidante (espressa come % di protezione) (**Figura 16A**) e i valori (μg) di 7-cheto e 7 β -OH (**Figura 16B e C**) misurati durante l'ossidazione del colesterolo a 140° C per 1 h e 2 h in presenza di concentrazioni diverse (1-40 μM) di HGA.

Figura 16. Ossidazione del colesterolo a 140°: % protezione dell'HGA (A); valori (μg) di 7-cheto e 7 β -OH a 1 h (B) e a 2 h rispettivamente (C).



L'acido omogentisico ha mostrato una significativa inibizione della degradazione del colesterolo a partire da 2,5 nmol per 1 h e 20 nmol per 2 h, mostrando una protezione del 45% a 1 nmol e dell' 80% a 10 nmol per 1 e 2 h rispettivamente.

Il valore di IA₅₀ (quantità di antiossidante che dà una protezione del 50% sulla diminuzione del colesterolo durante l'ossidazione) dell'HGA è riportato in **tabella 33**.

Tabella 33. Valori di IA₅₀ durante l'ossidazione del colesterolo ad 1 e 2 ore

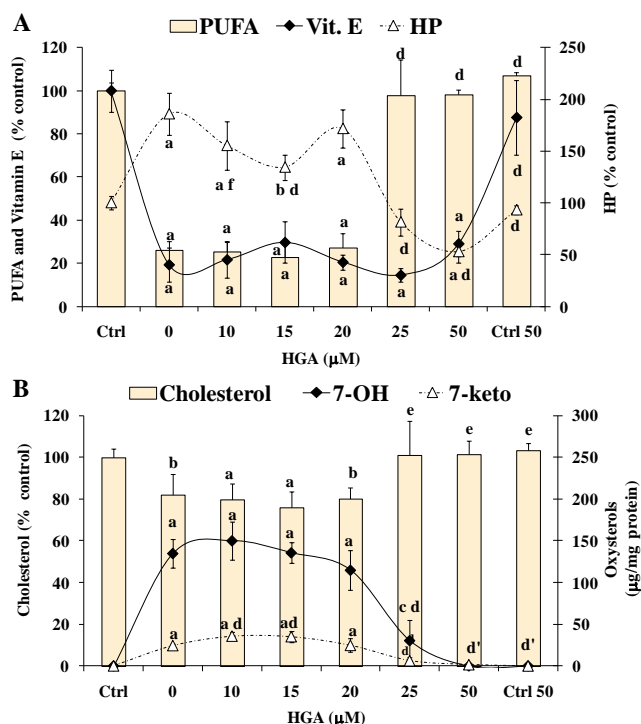
Composto	IA ₅₀ (nmol)	
	1 h	2 h
Vitamina E	<0,5	0,7
Ac. Omogentisico	1,1	7,7

Dati ottenuti in esperimenti differenti

HGA ha mostrato grande efficienza nella protezione degli steroli contro la degradazione ossidativa, con valori di IA₅₀ a 1 h e 2 h inferiori a quelli riscontrati per la vitamina E (IA₅₀ < 0,5 nmol e 0,7 nmol per 1 e 2 h).

Per verificare la perossidazione lipidica indotta da Cu²⁺, sono state analizzate le variazioni della concentrazioni di colesterolo e di acidi grassi polinsaturi (PUFA), insieme con l'aumento dei livelli dei loro prodotti di ossidazione principali e più stabili (HP, 7β-OH e 7-cheto). La **Figura 17** riporta i valori di PUFA, vitamina E e HP (espresso come % di controllo) (**fig. 17A**); colesterolo (% di controllo), 7β-OH e 7-cheto (μg/mg) (**fig. 17B**), misurato nel controllo e nel corso dell'ossidazione delle LDL a 37° C o in presenza di HGA (10-50 μM).

Figura 5. Ossidazione delle LDL con CuSO₄: valori di PUFA, vitamina E, idroperossidi (HP), colesterolo, 7β-OH e 7-cheto



L'acido omogentisico, alla dose testata (50 μ M, 50 Ctrl), non ha influenzato i livelli acidi grassi, vitamina E, colesterolo e prodotti ossidativi (HP e ossisteroli) rispetto al controllo delle LDL. E' stata osservata una significativa protezione, in relazione al controllo ossidato, dalla concentrazione di HGA di 25 μ M sia per PUFA che per colesterolo, con valori di HP e ossisteroli simili al controllo. Tuttavia il pretrattamento con HGA non ha protetto la degradazione della vitamina E indotta da Cu^{2+} .

4.4 Aspetto tossicologico

I risultati ottenuti sui parametri di validazione della metodica HPLC-DAD sono molto buoni ed i recuperi sono risultati adeguati per la separazione e la determinazione delle molecole azotate.

Il metodo proposto è risultato essere specifico con indici di purezza dei vari picchi in esame superiori al 98% .

L'intervallo di linearità del metodo, diverso per ogni tipologia di standard in quanto è relativo all'effettiva concentrazione di queste molecole nel miele (**Tabella 34**), risulta possedere valori di $R^2 > 0,9975$.

Il recupero medio a tre livelli di concentrazione (**Tabella 34**), è risultato essere compreso tra 75,1 e 113,2 % con RDS% ≤ 10 %.

