



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE GEOLOGICHE, BIOLOGICHE E AMBIENTALI**

Coordinatore: Prof.ssa Agata Di Stefano

CLAUDIA GENOVESE

**Caratterizzazione di metaboliti biologicamente attivi
presenti nel miele di cardo prodotto da popolazioni
siciliane di *Apis mellifera***

Tutor : Prof. Salvatore A. Raccuia

XXX CICLO

AA.AA. 2014-2017

SOMMARIO

Riassunto	4
Abstract	7
Introduzione	10
1. Il Cardo	10
1.1 Origine e caratteristiche botaniche.....	10
1.2 Ciclo biologico	12
1.3 Usi.....	13
1.3.1 Alimentazione.....	14
1.3.2 Produzione di energia.....	14
1.3.3 Chimica verde	15
1.3.4 Produzione di pasta di cellulosa.....	16
1.3.5 Produzione di olio dalla granella	16
1.3.6 Produzione di farine proteiche	16
1.3.7 Produzione di oligo e polisaccaridi della famiglia dei fruttani.....	17
1.3.8 Fitodepurazione dei suoli inquinati	17
1.4 Proprietà salutistiche.....	18
2. Metaboliti biologicamente attivi	20
2.1 Isoprenoidi	21
2.2 Alcaloidi	22
2.3 Polifenoli	22
2.3.1 Acidi fenolici	25
2.3.2 Flavonoidi.....	25
2.3.3 Tannini	27
2.3.4 Stilbeni	27
2.4 Metaboliti bioattivi del cardo	28
3. Il miele	33
3.1 Composizione e caratteristiche nutraceutiche	36
3.1.1 Carboidrati	36
3.1.2 Acqua.....	38
3.1.3 Enzimi, acidi organici e composti azotati.....	38
3.1.4 Vitamine, minerali e composti in tracce	40
3.1.5 Sostanze volatili e polifenoli.....	41
3.1.6 Altre sostanze	41
3.2 Proprietà salutistiche.....	42
3.2.1 Attività antimicrobica e antibatterica.....	45
3.2.2 Proprietà antiossidanti	46
3.2.3 Attività anti-infiammatoria	46
3.3 Miele di cardo	47
4. Le api (<i>Apis mellifera</i>)	48
4.1 Bioindicatori di contaminazione ambientale	50
Scopo del lavoro	51
Parte Sperimentale	52
Materiali e metodi	53
1. Materiale vegetale	53
2. Miele	55
3. Reagenti e standard	57
4. Preparazione del campione	58
4.1 Foglie di cardo.....	58
4.2 Polline di cardo.....	58

4.3 Miele.....	58
5. Analisi.....	60
5.1 Contenuto di Fenoli Totali	60
5.2 Contenuto di Flavonoidi Totali.....	60
5.3 Analisi HPLC con UV/Vis a 4λ	61
5.4 pH	63
5.5 Minerali.....	63
5.6 Carboidrati	64
5.7 Attività antiossidante	65
5.7.1 Saggio DPPH.....	65
5.7.2 Saggio ABTS.....	67
5.7.3 Saggio FRAP	68
Analisi statistica	68
Risultati e discussione	69
1. PROVA A.....	69
I PARTE	69
➤ Contenuto di Fenoli e Flavonoidi Totali.....	69
➤ Analisi dei composti fenolici mediante HPLC-UV/Vis	70
II PARTE.....	75
➤ pH	75
➤ Minerali.....	76
➤ Carboidrati.....	78
➤ Contenuto di Fenoli Totali	81
➤ Contenuto di Flavonoidi Totali.....	82
➤ Analisi dei composti fenolici mediante HPLC-UV/Vis	82
➤ Attività antiossidante	85
DPPH.....	85
FRAP	86
ABTS.....	86
➤ Correlazione tra i parametri osservati.....	88
2. PROVA B.....	89
➤ Fenoli Totali.....	89
➤ Flavonoidi Totali.....	91
➤ Attività antiossidante	92
DPPH.....	92
FRAP	93
ABTS.....	94
➤ Correlazione tra i parametri osservati.....	96
Conclusioni	97
Bibliografia	98

Caratterizzazione di metaboliti biologicamente attivi presenti nel miele di cardo prodotto da popolazioni siciliane di *Apis mellifera*

Riassunto

Negli ultimi anni la nutraceutica, neologismo sincretico da "nutrizione" e "farmaceutica" coniato da Stephen De Felice nel 1989, ha suscitato un notevole interesse per gli effetti benefici che alcuni nutrienti contenuti negli alimenti hanno sulla salute, sulla prevenzione e il trattamento delle malattie. La maggior parte dei nutraceutici ha origine nel mondo vegetale, trovandosi nella frutta e nella verdura.

Tra i vegetali tipici dell'ambiente mediterraneo il Carciofo e il meno conosciuto Cardo rappresentano un serbatoio naturale di composti biologicamente attivi, tra cui acidi mono- e dicaffeilchinici e flavonoidi, che rappresentano la frazione più abbondante. Le proprietà medicamentose degli estratti ottenibili da queste specie, note sin dall'antichità, sono ancor oggi assai diffuse nella medicina popolare. Agli estratti di questi ortaggi sono stati riconosciuti effetti antimicrobici, antiossidanti, anti-HIV (acido 1,3-dicaffeilchinico), epatoprotettivi e coleretici, così come l'abilità di inibire il colesterolo LDL. Inoltre durante la fioritura del cardo in alcune aree della Sicilia e della Sardegna, si produce un miele caratteristico.

Anche il miele, prezioso alimento prodotto dalle api sulla base di sostanze zuccherine che esse raccolgono in natura, ha un alto valore nutraceutico per le sue proprietà antiossidanti e antibatteriche. Nel miele i principali responsabili dell'attività antiossidante sono i composti fenolici, di cui i più importanti sono gli acidi fenolici e i flavonoidi. La composizione del miele è alquanto variabile e dipende da numerosi fattori: origine botanica e geografica, natura del suolo, andamento climatico e specie di api che lo producono.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di determinare e quantificare il passaggio dei principali metaboliti biologicamente attivi presenti in foglie e polline di *Cynara cardunculus* L. var. *altilis*, al miele da esso ottenuto in purezza, in condizioni controllate mediante l'utilizzo di due genotipi di ape (ligustica e sicula). È stata valutata sia l'influenza dell'origine (miele di cardo prodotto in purezza e commerciale) che del genotipo di ape, sui principali parametri di qualità e di caratterizzazione del miele.

Inoltre, considerate le poche conoscenze che ad oggi si hanno sulle caratteristiche del miele di ape sicula e il crescente interesse per il miele prodotto da questo genotipo di ape, sono state

valutate alcune caratteristiche di qualità tra cui il contenuto fenolico totale e la capacità antiossidante, ponendo a confronto mieli commerciali di varia origine botanica prodotti nella stessa zona geografica (Sicilia) da ape sicula (*Apis mellifera* ssp. *sicula*) e ape ligustica (*Apis mellifera* ssp. *ligustica*).

Sui 2 mieli di cardo prodotti in purezza nell'ambito di questo progetto di ricerca e su 6 mieli commerciali siciliani aventi la stessa origine botanica, prodotti da ape sicula e ligustica, sono state condotte analisi di caratterizzazione: pH, zuccheri (fruttosio, glucosio e saccarosio mediante HPAEC-PAD), minerali (Na, K, Mg e Ca mediante IC), fenoli e flavonoidi totali, composizione fenolica (analisi di 3 acidi fenolici e 7 flavonoidi mediante HPLC-UV/Vis) e capacità ossidante (mediante i saggi DPPH, FRAP e ABTS). Inoltre su 19 campioni di miele commerciale siciliano di differente origine botanica (cardo, castagno, eucalipto, sulla, arancio, ferula e millefiori), prodotti da ape sicula e ligustica, è stata valutata l'influenza dell'ape sul contenuto di fenoli e flavonoidi totali e sulla capacità antiossidante del miele (mediante i saggi DPPH, FRAP e ABTS) ed è stata determinata la correlazione tra i parametri analizzati.