Tabella 34: Accuratezza e precisione

	ACCURATEZZA			PRECISIONE	
	Ppm mg/kg	Recupero % Media	ds %	<i>Intra-day</i> ds %	<i>Inter-day</i> ds %
Caffeina	5	96,5	1,6	1,1	4,5
	1	103,4	5,4	0,3	5,0
	0,2	77,2	5,5	9,7	20,2
Senecifillina	20	104,3	6,3	1,0	3,7
	10	88,6	5,6	4,2	5,9
	5	93,3	3,8	4,3	6,8
Acido Chinurenico	5	100,6	2,2	3,9	5,2
	1	82,2	8,5	3,8	9,5
	0,2	111,2	3,5	4,3	15,2
Senecionina	5	106,9	9,8	5,8	2,2
	1	75,8	3,1	5,1	9,2
	0,5	113,2	6,5	10,5	19,5
Lumicrome	40	84,3	8,7	3,7	5,6
	8	77,8	7,0	4,7	4,7
	2	107,6	8,5	2,7	4,1
Sanguinarina	5	83,9	3,1	3,1	2,4
	1	75,1	7,5	2,1	5,4
	0,5	79,4	6,6	2,9	8,5
Cheleretina	5	87,2	8,8	0,9	4,0
	2,5	79,6	5,2	3,2	1,3
	0,5	83,3	1,9	2,9	3,7

Le prove di riproducibilità *intra-day* ed *inter-day* sono state effettuate considerando tre livelli di concentrazione (**Tabella 34**). Il coefficiente di

variazione per le prove *intra-day* è inferiore al 10,5 % e per quelle *inter-day* inferiore al 19,5%.

I limiti di determinazione (LOD) ed il limite di quantificazione (LOQ) per il metodo sono riportati in **tabella 35**.

Tabella 35. Limiti di determinazione (LOD) ed il limite di quantificazione (LOQ)

	LOD mg/kg	LOQ mg/kg
Caffeina	0,01	0,02
Senecifillina	0,01	0,04
A. Chinurenico	0,01	0,03
Riboflavina	0,01	0,03
Senecionina	0,02	0,06
Lumicrome	0,01	0,04
Sanguinarina	0,01	0,02
Cheleretina	0,01	0,02

La metodica permette di poter determinare e quantificare gli alcaloidi 1,2-deidropirrolizidinici a concentrazioni inferiori rispetto a quelle stabilite dalla German Federal Health come dose orale massima ammissibile [11, 62] (*vedi sezione 2.4*).

Gli alcaloidi presi in esame in questo lavoro risultano assenti nei mieli sardi analizzati, ma la metodica ha permesso di poter determinare e quantificare molecole azotate come la caffeina, l'acido chinurenico ed il lumicrome (**Tabella 36**).

Tabella 36: analisi quantitativa di molecole azotate (mg/kg)

MIELE	N° Campioni	CAFFEINA			A. CHINURENICO			LUMICROME		
		N°	Max	Min	N°	Max	Min	N°	Max	Min
ASFODELO	39							29	4,5	0,3
CORBEZZOLO	36				25	9,3	0,2	11	1,2	0,4
CARDO	30	8	0,8	0,1	25	3,0	0,0	30	69,9	7,4
EUCALIPTO	22				19	0,9	0,1	22	7,6	0,3
SULLA	15				7	3,0	0,2	14	11,0	0,1
AGRUMI	8	8	3,8	1,8	7	0,8	0,2	6	20,8	0,7
ERICA	9				6	12,1	0,5	6	0,4	0,1
ACACIA	6				6	1,8	0,3			

Come ci si aspettava dai dati di letteratura [57, 144], nel miele di agrumi (genere *Citrus*) è stato trovato un alcaloide naturale, la caffeina che viene individuata anche nel miele di cardo, visto che le fioriture delle due piante sono contemporanee (primaverile), e ciò può essere indice di contaminazione.

L'acido chinurenico, marcatore del miele di castagno [145, 146] e delle melate in genere, ma soprattutto prodotto di derivazione animale in quanto deriva dagli afidi [147], è stato ritrovato nella maggior parte dei mieli analizzati, presumibilmente proprio per il fatto che gli afidi sono presenti un po' in tutte le piante. Il miele di asfodelo risulta essere l'unico miele in cui non si è riscontrata la presenza dell'acido chinurenico forse perchè l'asfodelo sopravvive e cresce anche in terreni che hanno subito incendi (praterie aride e soleggiate). Infatti nelle formazioni forestali la fonte principale di zuccheri per le api è rappresentata proprio dalla melata prodotta da alcune afidi delle Conifere. I mieli più scuri, corbezzolo ed erica, risultano essere i mieli con più alto contenuto di acido chinurenico (9,3 e 12 mg/kg rispettivamente).

Il lumicrome, marcatore del miele di cardo [80], è stato ritrovato nella maggior parte dei campioni sardi analizzati. La sua presenza in tutte le tipologie di miele potrebbe essere attribuita al fatto che la *Galactites* cresce spontanea nei terreni aridi ed incolti e quindi, essendo presente in tutto il territorio, costituisce un alto indice di inquinamento di altri mieli.