I risultati ottenuti hanno mostrato che vi è trasferimento di molecole biologicamente attive dalla pianta di cardo al miele da essa ottenuto e che questo è influenzato dal genotipo di ape, con il miele di ape sicula che presenta un incremento del 195% rispetto a quello di ligustica. Nella media dei fattori studiati, i composti maggiormente presenti sono risultati l'acido clorogenico (2,41 mg 100 g⁻¹) e l'apigenin-7-O-glucuronide (2,39 mg 100 g⁻¹), che conferiscono al miele un'elevata capacità antiossidante. Inoltre, confrontando i mieli di cardo prodotti in purezza in condizioni omogenee e quelli commerciali dai due genotipi di ape, è emerso che la loro composizione risulta influenzata sia dall'origine (miele di cardo in purezza e commerciale) che dal genotipo di ape. In particolare l'ape sicula, nella media dell'origine, ha determinato un aumento significativo di diverse caratteristiche di qualità del miele rispetto alla ligustica, tra cui: il contenuto minerale, con un incremento del 53%, il contenuto di fenoli e flavonoidi totali, con incrementi rispettivamente del 122% e 76%, la capacità antiossidante (sia riducente che radical scavenger) con un incremento pari a 439%. Per quel che concerne l'influenza dell'origine, nella media del genotipo di ape impiegata, alcune caratteristiche di qualità del miele di cardo prodotto in purezza, hanno presentato incrementi significativi rispetto a quelle dei mieli commerciali; in particolare, i contenuti di fenoli e flavonoidi totali hanno mostrato incrementi rispettivamente del 99% e 47% e la capacità antiossidante (sia potere riducente, che capacità di scavenger radicale) un incremento del 284%.

Il contenuto di carboidrati presenti nel miele, pari nella media di tutti i fattori studiati a 77,40 mg 100 g⁻¹, è risultato influenzato in maniera trascurabile sia dall'origine che dal genotipo di ape (con variazioni del 3-4%). Il rapporto tra fruttosio e glucosio pari a 1,06, determina un'elevata tendenza di questo miele a cristallizzare.

Per quel che concerne le caratteristiche di qualità dei mieli commerciali siciliani di differente origine floreale (cardo, castagno, eucalipto, sulla, arancio, ferula e millefiori), prodotti da ape sicula e ligustica, queste sono state influenzate in maniera significativa oltre che, come era logico attendersi, dall'origine anche dal genotipo di ape. In particolare i mieli prodotti da ape sicula hanno presentato incrementi sia del contenuto di fenoli e flavonoidi totali, con valori del 71% e 51%, che del potere riducente (FRAP) e di scavenger radicale (DPPH e ABTS) del miele, con incrementi rispettivamente del 87% e 80%. La correlazione tra tutti i parametri analizzati è risultata statisticamente significativa ($p < 0,05$).

In conclusione i risultati sperimentali hanno evidenziato che il miele di cardo possiede un alto valore nutraceutico, soprattutto se prodotto in purezza, e che l'ape nera sicula influenza significativamente la composizione del miele, producendo mieli di qualità superiore e con una maggiore capacità antiossidante rispetto all'ape ligustica.

Characterization of biologically active metabolites in cardoon honey produced by Sicilian populations of *Apis mellifera*

Abstract

Over the last years, nutraceutical, syncretic neologism from "nutrition" and "pharmaceutical" coined by Stephen De Felice in 1989, has aroused considerable interest for the beneficial effects that some nutrients contained in food have on health, on the prevention and the treatment of illnesses. Most of the nutraceuticals originate in the realm of plants, since they are present in both fruits and vegetables.

Among the typical vegetables of the Mediterranean environment, the artichoke and the lesser-known cardoon are a natural reservoir of biologically active compounds, including mono- and dicaffeilchinic acids and flavonoids, which represent the dominant fraction. The medicinal properties of the extracts obtained from these species, known since the ancient times, are still very widespread in popular medicine. Antimicrobial, antioxidant, anti-HIV (1,3-dicaffeoylquinic acid), hepatoprotective and choleric effects have been attributed to the extracts of these vegetables as well as the ability to inhibit LDL cholesterol. Moreover, during the flowering season of the cardoon, a characteristic honey is produced in some areas of Sicily and Sardinia. Even honey, precious food produced by honeybees on the basis of sugary substances that they collect in nature, has a high nutraceutical value for its antioxidant and antibacterial properties. In honey, the main substances responsible for the antioxidant activity are the phenolic compounds, the most important of which are the phenolic acids and the flavonoids. The honey composition is quite variable and depends on numerous factors: on the botanical and geographical origin, on the quality of the soil, on climatic trends and species of honeybees that produce the honey.

The purpose of this work was to determine and quantify the transfer of the main biologically active metabolites present in the leaves and pollen of *Cynara cardunculus* L. var. *atilis* to honey obtained in varietal purity, under controlled conditions through the use of two bee genotypes (*ligustica* and *sicula*). Both the influence of the origin (cardoon honey produced in varietal purity and produced commercially) and the bee genotype, were evaluated on the main quality parameters and characterization of honey.

Moreover, considering the little knowledge that we have about the characteristics of the Sicilian black honeybee today and the growing interest in honey produced by this honeybee genotype, some qualitative features have been evaluated including the total phenolic content and the antioxidant capacity. This was done by comparing commercial honeys of various botanical origins produced in the same geographical area (Sicily) from the Sicilian black honeybee (*Apis mellifera* ssp. *sicula*) and the ligustica honeybee (*Apis mellifera* ssp. *ligustica*).

On the 2 cardoon honeys produced in varietal purity for this work and on 6 Sicilian commercial honeys with the same botanical origin, produced by Sicilian black and ligustica honeybee, the following characterization analyses were carried out: pH, sugars (fructose, glucose and saccharose by HPAEC-PAD), minerals (Na, K, Mg and Ca by IC), total phenols and flavonoids, phenolic composition (analysis of 3 phenolic acids and 7 flavonoids by HPLC-UV/Vis) and antioxidant capacity (using the DPPH, FRAP and ABTS tests).

Furthermore by 19 samples of Sicilian commercial honey of different botanical origin (cardoon, chestnut, eucalyptus, sulla, orange, ferula and polyfloral), produced by Sicilian black and ligustica honeybee, the influence of the bee on the total phenol and flavonoid content and antioxidant capacity of honey was evaluated (using the DPPH, FRAP and ABTS tests) and the correlation between the analyzed parameters was determined.

The results showed the transfer of bioactive molecules from the cardoon plant to the honey obtained from it and the influence of honeybee genotype. The honey of the Sicilian black bee showed a 195% increase compared to the honey of the honey of the ligustica honeybee.

In the average of the factors studied, the most present compounds were chlorogenic acid (2,41 mg 100 g⁻¹) and apigenin-7-O-glucuronide (2,39 mg 100 g⁻¹), which confer to the honey a high antioxidant capacity. And yet, by comparing the honeys of cardoon produced in varietal purity in homogeneous conditions and the commercial ones by the two honeybee genotypes, it showed that their composition is influenced by the origin (pure cardoon honey and commercial honey) as well as the honeybee genotype.

In particular, the Sicilian black honeybee, in the average of the origin, has led to a significant increase of several qualities of the obtained honey when compared to the ligustica, such as: the mineral content, with an increase of 53%, the total phenol and flavonoid content, with increases of 122% and 76% respectively, the antioxidant capacity (both reducing and radical scavenger) with an increase of 439%.

Regarding the influence of the origin, in the average of the honeybee genotype employed, some qualitative aspects of pure-cardoon-honey, showed significant increases compared to those of commercial honeys; in particular, the total phenol and flavonoid contents showed increases of 99% and 47% respectively and the antioxidant capacity (both reducing power and radical scavenger capacity) increased by 284%.

The carbohydrate content in the honey, in the average of all the analysed factors at 77,40 mg 100 g⁻¹, was negligibly influenced by both the origin and the honeybee genotype (with variations of 3-4%). The ratio between fructose and glucose equal to 1,06, shows a higher tendency of this honey to crystallization.

Regarding the qualitative characteristics of Sicilian commercial honeys of different botanical origins (cardoon, chestnut, eucalyptus, sulla, orange, ferula and pluryfloral), produced by the Sicilian black and ligustica honeybee, these have been significantly influenced, as expected, by the origin and also by the honeybee genotype.

In particular, honey produced by the Sicilian black bee showed increases both in the total phenol and flavonoid content, with values of 71% and 51%, and in the reducing power (FRAP) and in the radical scavenger (DPPH and ABTS) of honey, with increases 87% and 80% respectively. The correlation between all the parameters analyzed was statistically significant ($p < 0,05$).

In conclusion, the experimental results have shown that cardoon honey has a high nutraceutical value, especially if produced in varietal purity, and that the Sicilian black honeybee significantly influences the honey composition, producing honeys of better quality with a greater antioxidant capacity compared to the ligustica honeybee.

Introduzione

1. Il Cardo

1.1 Origine e caratteristiche botaniche

Il cardo appartiene alla specie *Cynara cardunculus* L., famiglia *Asteraceae*, sottofamiglia *Tubuliflorae*, genere *Cynara*. Originaria del bacino del Mediterraneo questa specie cresce spontaneamente in regioni aride, ad alte temperature, elevata salinità e siccità.

Il genere *Cynara* comprende numerose specie selvatiche diffuse nell'area del Mediterraneo e del Medio Oriente; la specie più diffusa è *C. cardunculus* a cui appartengono carciofi e cardi, sia selvatici che domestici.

Studi molecolari basati sulle analogie del DNA, indicano che sia il carciofo che il cardo domestico derivano dal cardo selvatico, ovvero, le analogie genetiche fra i membri appartenenti alla specie *C. cardunculus* sono molto più numerose rispetto alle altre specie appartenenti al genere *Cynara*.

L'antenato dell'attuale cardo selvatico, terminata l'ultima glaciazione circa 12000 anni fa, migrò dall'entroterra africano fino alle coste mediterranee, espandendosi poi lungo l'asse est-ovest. La distanza e l'isolamento geografico furono la spinta evolutiva che determinò la differenziazione delle attuali specie del genere *Cynara*.

Cynara cardunculus L. è una specie a cui appartengono una sottospecie, il *C. cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hegi = *C. cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek (carciofo) e due varietà botaniche, il *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* Lam. (cardo selvatico) e il *C. cardunculus* L. *altilis* DC. (cardo domestico) (Foto 1).

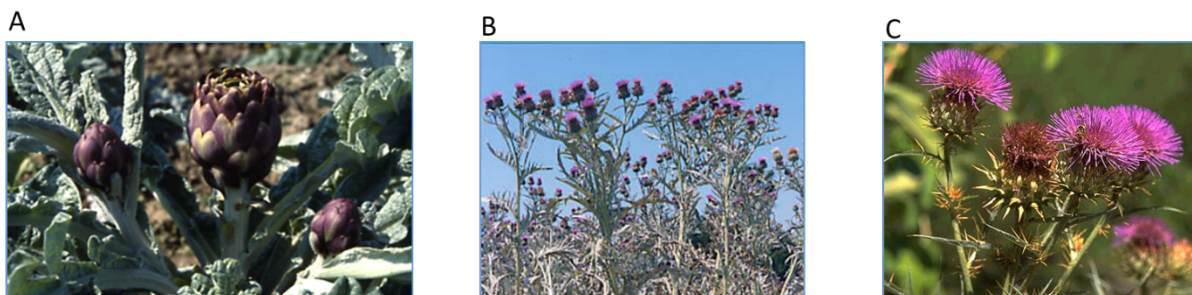


Foto 1 - Sottospecie di cardo: *C. cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hegi. (carciofo) (A), *C. cardunculus* L. var. *altilis* DC. (cardo domestico) (B), *C. cardunculus* L. var. *sylvestris* Lam. (cardo selvatico) (C)

Studi recenti, sulle caratteristiche morfologiche, biologiche e produttive e sulla variabilità intraspecifica per la germinazione dei semi sotto stress sale e umidità delle popolazioni siciliane hanno rivelato una variabilità tra le popolazioni (Raccuia *et al.*, 2004a). Il cardo selvatico è completamente compatibile e interfertile con il carciofo e con il cardo coltivato e può essere usato per migliorare il pool genetico di carciofo (Basnizki e Zohary, 1994; Rottenberg e Zohary; 1996; Raccuia *et al.*, 2004b).

Il cardo è una specie erbacea nitrofila perenne in natura, la cui altezza varia da un minimo di 40 cm nella varietà *sylvestris*, ad oltre 300 cm in alcune varietà di cardo domestico. La pianta è costituita da un grosso fusto rizomatoso, noto con il nome di ceppaia, da cui dipartono le radici laterali che, pur essendo poco numerose, sono piuttosto robuste (con diametro oltre i 2 cm). L'apparato radicale può svilupparsi nel terreno ben oltre il metro. Le foglie sono portate su internodi molto ravvicinati in particolare nella parte basale del fusto. Sono pennatosette, di dimensioni, peso e numero variabili in rapporto al genotipo, e presentano un tipico colore verde cenerino o talvolta grigiastro nella pagina superiore, con sfumature più o meno chiare per la presenza di peluria. Le lamine delle foglie appaiono più o meno frastagliate a seconda del genotipo e possono presentare delle spine di colore chiaro grigio- biancastro. La spinosità delle foglie è un carattere sempre presente in *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*. Le foglie possono raggiungere una lunghezza superiore al metro. I piccioli detti coste o costolature appaiono larghi, carnosi, di colore grigio-verdastro alla base e larghi fino a 10 cm. Il fusto o asse florale appare eretto, ramificato, robusto, striato in senso longitudinale e fornito di foglie alterne. L'asse principale e le sue ramificazioni (di primo, secondo e terzo ordine) presentano infiorescenze nelle parti terminali. I fiori del cardo appaiono spesso di colore violetto-azzurro o bianco e sono ermafroditi, tubulosi, riuniti in una infiorescenza a capolino che prende il nome di calatide. La calatide si presenta di forma conica, di modeste dimensioni (3-5 cm), e comprende una parte basale detta ricettacolo carnoso sulla quale sono inseriti i fiori ermafroditi (circa 300-400) e, inframmezzati a questi, sono presenti sul talamo numerose setole bianche e traslucide che costituiscono il cosiddetto "pappo". Sul ricettacolo si inseriscono le brattee o squame involucri, che presentano delle spine all'apice, caratteristica tipica delle varianti selvatiche. Il frutto è un achenio tetragono-costato, di colore grigiastro scuro e screziato, unito al calice trasformato in pappo, per favorire la disseminazione anemocora. La fecondazione solitamente è favorita dagli insetti pronubi che assicurano una buona percentuale di fecondazione incrociata.



Foto 2 - Infiorescenza di cardo domestico

Il cardo è una pianta rustica, adattata a vivere in ambiente mediterraneo e quindi capace di sopportare apporti idrici limitati e irregolarmente distribuiti nell'arco dell'anno. Predilige terreni fertili, freschi e profondi, di medio impasto e senza ristagni idrici, tendenzialmente neutri, e presenta una buona tolleranza alla salinità. Come esigenze termiche, la temperatura media ottimale si aggira tra i 10 e i 15 C° ed è sensibile alle basse temperature: arresta la crescita a 0°C e può andare incontro a morte al di sotto dei -2°C. L'esposizione deve essere soleggiata.

1.2 Ciclo biologico

Il cardo si adatta perfettamente all'ambiente pedo-climatico tipico dei paesi del bacino del mediterraneo perché grazie al suo ciclo biologico, che va dall'autunno alla primavera, periodo in cui si registrano i maggiori eventi piovosi, è in grado di intercettare tutti gli apporti idrici naturali disponibili. Inoltre l'apparato radicale fungendo anche da organo di accumulo di sostanze di riserva, consente la riattivazione vegetativa dopo la quiescenza estiva (Raccuia e Melilli, 2010; Raccuia e Melilli, 2011; Raccuia *et al.*, 2013). La semina diretta viene effettuata tra settembre e novembre in modo tale che le piante si trovino già in fase di rosetta quando le temperature cominciano a scendere e si verificano le prime gelate. Ogni anno la biomassa aerea viene raccolta in primavera o in estate a seconda dell'utilizzo che si è scelto di farne (alimentare o energetico). Successivamente le parti aeree muoiono e le piante rimangono in stato di riposo vegetativo fino alla successiva stagione di crescita (Fig. 1).

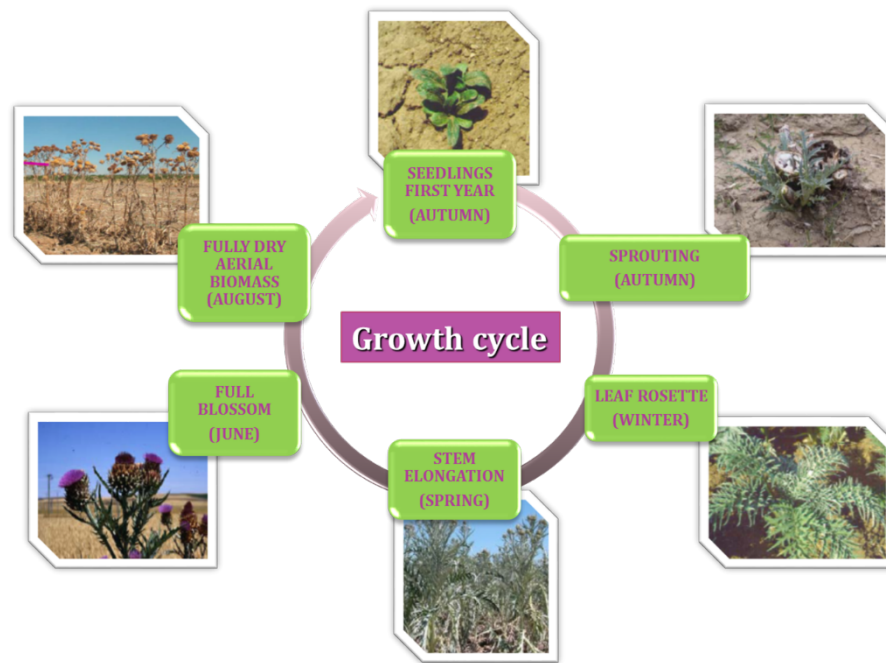


Fig. 1 - Ciclo biologico del cardo

Grazie a questo ciclo, il *C. cardunculus* L. si adatta perfettamente ai delicati agrosistemi dell'area mediterranea, svolgendo anche un importante ruolo di controllo dell'erosione del suolo (Raccuia e Melilli, 2007).