5. CONCLUSIONI

La metodica HPLC-DAD messa a punto in questo lavoro è risultata essere ottimale per ottenere un *fingerprinting* dei mieli uniflorali. Questa metodica si è dimostrata particolarmente efficace per discriminare i caratteristici mieli uniflorali sardi di asfodelo, corbezzolo e cardo (*Asphodelus microcarpus* Salzm. e Viv., *Arbutus unedo* L. e *Galactites tomentosa* Moench). Questi mieli presentano specifici marcatori, assenti negli altri mieli uniflorali sardi analizzati, i quali sono tipici della specie botanica di appartenenza perchè presenti anche nei rispettivi nettari. Tali molecole sono state caratterizzate attraverso tecniche di estrazione con solventi, separazione su SPE, TLC e HPLC preparativa e successiva analisi HPLC-DAD, MS/MS, Q-TOF, IR e NMR. I risultati di questi studi sono oggetto di pubblicazioni [78-80].

Le analisi effettuate sui mieli sardi hanno evidenziato valori elevati di attività antiossidante (FRAP e DPPH), tali da suggerire un loro consumo all'interno della dieta quotidiana. I mieli, ed in particolare quelli ricchi di polifenoli come il miele di corbezzolo, sono sicuramente da preferire agli zuccheri raffinati. Questo miele è risultato essere, tra le 18 tipologie di miele analizzate, quello con le migliori proprietà antiossidanti. Il suo contenuto in polifenoli totali arriva fino a 1098,59 mg AGE/kg, e nonostante non eserciti un effetto diretto sul sistema circolatorio, esercita un sufficiente potere protettivo nei confronti dell'ossidazione del colesterolo.

L'acido omogentisico, *marker* del miele di corbezzolo, si ritrova con una concentrazione media pari a 410 mg/kg che lo rende responsabile del 55% dell'attività antiossidante totale del miele stesso. Inoltre l'acido omogentisico è risultato essere, tra tutti i marcatori individuati, quello ad attività antiossidante più elevata (FRAP e DPPH) ed ha mostrato un effetto protettivo nei confronti dell'ossidazione del colesterolo e delle LDL.

Per quanto riguarda gli alcaloidi, la metodica di estrazione e quantificazione proposta in questo lavoro risulta possedere adeguati parametri di linearità, sensibilità e specificità dimostrandosi precisa ed accurata.

Nonostante gli alcaloidi ricercati in questo lavoro siano stati ritrovati in svariati mieli [11, 12], essi risultano assenti nei mieli sardi analizzati. Inoltre considerando il fatto che gli spettri UV-Vis di queste classi di composti risultano essere simili tra di loro, grazie allo studio degli spettri si può ipotizzare l'assenza di alcaloidi appartenenti alle due famiglie in esame (PAs e QBA). La metodica è risultata ottimale anche per molecole azotate come la caffeina (agrumi), il lumicrome (cardo, asfodelo, eucalipto, sulla, agrumi) e l'acido chinurenico (corbezzolo, cado, eucalipto, sulla, agrumi).

I risultati di questo studio evidenziano come i mieli uniflorali possiedano caratteristiche chimiche direttamente collegate alla loro origine botanica e che sono necessari ulteriori studi per completare la caratterizzazione della componente chimica dei principali mieli sardi (*fingerprinting*).

In conclusione si può affermare che il miele, oltre ad essere una valida alternativa alimentare al consumo di zucchero come edulcorante, apporta numerosi micronutrienti di elevata qualità nutrizionale che lo rendono un alimento prezioso da consumare tutti i giorni. Pertanto, sarebbe auspicabile un uso dei composti attivi in esso contenuti per la preparazione di additivi alimentari dotati di effetto protettivo ed antiossidante.

In questa tesi si è cercato di mettere in evidenza l'importanza della diversificazione qualitativa dei mieli in modo da valorizzare un prodotto "*made in Italy*" che possa diventare maggiormente competitivo in un mercato sempre più ricco di mieli di importazione a bassissimo costo.