1.3 Usi

Ciò che rende questa pianta particolarmente interessante non è solo la sua spiccata adattabilità all'ambiente mediterraneo, che permette di ottenere buone rese in biomassa e granella utilizzando bassi input energetici, ma anche i molteplici utilizzi che si possono fare della sua biomassa.

Il cardo, oltre che all'uso strettamente alimentare, infatti, è diventato oggetto di numerosi studi che ne indicano altri possibili utilizzi di tipo farmaceutico ed industriale, tramite l'estrazione di sostanze nutraceutiche e l'uso della biomassa per la produzione di energia e di carburanti ecologici, oltre che come foraggio altamente proteico per gli animali (Toscano *et al.*, 2016; Genovese *et al.*, 2016a). Inoltre essendo una pianta che richiede bassi apporti nutritivi per la crescita si presta molto bene al recupero di campi incolti e improduttivi. Recenti studi, infine, ipotizzano l'uso di questa coltura anche per la fitodepurazione di suoli inquinati da metalli pesanti (Leonardi *et al.*, 2016a, 2016b e 2016c; Pappalardo *et al.*, 2016).

1.3.1 Alimentazione

In Italia il cardo domestico è meno diffuso rispetto al carciofo, tuttavia fa parte della tradizione culinaria di regioni come l'Emilia Romagna e il Piemonte in cui si prepara la cosiddetta bagna cauda. A differenza del carciofo, di cui si consumano le infiorescenze immature, del cardo domestico sono apprezzate le coste, cioè le grosse nervature delle foglie. In realtà le coste si presentano dure, fibrose e dal gusto amaro. Per ovviare a questo inconveniente, si adotta la tecnica dell'imbianchimento, che consiste nell'interrare o avvolgere le foglie con un telo opaco in modo che non venendo direttamente colpite dal sole le nervature possano mantenere un colore bianco, una consistenza più morbida e un sapore più dolce. Sono proprio i raggi solari, infatti, i promotori della sintesi delle sostanze responsabili del tipico sapore delle coste verdi. Le varietà coltivate ai fini alimentari sono molteplici e si differenziano tra di esse in funzione delle dimensioni delle coste, del colore, della eventuale presenza delle spine. Si possono trovare in commercio le seguenti varietà: Bianco Avorio, con foglie frastagliate e costolature carnose medio-grandi; Gigante di Romagna, che si presenta come una pianta che può superare i 160 cm di altezza con foglie di colore verde chiaro e coste larghe e di grosso spessore; Gobbo di Nizza, imbiancato con la tecnica dell'interramento.

1.3.2 Produzione di energia

Il cardo, oltre che per gli usi alimentari, viene coltivato per l'alta resa in biomassa (rese medie in biomassa secca tra 14 e 15 tonnellate/ettaro per anno) che, anche grazie all'elevato contenuto di zuccheri presente nelle radici, prevalentemente inulina, risulta avere grandi possibilità d'impiego nel settore energetico. Le ricerche condotte hanno evidenziato che, della biomassa totale prodotta a fine ciclo, le radici costituiscono ben il 40-50%, percentuale che diminuisce progressivamente con l'età degli impianti. La rimanente parte è rappresentata in media per il 30% dalle foglie, per il 25% dai fusti e per il 45% dai capolini, il 15% dei quali è granella. La biomassa epigea, inoltre, è composta chimicamente dal 40% di cellulosa, dal 20% di emicellulosa, dal 30% di lignina, dal 10-15% di cenere e dal 10% di altro (Antunes *et al.*, 2000). La biomassa lignocellulosica risulta quindi particolarmente idonea per la produzione di energia alternativa (biocarburante solido e biodiesel) mediante trattamenti diversi, come digestione aerobica, anaerobica e gassificazione e il pellet residuo può essere utilizzato per il riscaldamento domestico (González *et al.*, 2004a; González *et al.*, 2004b; Ochoa and Fandos, 2004). In generale

dalla combustione della biomassa, eccetto gli acheni, è possibile ricavare tra 16.500 e 17.800 kilojoule per kilogrammo (kJ/kg), valori che rientrano nella norma per biomasse ligninocellulosiche (Raccuia *et al.*, 2007; Piscioneri *et al.*, 2000; Encinar *et al.*, 2002a; Encinar *et al.*, 2002b).

Ma questa specie risulta interessante anche per le buone rese in granella, che in particolari condizioni possono superare le 2 t/ha, perché la granella presenta un contenuto in proteine pari a circa il 22,5% mentre quello in olio, idoneo per la produzione di biodiesel, può anche superare il 26%.

Il biodiesel, che è sintetizzato dalla transesterificazione di oli vegetali o fonti di grassi animali, è un'alternativa realistica del gasolio perché è prodotto da risorse rinnovabili e comporta emissioni inferiori rispetto al gasolio di origine petrolifera. Materie prime appropriate per la produzione di biodiesel sono oli vegetali con un'alta percentuale di acidi grassi insaturi (Vicente *et al.*, 2006). Infatti, a seconda delle materie prime, il biodiesel può contenere acidi grassi più o meno insaturi nella sua composizione, che sono suscettibili alle reazioni di ossidazione accelerate dall'esposizione all'ossigeno e alle alte temperature, essendo in grado di trasformarsi in composti polimerizzati. Inoltre, considerando che le proprietà ossidative e termiche degli oli sembrano essere correlate al contenuto linoleico, la riduzione di tale contenuto linoleico determina una maggiore stabilità dell'olio.

Nonostante la vasta gamma di fonti di oli vegetali, il consumo mondiale è dominato dagli oli di soia, palma, colza e girasole. Accanto alle diverse fonti vegetali, negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi per valutare l'olio estratto dai frutti (achen) di *C. cardunculus* L., per il consumo umano e per scopi energetici (Curt *et al.*, 2002; Raccuia e Melilli, 2007).

Raccuia *et al.* (2011) hanno identificato alcuni tipi di cardo domestico che mostrano una buona quantità di olio, caratterizzato dal profilo di acidi grassi adatto alla produzione di biodiesel.

1.3.3 Chimica verde

Un'applicazione innovativa del cardo è il suo uso come materia prima per la chimica verde. La chimica verde è una branca di chimica e ingegneria chimica focalizzata sulla progettazione di prodotti e processi che minimizzano l'uso e la generazione di sostanze pericolose per prevenire l'inquinamento e ridurre il consumo di risorse non rinnovabili. Partendo da materie prime agricole selezionate con bassi livelli di impatto ambientale e utilizzando tecnologie innovative, è, infatti, possibile creare un vasto numero di prodotti biologici da utilizzare in molti settori

(bioplastiche, biolubrificanti, prodotti per la cura della casa e della persona, protezione delle piante, additivi per l'industria della gomma e della plastica, fragranze alimentari, ecc.), con un impatto positivo sull'ambiente, sulle prestazioni, sul reddito e sull'integrazione con i prodotti chimici tradizionali, promuovendo una maggiore specializzazione e competitività.

Per la chimica verde è possibile utilizzare sia l'olio estratto dai semi di *C. cardunculus* L. che la biomassa lignocellulosica. L'olio di semi di cardo, simile a quello del girasole, è alto oleico e per questo motivo è adatto per uso industriale.

1.3.4 Produzione di pasta di cellulosa

La biomassa di cardo può essere impiegata per la produzione di pasta di cellulosa da cui ricavare la carta (Antunes *et al.*, 2000; Gominho *et al.*, 2001). Il processo è favorito dalla non eccessiva presenza di lignina e dal buon contenuto di cellulosa ed emicellulosa, specialmente nei capolini, contenenti il pappo. La carta prodotta presenta buone caratteristiche meccaniche e bassa porosità.

1.3.5 Produzione di olio dalla granella

La resa in olio della granella di cardo può superare il 26%. Tuttavia, la produzione della granella per l'estrazione di olio a scopo energetico, non è concorrenziale in termini di resa rispetto ad altre colture oleaginose, ma ha il vantaggio di poter essere complementare alla produzione di biomassa.

L'olio di cardo, inoltre, oltre che per fini energetici, può essere utilizzato anche a scopo alimentare, in quanto presenta un buon rapporto tra acidi grassi insaturi e saturi (17/3), un buon rapporto acido linoleico e oleico (1/8) e assenza di acido erucico.

Inoltre negli ultimi anni, grazie all'alto contenuto di fitosteroli, l'olio di cardo si è inserito anche in ambito cosmetico, diventando un ingrediente sempre più presente in di creme anti age.

1.3.6 Produzione di farine proteiche

La granella di cardo, oltre che per l'estrazione di olio, può essere utilizzata tal quale per l'alimentazione zootecnica, in quanto, essendo costituita per il 45% da tegumento, è ricca di fibra e lignina e quindi è molto più idonea per l'alimentazione dei ruminanti rispetto al classico mangime a base di semi di girasole.

Inoltre, la farina e il pannello, ottenuti come residui dopo l'estrazione dell'olio, presentano un alto tenore proteico (30%) con un elevato valore biologico, cioè contengono fino al 47% di aminoacidi essenziali e rappresentano un ottimo composto base per la realizzazione di mangimi nutraceutici (Genovese *et al.*, 2016a).

1.3.7 Produzione di oligo e polisaccaridi della famiglia dei fruttani

Le radici di cardo e degli altri rappresentanti della specie *C. cardunculus* e più in generale della famiglia delle Asteracee, contengono una notevole quantità di fruttani (Raccuia, 1995; Raccuia e Melilli, 2004b), che si differenziano per il tipo di legame glicosidico tra fruttosio e fruttosio e per la possibile presenza di ramificazioni.

I fruttani sono un gruppo di oligo- e polisaccaridi composti da unità di fruttosio che terminano con un'unità di glucosio. I più noti di tale classe di composti sono i fruttooligosaccaridi (FOS) e l'inulina; i FOS sono fruttani a catena corta, che consistono in 2-9 unità monomeriche, mentre l'inulina è formata da 10 o più unità monomeriche (Mitmesser e Combs, 2017).

L'inulina è una miscela polidispersa lineare di fruttani e svolge la funzione di accumulo energetico per la pianta (Chiavaro *et al.*, 2006). È un polimero interessante sia a livello alimentare, come prodotto nutraceutico, che a livello industriale in quanto precursore di solventi e detergenti biodegradabili. Dalla sua idrolisi enzimatica è possibile ottenere grandi quantità di fruttosio riuscendo ad ottenere fino a 10t di fruttosio per ettaro (Raccuia *et al.*, 2016). Il fruttosio ottenuto dall'idrolisi dell'inulina, inoltre, può essere utilizzato anche per la produzione di biocarburanti di sintesi come il dimetilfurano.

1.3.8 Fitodepurazione dei suoli inquinati

Una problematica di recente attualità riguarda l'inquinamento dei suoli con metalli pesanti causato dall'attività industriale. Nei terreni limitrofi le aree industrializzate di tutto il mondo si riscontrano, infatti, grandi quantità di metalli pesanti, fenomeno che, inevitabilmente, determina la morte della maggior parte delle specie vegetali presenti originariamente su quei suoli. Per questo motivo oggi fonte di sempre maggiore interesse e oggetto di studio da parte di numerosi ricercatori di tutto il mondo sono le piante in grado non solo di sopravvivere su questi terreni inquinati, ma che, soprattutto, hanno la capacità di accumulare all'interno dei

loro tessuti i metalli pesanti asportandoli da suolo, svolgendo in questo modo una importante azione di risanamento.

A tal proposito, recenti studi hanno dimostrato una buona tolleranza di alcuni genotipi di cardo nei confronti di Arsenico e Cadmio, riuscendo non solo a sopravvivere nei suoli inquinati, ma anche ad accumulare buone quantità di questi metalli nei loro tessuti (Leonardi *et al.*, 2016a, 2016b e 2016c; Pappalardo *et al.*, 2016). È stato anche dimostrato che il cardo contiene forti chelanti che legano i metalli in una forma non tossica promuovendo la crescita delle piante ed essendo, inoltre, una pianta a crescita rapida con un'elevata produzione di biomassa per unità di superficie presenta un'ottima efficienza di fitoestrazione rispetto ad altre specie di piante considerate iperaccumulatrici, come *Thlaspi caerulescens*, caratterizzate dall'aver una maggiore concentrazione di metalli nei loro organi, ma bassa produzione di biomassa (Escarré *et al.*, 2000; Vázquez *et al.*, 1992). La biomassa prodotta in terreni contaminati può, inoltre, essere tranquillamente utilizzata alla fine del ciclo biologico a scopi energetici, eliminando in questo modo la gravosa problematica dello smaltimento delle piante inquinate.

1.4 Proprietà salutistiche

Il cardo è un alimento ricco di fibre naturali, minerali, vitamine e ha un basso contenuto di lipidi. Le proprietà salutistiche del cardo sono legate alla sua composizione chimica, costituita da elevate quantità di polifenoli, principalmente acidi fenolici e flavonoidi.

Ben note sono le proprietà antiossidanti, antitumorali, antigenotossiche, epatoprotettive, ipocolesterolemizzanti, diuretiche, antinfiammatorie, antimicotiche, anti-HIV e antibatteriche di questi metaboliti secondari (Adzet *et al.*, 1987; Rodriguez de Sotillo *et al.*, 2002; Funakoshi-Tago *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2013).

Degli studi mettono in evidenza che estratti di *C. cardunculus* L. possono inibire la crescita tumorale e pregiudicare l'invasività di cellule tumorali epatiche (Miccadei *et al.*, 2008), indurre all'apoptosi la linea cellulare del tumore al seno (Mileo *et al.*, 2012), del cancro al colon-retto (Simsek e Uysal *et al.*, 2013) e del mieloma multiplo (Genovese *et al.*, 2016b).

Inoltre, recentemente, è stato rilevato che l'estratto di foglie di Carciofo esercita ampi effetti antitumorali sia *in vitro* che *in vivo* su linee cellulari di mesotelioma. Tale estratto è in grado di ridurre la crescita cellulare, la migrazione e l'attecchimento delle linee cellulari del mesotelioma, in modo simile al pemetrexed, un farmaco chemioterapico comunemente usato nel trattamento di tale neoplasia (Pulito *et al.*, 2015).

Ramos *et al.* (2016) ha rilevato gli effetti antiproliferativi degli estratti lipofili di *C. cardunculus* L. var. *atilis* DC. sul carcinoma mammario triplo negativo.

Ulteriori ricerche sono costantemente in atto per confermare ed approfondire l'attività antitumorale degli estratti di *C. cardunculus* L. e per comprenderne al meglio l'azione dei meccanismi molecolari.

Inoltre, il cardo ha un'alta valenza nutraceutica anche per la presenza di inulina, che è in grado di ristabilire il microbiota intestinale per i suoi effetti benefici sull'assorbimento minerale, sulla composizione lipidica del sangue e persino di prevenzione di cancro al colon (Guo *et al.*, 2005; Banguela e Hernández, 2006). L'inulina non è digeribile dall'uomo in quanto presenta legami chimici che non possono essere degradati dal sistema digestivo, per cui la dose assunta non aumenta il livello di zucchero nel sangue (glicemia), rendendolo adatto all'alimentazione dei diabetici. Essendo quindi una fibra a basso contenuto calorico risulta essere anche un potenziale ingrediente per la produzione di alimenti magri (Lattanzio *et al.*, 2009).

2. Metaboliti biologicamente attivi

Le piante, oltre al normale metabolismo primario, svolgono un'intensa sintesi di composti definiti "metaboliti secondari", anche noti come "phytochemical". È stato stimato che esistono approssimativamente 100.000 composti derivati dalle piante e il numero è in continua crescita. Con l'attributo "secondario" fino a qualche tempo fa erano convenzionalmente indicati quei prodotti che non partecipano "direttamente" ai processi metabolici essenziali al mantenimento della vita in un organismo vegetale, quali divisione cellulare, crescita, respirazione, riproduzione. Adesso invece vi è la consapevolezza che molti di questi componenti sono estremamente importanti per le piante perché coinvolti in complesse interazioni biotiche e abiotiche. Avendo inoltre nell'ecosistema la "funzione" di molecole segnale, che funzionano come mediatori chimici, risultano indispensabili per la sopravvivenza delle specie vegetali. Le piante, infatti, interagiscono continuamente con l'ambiente circostante e non avendo, a differenza degli animali, capacità di movimento, non possono sfuggire agli stress biotici (dovuti alla presenza e/o attacco di animali e/o microrganismi patogeni e non) e abiotici (dovuti a fattori ambientali: temperatura, salinità, radiazioni UV, umidità, presenza di inquinanti). Per tale motivo hanno evoluto dei sistemi di difesa chimica che permettono di affrontare i diversi pericoli. Molti metaboliti agiscono, infatti, da deterrenti, specifici o aspecifici, nei confronti di animali erbivori, microrganismi e virus. Alcune piante sono in grado di produrre composti con funzione antibiotica, antimicotica, antivirale o di costruire barriere contro l'ingresso di patogeni e parassiti; altre producono segnali di pericolo in seguito ad un attacco che può essere percepito negli altri organi della pianta e anche dalle piante circostanti. Alcune piante, invece, possono produrre composti anti-germinativi, anti-digestivi o tossici verso animali o piante in competizione con loro. Inoltre le piante, per difendersi da predatori che le attaccano, sono in grado di produrre specifici metaboliti secondari che attraggono i nemici naturali dei loro predatori. Molte specie vegetali, però, necessitano di insetti per l'impollinazione e producono per questo anche dei composti "attrattori": si assiste così ad un complicato gioco di deterrenza e attrazione tra piante e animali in cui sono coinvolte svariate classi di metaboliti secondari. Oltre alla colorazione dei fiori, le piante sintetizzano composti volatili aromatici che attraggono particolari insetti i quali garantiscono così l'impollinazione entomofila. Sempre grazie a una comunicazione basata sulla sintesi di questi composti, le piante riescono ad instaurare simbiosi con i microrganismi del suolo e infine a difendersi da stress abiotici quali eccessive temperature