E' auspicabile che i risultati ottenuti possano dare un supporto a tutto ciò che è inerente al "mondo dell'ape", fornendo un nuovo strumento analitico/scientifico utile sia per il consumatore (che ne guadagna in garanzia e qualità di prodotto) sia, soprattutto, per gli apicoltori i quali, con le loro conoscenze botaniche e entomologiche, rappresentano le "sentinelle" delle nostre campagne, e sono tra i pochi che ancora vigilano regolarmente e con grande attenzione sui territori silvestri e meno frequentati della nostra terra.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Rouanet J.M., Décordé K., Del Rio D., Auger C., Borges G., Cristol J.P., Lean M.E.J., Crozier A. Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters. *Food Chem.* **2010**, 118: 266–271.
2. Hajieva P., Mocko J.B., Moosmann B., Behl C. Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. *J. Neurochem.* **2009**, 110 (1): 118-132.
3. Corti A., De Tata V., Pompella A. Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana. *LigandAssay.* **2009**, 14 (1): 8-15.
4. Pennington J.A.T., Fisher R.A. Classification of fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis.* **2009**, 22s, s23-s31.
5. Corral-Aguayo R.D., Yahia E.M., Carrillo-Lopez A., González-Aguilar G. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56: 10498-10504.
6. Martin S., Andriambelison E., Takeda K., Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* **2002**, 135: 1579–1587.
7. Gheldof N., Wang X.H., Engeseth N. J., Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 5870–5877.
8. Baba S., Natsume M., Yasuda A., Nakamura Y., Tamura T., Osakabe N., Kanegae M., Kondo K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J. Nutr.* **2007**, 137 (6): 1436-41.
9. Nishioka K., Nakagawa K., Umemura T., Jitsuiki D., Ueda K., Goto C., Chayama K., Yoshizumi M., Higashi Y. Carvedilol improves endothelium-dependent vasodilation in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart.* **2007**, 93: 247-248
10. Mudnic I., Modun D., Brizic I., Vukovic J., Generalic I., Katalinic V., Bilusic T., Ljubenkovic I., Boban M. Cardiovascular effects in vitro of aqueous extract of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) leaves. *Phytomedicine.* **2009**, 16(5), 462-469.
11. Edgar J.A., Roeder E., Molyneaux R.J. Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: a Potential Threat to Health *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 2719-2730.
12. Luo X.-B., Chen B., Yao S.-Z. High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Mass Spectrometry for Rapid and Sensitive Determination of Sanguinarine and Chelerythrine in Exogenously Contaminated Honey. *Chromatographia.* **2004**, 60: 347–351.
13. Beales K.A., Betteridge K., Colegate S.M., Edgar J. A. Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honeys. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52: 6664-6672.
14. Kosina P.I., Walterová D., Ulrichová J., Lichnovský V., Stiborová M., Rýdlová H., Viimagear J., Kreimageman V., Brabec M. J., imageimánek V. Sanguinarine and

- chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*. **2004**, 42 (1): 85-91.
15. D.Lgs. 21/05/2004, n. 179 - Attuazione della direttiva 2001/110/CE concernente la produzione e la commercializzazione del miele – G.U. n. 168 del 20/07/2004.
 16. Doner L.W., **2000**. Honey. In Caballero, B., Trugo, L. and Finglas, P.M. (2nd Eds). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Oxford: Academic Press. 5, p. 3125-3130.
 17. Adler L. S. The ecological significance of toxic nectar. *OIKOS*. **2000**, 91: 409–420.
 18. D.M. 25/07/2003 - Ministero delle Politiche Agricole e Forestali - "Approvazione dei metodi ufficiali di analisi da applicarsi per la valutazione delle caratteristiche di composizione del miele" – G. U. n. 185 del 11/08/2003.
 19. Kwakman, P.H.S., te Velde A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Zaat S.A.J. How honey kills bacteria. *Faseb Journal*. **2010**. 24 (7): 2576-2582.
 20. Persano Oddo, L., Sabatini A. G., Accorti M., Colombo R., Marcazzan G. L., Piana M. L., Piazza M. G., Pulcini P. I. Mieli Uniflorali Italiani. Nuove Schede di Caratterizzazione; Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria: Roma, Italy, **2000**, p 69.
 21. Von Der Ohe W., Persano Oddo L.; Piana M.L., Morlot M., Martin P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. **2004**, 35: S18-S25.
 22. UNI 8915:1987 - Analisi sensoriale. Vocabolario; UNI ISO 6658:1987 – Analisi sensoriale. Metodologia. Guida generale; UNI ISO 6564:1989 – Analisi sensoriale. Metodologia. Metodi di definizione del profilo dell'odore e del sapore; UNI 10957:2003 – Analisi sensoriale. Metodo per la determinazione del profilo sensoriale degli alimenti e bevande.
 23. Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl G. Methods of melissopalynology. *Bee World* **1978**, 59: 139-157.
 24. Floris I., Satta A., Pappof C., **2000**. Ricerche sull'apicoltura in Sardegna. Ed. Stampa. Color, Muros (SS), p. 160.
 25. Cabras P., Angioni A., Tuberose C., Floris I., Reniero F., Guillou C., Ghelli S. Homogentisic acid: a phenolic acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) Honey. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (10): 4064-4067.
 26. Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Davit-Spraul A., Conti M., Legrand, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2000**, 3: 373-84.
 27. Rouanet J.M., Décordé K., Del Rio D., Auger C., Borges G., Cristol J.P., Lean M.E.J., Crozier A. Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters. *Food Chem.* **2010**, 118: 266–271.
 28. Gheldof N., Engeseth N.J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 3050-5.
 29. Ferreres F., Ortiz A., Silva C., Garcí'a-Viguera C., Toma's-Barbera'n F.A., Toma's-Lorente F. Flavonoids of "La Alcarria" honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, 194: 139-143.