fogliari e radiazioni UV. Negli ultimi anni, si è enormemente ampliato il numero dei metaboliti secondari caratterizzati e l'interesse per le piante è aumentato nel tentativo di trovare rimedio a diverse patologie. Anche nell'industria della cosmesi questi metaboliti stanno riscontrando un crescente successo, come ad esempio, l'uso dei carotenodi, noti antiossidanti, per realizzare creme solari per la protezione dalle radiazioni UV o alle creme "antiinvecchiamento". Infine, vi è grande interesse per l'impiego di organismi vegetali per produrre "bioinsetticidi" e per le possibili utilizzazioni dei metaboliti secondari in campo alimentare per fornire aromi e coloranti naturali ma soprattutto molecole con attività antiossidante (Facino *et al.*, 1999). Anche nel campo delle scienze nutrizionali la ricerca ha focalizzato la propria attenzione verso l'identificazione negli alimenti di sostanze biologicamente attive, in grado quindi di migliorare il benessere fisico e mentale dell'uomo e ridurre il rischio di malattie. Molti cibi tradizionali (frutta, verdura, soia, cereali, latte etc.) contengono sostanze potenzialmente capaci di avere un effetto positivo sulla salute; essi sono noti con il nome di alimenti funzionali, nutraceutici, terapeutici o superfoods. Il miele costituisce un perfetto esempio di alimento funzionale naturale. Il suo effetto benefico sull'apparato digerente e su quello respiratorio, la sua attività antibiotica unita a numerosi altri peculiari benefici sulla salute, permettono di classificare il miele come alimento nutraceutico. Nel miele i principali responsabili dell'attività antiossidante sono i composti fenolici, di cui i più importanti sono gli acidi fenolici e i flavonoidi.

I metaboliti secondari possono essere suddivisi in tre grandi classi di composti: isoprenoidi, alcaloidi e polifenoli.

2.1 Isoprenoidi

Gli isoprenoidi sono composti aventi una struttura base a cinque atomi di carbonio (isoprene) che si ripete dando vita ad una vasta ed eterogenea classe di composti come i terpeni e gli steroidi, che svolgono ruoli importanti nelle piante.

I terpeni sono i prodotti naturali più abbondanti e più ampiamente diffusi nelle piante. Possiedono una struttura formata da più unità isopreniche legate in sequenze testa-coda in catene lineari o cicliche a formare composti con formula generica $(C_5)_n$; sono caratterizzati da una notevole varietà strutturale e comprendono composti come i monoterpeni (C_{10}) e i sesquiterpeni (C_{15}) ad azione irritante e antiparassitaria; tetraterpeni (C_{40}) o carotenoidi, come beta-carotene e licopene, sono pigmenti di natura lipidica che donano ai tessuti che li contengono le varie sfumature del giallo, arancio e rosso.

Gli Steroidi sono composti ciclici di origine triterpenica, (molecole contenenti 30 atomi di carbonio, derivanti da 6 unità isopreniche), possiedono un caratteristico nucleo strutturale costituito da quattro anelli da cui derivano diverse famiglie di composti naturali di interesse biologico: steroli (o fitosteroli), saponine steroidee e i corrispondenti agliconi (sapogenine), glicosidi cardiotonici (i principi attivi della digitale).

2.2 Alcaloidi

Altra classe di metaboliti secondari è rappresentata dagli alcaloidi. Essi comprendono un gruppo eterogeneo di composti accomunati dalla presenza di un gruppo azotato derivante da aminoacidi come lisina, istidina e triptofano. Si trovano distribuiti, in genere, sotto forma di sali in tutti gli organi della pianta, ma per lo più nei semi, nelle foglie, nella corteccia e nella radice. Il termine alcaloide non definisce un gruppo di composti omogeneo da un punto di vista chimico, biochimico o fisiologico, ma raggruppa numerose sostanze di differente e complessa struttura e di varia origine. Essi vengono sintetizzati a partire dagli aminoacidi e dai loro diretti derivati. Sono composti da basi azotate facenti parte di un sistema eterociclico (contenente cioè azoto oltre a carbonio) tossici ad elevate concentrazioni e generalmente legati con acidi organici. Gli alcaloidi in piccole dosi hanno effetto terapeutico prevalentemente sul sistema nervoso centrale, periferico e vegetativo.

2.3 Polifenoli

I polifenoli sono una famiglia numerosa ed eterogenea di sostanze organiche naturali polimeriche; tra essi sono presenti molecole lipofile, acidi carbossilici, glucosidi solubili in acqua e grandi polimeri insolubili. I polifenoli sono metaboliti secondari delle piante che entrano a far parte di numerosi processi (riproduzione, crescita, difesa da raggi ultravioletti) e conferiscono resistenza contro patogeni, predatori e sono responsabili della colorazione di molti fiori e frutti. Essi, inoltre, hanno proprietà antibatteriche, antiossidanti, antinfiammatorie e antitumorali.

La biosintesi di questi composti, all'interno della pianta, è frutto di numerose reazioni catalizzate da enzimi che sono finemente regolati da moltissimi fattori esogeni (luce, temperatura, disponibilità idrica, patogeni) ed endogeni (ormoni). La biosintesi parte da due metaboliti primari che derivano dalla via dei pentosi fosfato e dalla glicolisi, rispettivamente l'eritrosio-3-fosfato ed il fosfoenolpiruvato. Mediante la via dell'acido shikimico questi composti

vanno a formare l'acido corismico che è il precursore della sintesi degli amminoacidi aromatici fenilalanina, triptofano e tirosina. La fenilalanina rappresenta il precursore di tutti i composti fenolici sintetizzati dalle piante.

Attraverso la via dei fenil-propanoidi, infatti, questo amminoacido viene convertito prima ad acido cinnamico e successivamente ad acido cumarico, da cui parte la sintesi della lignina e dei flavonoidi. Mediante l'intervento di una Cumaroil-CoA sintasi, l'acido cumarico si può legare ad una molecola di acetil-CoA per formare una molecola di para-cumaroil-CoA. Questa molecola reagisce a sua volta con tre molecole di malonil-CoA attraverso l'azione dell'enzima calcione sintasi (CHS). L'intervento di quest'ultimo enzima porta alla sintesi della naringenina, il primo composto della via biosintetica con la struttura flavonoide, in cui un atomo d'ossigeno chiude l'anello centrale della molecola. Dall'acido trans-cinnamico si formano gli acidi benzoici ed i tannini semplici (o idrolizzabili). L'acido cumarico, invece, può essere convertito negli acidi idrossicinnamici. L'acido cumarico, ottenuto a partire dalla fenilalanina, può proseguire lungo la via biosintetica senza essere trasformato in acidi cinnamici. Mediante l'intervento di una Cumaroil-CoA sintasi si può legare ad una molecola di acetil-CoA per formare una molecola di para-cumaroil-CoA. Questa molecola reagisce a sua volta con tre molecole di malonil-CoA attraverso l'azione dell'enzima stilbene sintasi (SS) e forma gli stilbeni, un'altra classe di polifenoli.

I polifenoli, sono stati divisi in 10 classi generali in funzione del numero di anelli fenolici che essi contengono e degli elementi strutturali che legano questi anelli gli uni agli altri. Quelli più abbondanti nel regno vegetale sono gli acidi fenolici, i flavonoidi, i tannini e gli stilbeni.

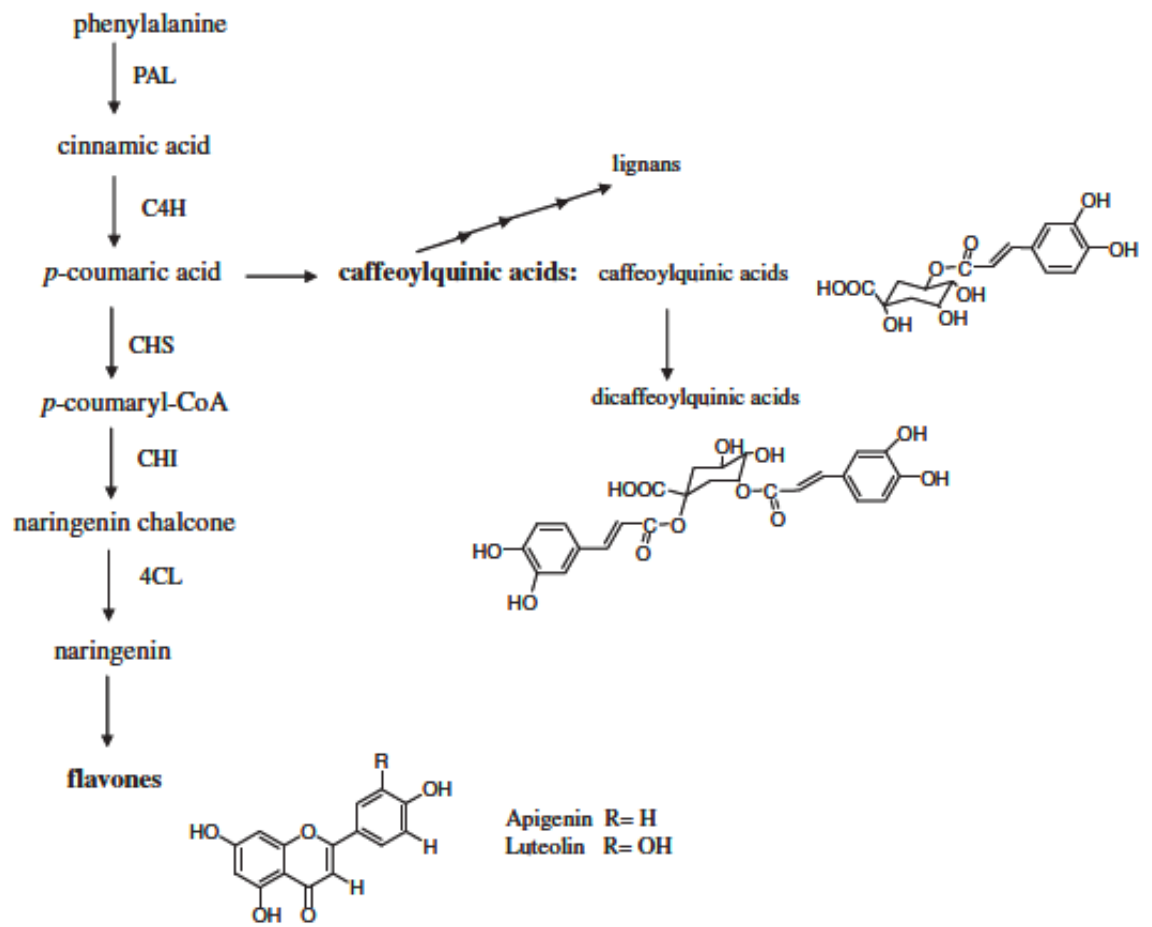


Fig. 2 - Schema generale di sintesi dei flavonoidi in *C. cardunculus* (da Pandino *et al.*, 2011)

2.3.1 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici si possono suddividere in due sottoclassi: gli acidi idrossibenzoici, derivati dell'acido benzoico e gli acidi idrossicinnamici, derivati dell'acido cinnamico.

Gli acidi idrossibenzoici si trovano molto raramente nelle piante commestibili e per tale ragione non assumono un grande interesse nutrizionale.

Uno dei polifenoli rappresentativi di questa categoria è l'acido gallico, contenuto nel tè.

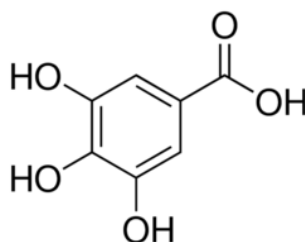


Fig. 3 - Formula di struttura dell'acido gallico

Gli acidi idrossicinnamici sono contenuti nei cereali ed in alcuni tipi di frutta, tra cui il kiwi; sono presenti in tutte le parti del frutto, ma la concentrazione maggiore è stata misurata sulla buccia. Tra gli acidi idrossicinnamici, il più comune è l'acido caffeico.

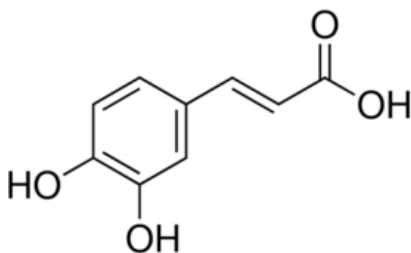


Fig. 4 - Formula di struttura dell'acido caffeico

2.3.2 Flavonoidi

I flavonoidi sono costituiti da due anelli aromatici legati ad un anello benzopiranoico a formare generalmente un eterociclo ossigenato (C6-C3-C6) che presenta numerosi doppi legami i quali, assorbendo luce, fanno apparire i flavonoidi colorati. Il termine flavonoide deriva infatti da flavus (giallo) e si riferisce al ruolo che svolgono come pigmenti in fiori, frutti e foglie. I flavonoidi sono i composti polifenolici più diffusi nel regno vegetale, di norma sotto forma di glicosidi, e

vengono utilizzati dalle piante principalmente come attrattori visivi e olfattivi necessari per l'impollinazione e la dispersione dei semi e, grazie al loro potere antiossidante, per proteggersi dai danni causati dai raggi UV.

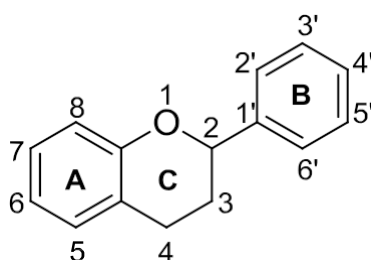


Fig. 5 - Struttura di un benzo-γ-pirano

I flavonoidi appartengono alla classe di polifenoli, e dai dati di letteratura si evince che svolgono una notevole attività antiossidante, ciò dipende probabilmente dai gruppi idrossilici presenti sulla struttura di base. Il gruppo idrossile sull'anello B è il principale responsabile della capacità scavenger dei flavonoidi all'attacco delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In particolare, l'unità catecolica 3'-4' dell'anello B, ha una notevole capacità di inibizione della perossidazione lipidica. I flavonoidi sono presenti in quasi tutte le specie vegetali e possiedono un'elevata attività antiossidante, antinfiammatoria, antimicrobica e antivirale (Cushnie and Lamb, 2005). Attraverso reazioni di metilazione, glicosilazione, isoprenilazione, si formano diversi tipi di flavonoidi: flavoni, flavanoni, flavanoli, isoflavoni e antocianine.

Dei flavanoli, che sono i più abbondanti tra i flavonoidi, la quercetina è il più rappresentativo: si trova in molti frutti e ortaggi come cipolle, foglie di tè, mirtilli, capperi, uva rossa e quindi anche nel vino. Ha un'attività antiossidante, in quanto inibisce l'ossidazione dei lipidi, e attività antinfiammatoria, per inibizione di enzimi come la fosfolipasi A2.

I flavoni si ritrovano soprattutto come glucosidi di luteolina e apigenina in ortaggi come carciofi, cardi, sedano, prezzemolo ma anche nelle uve. Tipici flavoni sono il quercitolo (detto anche quercitina), che, legato al ramnosio, forma il quercitoside (detto anche quercitrina); altri flavoni sono il canferolo ed il miricetolo, quest'ultimo presente solo nell'uva rossa. Luteolina e apigenina hanno diversi effetti importanti sull'uomo, riducono il rischio di alcune malattie croniche, come le malattie cardiovascolari e il cancro (Williamson and Holst, 2008).

I flavanoni si trovano negli agrumi in alte concentrazioni, nei pomodori e nella menta. Sono generalmente glicosilati con un disaccaride in posizione 7. Nelle arance si ritrova l'esperitina, nei pompelmi la naringenina, dal sapore spiccatamente amaro in quanto glicosilata con un

neoesperidosio; l'eriodictiolo nei limoni. Naringenina ed Esperetina rappresentano i flavanoni presenti nel carciofo e nel cardo. Anche i flavanoni presentano una potente attività antiossidante ed un effetto positivo sulle funzioni vascolari.

Gli isoflavoni sono composti simili agli estrogeni in quanto presentano gruppi ossidrilici in posizione 7 e 4' in una configurazione analoga a quelli presenti nell'estradiolo. Questa caratteristica conferisce agli isoflavoni proprietà pseudo-ormonali in quanto sono capaci di legarsi ai recettori degli estrogeni e per tale motivo sono classificati come fitoestrogeni. Si ritrovano quasi esclusivamente nelle leguminose, fra le quali, in misura maggiore, nella soia.

I flavanoli possono trovarsi in forma monomerica, assumendo il nome di catechine, o in forma polimerica, come le proantocianidine. Le catechine si trovano prevalentemente nelle mele, susine, fagioli, lenticchie, fragole, ciliegie, e hanno attività biologiche multiple tra cui effetti vasodilatatori, antitumorali, antinfiammatori, antibatterici e di stimolazione del sistema immunitario. Le proantocianidine si trovano nei semi e nella buccia d'uva e presentano anch'esse azione antiossidante.