30. Andrade P., Ferreres F., Amaral M.T. Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, 20: 2281-2288.
31. McKibben J., Engeseth N.J. Honey as a protective agent against lipid oxidation in muscle foods. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 592-595.
32. White J.W. Composition of honey. In *Honey, A Comprehensive Survey*; Crane, E., Ed.; Crane, Russak & Company: New York. **1975**, p 157-206.
33. Tan S.T., Wilkins A.L., Molan P.C., Holland P.T., Reid M.A. Chemical approach to the determination of floral sources of New Zealand honeys. *J. Apicult. Res.* **1989**, 28: 212-222.
34. Cherchi A., Spanedda L., Tuberoso C., Cabras P. Solid-phase extraction of high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *J. Chromatogr.* **1994**, 669: 59-64.
35. White J.W., Rudyj O.N. The protein content of honey. *J. Apic. Res.* **1978**, 17: 234-238.
36. Antony S.M., Rieck J.R., Dawson P.L. Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. *Poultry Sci.* **2000**, 79: 1846-1850.
37. Chen L., Mehta A., Berenbaum M., Zangerl A.R., Engeseth N.J. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48: 4997-5000.
38. Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J.C.M., Estevinho L.M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contribution of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* **2009**, 114: 1438-1443.
39. Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G., Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46: 3774-3779.
40. Yamaguchi Y., Yoshikawa N., Kagota S., Nakamura K., Kunitomo M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric. Oxide.* **2006**, 15: 380-386.
41. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **1999**, 111(5): 383-389.
42. Del Fiandra M., Federici C., Cresci M., Andreassi M.G. Il ruolo del danno ossidativo agli acidi nucleici nella patogenesi delle malattie cardiovascolari. *LigandAssay.* **2009**, 14(1): 26-33.
43. Gutteridge J.M., Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin. Haematol.* **1989**, 2(2): 195-256.
44. Tribble D. L. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* **1999**, 99: 591-5.
45. Salonen J.T. Markers of oxidative damage and antioxidant protection: assessment of LDL oxidation. *Free Radic. Res.* **2000**, 33 Suppl, S41-6.
46. Miyajima H., Adachi J., Kohno S., Takahashi Y., Ueno, Y., Naito T. Increased oxysterols associated with iron accumulation in the brains and visceral organs of aceruloplasminemia patients. *Qjm.* **2001**, 94: 417-22.

47. Adachi J., Kudo R., Ueno Y., Hunter R., Rajendram R., Want E., Preedy V.R. Heart 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols are elevated in chronically ethanol-fed rats. *J. Nutr.* **2001**, 131: 2916-20.
48. Smith L.L., Johnson B.H. Biological activities of oxysterols. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, 7: 285-332.
49. Lercker G. **2005**. L'ossidazione delle sostanze grasse *In* "Alimenti e salute". M. Cocchi and A. Mordenti, eds., p. 405-418. Coop. Libreria Universitaria Editrice, Bologna.
50. Burkitt M.J. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 394: 117-35.
51. Rossi L., Arciello M., Capo C., Rotilio G. Copper imbalance and oxidative stress in neurodegeneration. *Ital. J. Biochem.* **2006**, 55: 212-21.
52. Frei B., Gaziano, J.M. Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and -independent oxidation. *J. Lipid. Res.* **1993**, 34: 2135-45.
53. London-Shafir I., Shafir S., Eisikowitch D. Amygdalin in almond nectar and pollen – facts and possible roles. *Plant Syst. Evol.* **2003**, 238: 87–95.
54. Serenelli G. Erodoto, il miele tossico e le grayanotossine. *Natural 1.* **2010**, 60-62.
55. Singaravelan N., Inbar M., Ne'eman G., Distl M., Wink M., Izhaki I. The effects of nectar-nicotine on colony fitness of caged honeybees. *Journal of Chemical Ecology.* **2006**, 32(1): 49-58.
56. Bogo A., Mantle P.G. Caffeine: also a fungal metabolite. *Phytochemistry.* **2000**, 54: 937–9.
57. Kretschmar J.A., Baumann T.W. Caffeine in citrus flowers. *Phytochemistry.* **1999**, 52: 19–23.
58. Fu P.P., Xia Q., Chou M.W., Ge Lin G. Detection, Hepatotoxicity, and Tumorigenicity of Pyrrolizidine Alkaloids in Chinese Herbal Plants and Herbal Dietary Supplements. *Journal of Food and Drug Analysis.* **2007**, 15 (4): 400-415.
59. Molyneux R.J., James L.F. Pyrrolizidine alkaloids in milk: thresholds of intoxication. *Vet. Hum. Toxicol.* **1990**, 32: 94-103.
60. Fu P.P., Xia Q., Lin G., Chou M.W. Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab.* **2004**, 36: 1-55.
61. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the European Commission Related to Pyrrolizidine Alkaloids as Undesirable Substances in Animal Feed. *The EFSA Journal.* **2007**, 447: 1-51.
62. German Federal Health Bureau. Bundesanzeiger. Dtsch. Apoth. Ztg. **1992**, 132: 1406-1408.
63. Van Engelen J.G.M., van Egmond H.P., Speijers G.J.A. Pyrrolizidine Alkaloiden (Pyrrolizidine Alkaloids); Centrum voor Stoffen en Risicobeoordeling (Centre for Substances and Risk Assessment), CSR rapport 05666A00. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (National Institute of Public Health and the Environment): The Netherlands, **1997**.

64. F.S.A.N.Z. Food Standards Australia New Zealand. Pyrrolizidine alkaloids in food: A toxicological reView and risk assessment; *Technical Report Series n. 2*. **2001**, <http://www.foodstandards.gov.au/mediareleasespublications/technicalreportseries/index.cfm>.
65. Prakash A.S., Pereira T.N., Reilly P.E.B., Seawright A.A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research*. **1999**, 443:53–67.
66. Boppre M., Colegate S.M., Edgar J.A. Pyrrolizidine Alkaloids of *Echium vulgare* Honey Found in Pure Pollen. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53: 594-600.
67. Chou M.W., Wang Y.-P. Yan J., Yang, Y.-C., Beger R.D., Williams L.D., Doerge D. R., Fu P.P. Riddelliine N-oxide is a phytochemical and mammalian metabolite with genotoxic activity that is comparable to the parent pyrrolizidine alkaloid riddelliine. *Toxicol. Lett.* **2003**, 145: 239-247.
68. Alali F.Q., Tahboub Y.R., Eyad, Ibrahim S., Qandil A.M., Tawaha K., Burgess J.P., Sy A., Nakanishi Y., Kroll D.J., Oberlies N.H. Pyrrolizidine alkaloids from *Echium glomeratum* (Boraginaceae). *Phytochemistry*. **2008**, 69(12): 2341-2346.
69. De Stefano I., Raspaglio G., Zannoni G.F., Travaglia D., Prisco M.G., Mosca M., Ferlini C., Scambia G., Gallo D. Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochemical Pharmacology* **2009**, 78: 1374–1381.
70. Park H., Bergeron E., Senta H., Guillemette K., Beauvais S., Blouin R., Sirois J., Faucheux N. Sanguinarine induces apoptosis of human osteosarcoma cells through the extrinsic and intrinsic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 399(3): 446-51
71. Janovská M., Kubala M., Simanek V., Ulrichová J. Fluorescence of sanguinarine: spectral changes on interaction with amino acids *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 395(1): 235-240.
72. Ansari K.M., Dhawan A., Khanna S.K., Das M. In vivo DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. *Food and Chemical Toxicology* **2005**, 43:147–153.
73. Betteridge K, Cao Y., Colegate S.M. Improved Method for Extraction and LC-MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids and Their N-Oxides in Honey: Application to *Echium vulgare* Honeys. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53: 1894-1902.
74. Demianowicz S. La Secretion du Nectar et le Rendement en Miel des Plus Important Plantes Mellifères en Pologne; XIX Congrès d'Apimondia: Prague, Czech Republic. **1963**, p 180-183.
75. Cosentino S., Tuberoso C., Meloni V., Cherchi A., Mulargia A.F., Porcu M., Palmas F. Valorizzazione dei mieli tipici sardi: aspetti microbiologici, botanici e fisico-chimici. *La rivista di Scienza dell'Alimentazione*. **1994**, 2: 199-207.
76. Cherchi A., Porcu M., Spanedda L., Tuberoso C., Cosentino S., Palmas F. Individuazione di parametri utili per la caratterizzazione e la valorizzazione di mieli tipici della Sardegna: asfodelo, cardo e corbezzolo. *La rivista di Scienza dell'Alimentazione*. **1995**, 4: 523-533.
77. MacDougall D.B. The chemistry of colour and appearance. *Food Chemistry*. **1986**, 21(4): 283-299.

78. Tuberoso C.I.G.; Bifulco E., Jerkovic' I., Caboni P., Cabras P., Floris I. Methyl syringate: a chemical marker of asphodel (*Asphodelus microcarpus* Salzm. et Viv.) monofloral honey. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57: 3895–3900.
79. Tuberoso C.I.G., Bifulco E., Caboni P., Cottiglia F., Cabras P., Floris I. Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58: 384-389.
80. Tuberoso C.I.G., Bifulco E., Caboni P., Sarais G., Cottiglia F., Floris I. Lumichrome and Phenyllactic Acid as Chemical Markers of Thistle (*Galactites tomentosa* Moench) Honey. *J. Agric. Food Chem.* **In press** (DOI: 10.1021/jf1039074).
81. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant” power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry.* **1996**, 239, 70–76.
82. Music I., Modun D., Katalinic V., Salamunic I., Kozina B., Boban M. Effects of four-weeks moderate drinking of red wine and ethanol on the rat isolated heart and aortic rings reactivity during ischemia and hypoxia. *Periodicum Biologorum.* **2005**, 107(2): 165-173.
83. Brizic I., Modun D., Vukovic J., Budimir D., Katalinic V., Boban M.J. Differences in vasodilatory response to red wine in rat and guinea pig aorta. *Cardiovasc. Pharmacol.* **2009**, 53(2):116-20.
84. Kim S.K., Nawar W.W. Parameters influencing cholesterol oxidation. *Lipids.* **1993**, 28: 917-922.
85. Rosa A., Deiana M., Atzeri A., Corona G., Incani A., Melis M.P., et al. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated alpha-pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions.* **2007**, 165: 117-126.
86. Bradford M. Rapid and sensitive method for quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **1976**, 72: 248-254
87. Rosa A., Melis M. P., Deiana M., Atzeri A., Appendino G., Corona G., et al. Protective effect of the oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* on cholesterol and human low density lipoprotein oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids.* **2008** 155: 16-23.
88. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animals tissues. *Journal of Biological Chemistry.* **1957**, 226: 497-509.
89. Commission Decision 2002/657/EC. 12/08/2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results
90. Floris I., Satta A., Ruju L. Honeys of Sardinia (Italy). *Journal of Apicultural Reserch and Bee World.* **2007**, 46(3): 194-204.
91. Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51: 2866–2887.
92. Spencer P.A., Tanaka A., Towers G.H.N. An Agrobacterium signal compound from grapevine cultivars. *Phytochemistry.* **1990**, 29: 3785–3788.
93. D’Abrosca B., Della Greca M., Fiorentino A., Monaco P., Zarrelli A. Low molecular weight phenols from the bioactive aqueous fraction of *Cestrum Parqui*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52: 4101–4108.

94. Leu Y.L., Wang Y.L., Huang S.C., Shi L.S. Chemical constituent from roots of *Taraxacum formosanum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53: 853–855.
95. Joerg E., Sontag G. Multichannel coulometric detection coupled with liquid chromatography for determination of phenolic esters in honey. *J. Chromatogr. A.* **1993**, 635: 137–142.
96. Tan S.T., Wilkins A.L., Holland P.T., McGhie T.K. Extractives from New Zealand honeys. 3. Unifloral thyme and willow honey constituents. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38: 1833–1838.
97. Weston R.J., Mitchell K.R., Allen K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand Manuka honey. *Food Chem.* **1999**, 64: 295–301.
98. Russell K.M., Molan, P.C., Wilkins A.L., Holland P.T. Identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38: 10–13.
99. Inoue K., Murayama S., Seshimo F., Takeba K., Yoshimura Y., Nakazawa H. Identification of phenolic compound in Manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, 85: 872–878.
100. D'Arcy B.R., Rintoul G.B., Rowland C.Y., Blackman A.J. Composition of Australian honey extractives. 1. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) honeys. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45: 1834–1843.
101. Yao L., Datta N., Tomas-Barberan F.A., Ferreres F., Martos I., Singanusong R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Loptospermum* honeys. *Food Chem.* **2003**, 81: 159–168.
102. Yaa L., Jiang Y., Singanusong R., Datta N., Raymont K. Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Heliantus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Res. Int.* **2005**, 38: 651–658.
103. Dimitrova B., Gevrenova R., Anklam E. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* **2007**, 18: 24–32.
104. Wang X.H., Gheldof N., Engeseth N.J. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *J. Food Sci.* **2004**, 69: 96–101.
105. Jung H., Xu F., Li K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30: 161–168.
106. Kulys J., Krikstopaitis K., Ziemys A., Schneider P. Laccasecatalyzed oxidation of syringates in presence of albumins. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 18: 99–108.
107. Fujimatu E., Ishikawa T., Kitajima J. Aromatic compound glucosides, alkyl glucoside and glucide from the fruit of anise. *Phytochemistry.* **2003**, 63: 609–616.
108. Hegedus Z.L., Nayak U. Homogentisic acid and structurally related compounds as intermediates in plasma soluble melanin formation and in tissue toxicities. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **1994**, 102(3): 175–81.

109. Phornphutkul C., Introne W., Perry M.B, I. Bernardini, M.D. Murphey, D. L Fitzpatrick, Anderson P.D., M. Huizing, Anikster Y., Gerber L.H, Gahl, W.A. Natural history of alkaptonuria. *N. Engl. J. Med.* **2002**, 347: 2111-21.
110. Abdulrazzaq Y.M., Ibrahim A., I Al-Khayat A., Nagelkerke N., R Ali B. R58fs Mutation in the *HGD* Gene in a Family with Alkaptonuria in the UAE. *Annals of Human Genetics.* **2009**, 73: 125–130.
111. Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13: 135–160.
112. Urios A., L´Opez-Gresa M.P., Gonz´Alez M.C., Primo J., Mart´Inez A., Herrera G., Escudero J. C., O´connor J.-E., Blanco M. Nitric Oxide Promotes Strong Cytotoxicity Of Phenolic Compounds Against *Escherichia Coli*: The Influence Of Antioxidant Defenses. *Free Radical Biology & Medicine.* **2003**, 35 (11): 1373–1381.
113. Carreira A., Ferreira L.M., Loureiro V. Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67: 3463–3468.
114. Whistance G.R., Thuball D.R. Biosynthesis of Phytoquinones: Utilization of Homogentisic Acid by Maize Shoots for the Biosynthesis of Plastoquinone. *Biochem. J.* **1968**, 109: 482.
115. Xiong L., Zhu J.K. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* **2003**, 133: 29–36.
116. Yao L., Jiang Y., Singanusong R., Datta N., Raymont K. Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chem.* **2004**, 86: 169–177.
117. Ferreres F., Andrade P., Tomas-Barberan F.A. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44: 2053–2056.
118. Truchado P., Ferreres F., Bortolotti L., Sabatini A.G., Tomas-Barberan F.A. Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56: 8815–8824.
119. Tomás-Barberán, F. A.; Martos, I.; Ferreres, F.; Radovic, B.S.; Anklam, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J. Sci. Food Agr.* **2001**, 81: 458-496.
120. Ding Z.G., Zhao J.Y., Yang P.W., Li M.G., Huang R., Cui X.L., Wen M.L. ¹H and ¹³C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp.nov (YIM 30243^T). *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47: 366–370.
121. Tsukamoto S., Kato H., Hirota H., Fusetani N.. Lumichrome. A larval metamorphosis-inducing substance in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Eur. J.Biochem.* **1999**,264: 785-789.
122. Phillips D.A., Joseph C.M., Yang G.P., Martínez-Romero E., Sanborn J.R., Volpin H. Identification of lumichrome as a Sinorhizobium enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *PNAS.* **1999**, 96(22): 12275-12280.
123. Prukąła D., Prukąła W., Koczorowski R., Khmelinskii I.V., Sikorska E., Sikorski M. Electron ionisation and electrospray ionisation mass spectrometric study of a series of isomeric methyl-,dimethyl- and trimethylalloxazines. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22: 409-416.

124. Ball, G. F. M. *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2006; pp 167-168. Grininger M., Zeth K., Oesterhelt D. Dodecins: A family of lumichrome binding proteins. *J. Mol. Biol.* **2006**, 357: 842–857.
125. Grininger M., Staudt H., Johansson P., Wachtveitl J., Oesterhelt D. Dodecin is the key player in flavin homeostasis of Archaea. *Journal Biological Chem.* **2009**, 284: 13068-13076.
126. Huang R., Kim H.J., Min D.B. Photosensitizing effect of riboflavin, lumiflavin and Lumichrome on the generation of volatiles in soy milk. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54: 2359-2364.
127. Joshi P.C., Ultraviolet radiation-induced photodegradation and $^1\text{O}_2$, O_2^- production by riboflavin, lumichrome and lumiflavin, *Indian J. Biochem. Biophys.* **1989**, 26: 186–189.
128. Yang C.S., McCormick D.B. Substrate specificità of riboflavin hydrolase from *Pseudomonas riboflavina*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology.* **1967**, 32: 511-513.
129. Yanagita T., Foster J.W. A bacterial riboflavin Hydrolase. *J. Biol. Chem.* **1956**, 221: 593-607.
130. Matiru V.N., Dakora F.D. The rhizosphere signal molecule lumichrome alters seedling development in both legumes and cereals. *New Phytol.* **2005**, 166: 439-444.
131. Matiru V.N., Dakora F.D. Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alters root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals. *New Phytol.* **2005**, 165: 847-855.
132. Joseph C.M., Phillips D.A. Metabolites from soil bacteria affect plant water relations. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, 41: 189-192.
133. Khan W., Prithiviraj B., Smith D.L. Nod factor [Nod Bj V (C18:1, MeFuc)] and lumichrome enhance photosynthesis and growth of corn and soybean. *J. Plant Physiol.* **2008**, 165: 1342-1351.
134. Almaraz J.J., Zhou X., Souleimanov A., Smith D. Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. *J Plant Physiol.* **2007**, 164: 1391-1393.
135. Said H.M, Ortiz A., Ma T.Y., McCloud E. Riboflavin uptake by the human-derived liver cells hep g2: mechanism and regulation. *Journal of Cellular Physiology.* **1998**, 76: 588-594.
136. Kumar C.K., Yanagawa N., Ortiz A., Said H.M. Mechanism and regulation of riboflavin uptake by human renal proximal tubule epithelial cell line HK-2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **1998**, 274: F104-F110.
137. Said H.M., Ortiz A., Moyer M.P., Yanagawa N. Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2000**, 278: 270-276.
138. McCormick D.B. **2003**. In Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (2nd Eds). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. New York: Academic Press., p. 4989-4995.
139. Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Maffei Facino R., Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of

- spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. **2005**, 533: 185–191.
140. Alén-Ruiz F., García-Falcón M.S., Pérez-Lamela M.C., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*. **2009**, 113: 53–60.
 141. Mudnic I., Modun D., Rastija V., Vukovic J., Brizic I., Katalinic V., Kozina B., Medic-Saric M., Boban M. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*. **2010**, 119(3): 1205-1210.
 142. Gey K.F. Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of atherosclerosis: threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. *J. Nutr.Biochem*. **1995**, 6: 206-236.
 143. Antony S.M., Han I.Y., Rieck J.R., Dawson P.L. Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. *J.A.F.C.* **2000**, 48(2): 3985-3989.
 144. Vacca V., Agabbio M., Fenu, P. La caffeina nei fiori del genere *Citrus*: relazioni con la presenza di alcaloidi riscontrata nel miele di agrumi. *Industrie Alimentari*. **1997**, 36: 611-613.
 145. Donarski J.A., Jones S.A., Harrison M., Driffield M., Charlton A.J.. Identification of botanical biomarkers found in Corsican honey. *Food Chemistry*. **2010**, 118: 987–994.
 146. Truchado P., Ferreres F., Bortolotti L., Sabatini A.G., Tomás-Barberán F.A. Kynurenic acid and related compounds are markers of the floral origin of chestnut honey. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57(13): 5680-5686.
 147. Beretta G., Caneva E., Regazzoni L., Bakhtyari N.G., Maffei Facino R. A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Anal. Chim. Acta*. **2008**, 620: 176-82.