2.3.3 Tannini

Sono composti fenolici con una massa elevata ed alta affinità per le proteine con cui formano composti insolubili. Sono tre i gruppi più importanti: tannini idrolizzabili, tannini condensati (procianidine e proantocianidine) e tannoidi.

I tannini idrolizzabili sono esteri dell'acido gallico; i tannini condensati sono polimeri del flavano, costituiti da molecole di catechina e di epicatechina. I tannini condensati sono poco solubili in acqua e sono responsabili del colore rosso di molte radici. I tannoidi sono derivati dell'acido clorogenico (estere dell'acido caffeico con l'acido chinico). Sono diffusi nei semi di caffè e nelle foglie di tè, hanno proprietà astringenti, antinfiammatorie, antibatteriche e antiossidanti.

2.3.4 Stilbeni

Sono composti polifenolici a basso peso molecolare, formati da due anelli benzenici separati da un etano o da un ponte benzenico. Il rappresentante di questa famiglia più diffuso è il resveratrolo, si ritrova nella buccia degli acini dell'uva ma anche nel vino rosso. Presenta numerosi effetti biologici quali: inibizione della perossidazione lipidica, attività antitumorale e attività vasodilatatoria.

2.4 Metaboliti bioattivi del cardo

Il cardo rappresenta un serbatoio naturale di composti biologicamente attivi, tra cui acidi mono- e dicaffeilchinici e flavonoidi, che rappresentano la frazione più abbondante.

I composti caffeilchinici, denominati anche acidi idrossicinnamici, sono un complesso di sostanze strutturalmente basate sull'esterificazione di una unità di acido chinico (molecola assimilabile ai monosaccaridi) con una o due di acido caffeico.

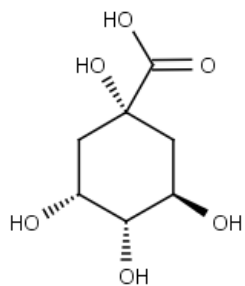


Fig. 6 - Acido chinico

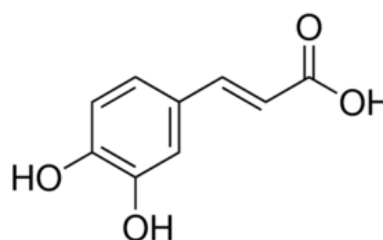
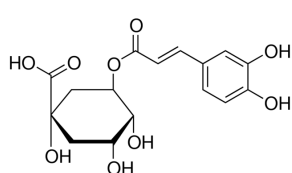


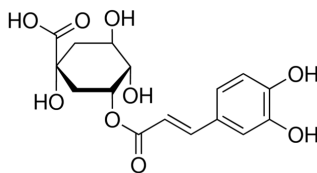
Fig. 7 - Acido caffeico

Sono presenti acidi monocaffeilchinici (acidi 1-caffeilchinico, clorogenico, criptogenico e neoclorogenico) e dicaffeilchinici (acidi 1,3- ; 3,5- e 1,5- dicaffeilchinici). Questi composti si degradano facilmente o si trasformano, isomerizzandosi per transesterificazione. Gli acidi idrossicinnamici svolgono, nelle piante, azione antibiotica e varie funzioni connesse all'inibizione della crescita e della germinazione.

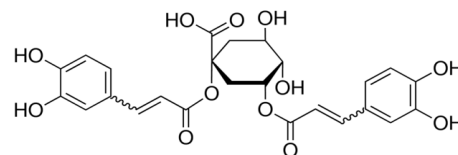
I principali acidi caffeilchinici presenti nel cardo sono: l'acido clorogenico (acido 3-O-caffeilchinico), che è il capostipite, l'acido neoclorogenico (acido 5-O-caffeilchinico) e la cinarina (acido 1,3-O-dicaffeilchinico).



acido 3-O-caffeilchinico



acido 5-O-caffeilchinico



acido 1,3-dicaffeilchinico

Fig. 8 - Struttura degli acidi caffeilchinici presenti nel cardo

Gli acidi caffeilchinici hanno un ruolo rilevante sia per le piante, come componenti strutturali e funzionali delle pareti cellulari, che per l'uomo come componenti bioattive assunte con la dieta. È noto che gli acidi caffeilchinici hanno diversi effetti benefici sulla salute in quanto associati a

una diminuzione del rischio di malattie croniche come il cancro e le malattie cardiovascolari proprio per l'elevato potere antiossidante. Tali composti riescono ed inibire la perossidazione lipidica ed in particolare l'acido clorogenico e la cinarina, presentano attività antiossidante e protettiva contro lo stress ossidativo indotto dall'idroperossido.

L'attività antiossidante è stata studiata anche nei leucociti dell'uomo (Perez-Garcia *et al.*, 2000) in cui è stato segnalato l'inibizione dello stress ossidativo generato dalle specie di reattivo dell'ossigeno (ROS) ad opera di cinarina, acido caffeico, acido clorogenico e luteolina.

In *C. cardunculus* L. var. *atilis* DC. la sintesi di polifenoli è diversa a seconda delle parti della pianta: i flavoni, come luteolina e apigenina, sono più abbondanti nelle foglie mentre, gli acidi caffeilchinici sono più abbondanti nei capolini, presumibilmente perché l'esposizione solare stimola la produzione di flavoni, che proteggono le cellule delle foglie dalle radiazioni UV, mentre negli steli fiorali è indotta la produzione di acidi caffeilchinici da cui derivano i lignani che svolgono funzioni di supporto meccanico (Ramos *et al.*, 2014)

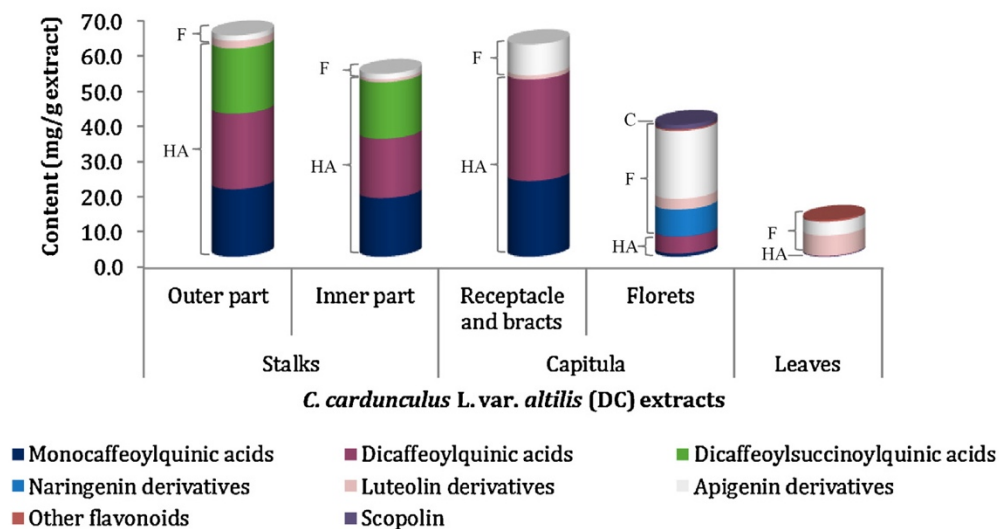


Fig. 9 - Composizione fenolica di differenti parti del *C. cardunculus* var. *atilis* (DC.) (da Ramos *et al.*, 2014)

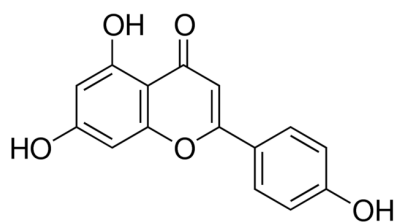
Tabella 1 Quantificazione HPLC dei composti fenolici presenti in estratti di *C. cardunculus* L. var. *altilis* (DC.) (da Ramos *et al.*, 2014)

HT-UHPLC-UV quantification of phenolic compounds identified in methanol/water/acetic acid (49.5:49.5:1) extracts of *C. cardunculus* L. var. *altilis* (DC).

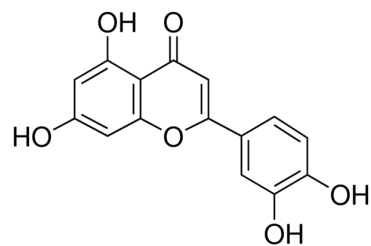
No.	Compound	Phenolic content (mg/g extract) ^a				Leaves
		Stalks		Capitula		
		Outer part	Inner part	Receptacle and bracts	Florets	
	Total hydroxycinnamic acids^k	59.1 ± 4.5ⁱ	49.4 ± 5.0^l	50.2 ± 3.2	5.7 ± 0.4	0.3 ± 0.1
	<i>Total monocatecholquinic acids</i>	19.1 ± 1.0b	16.6 ± 1.3c	21.4 ± 2.1a	0.9 ± 0.1d	0.1 ± 0.0d
1	1-O-Caffeoylquinic acid ^b	0.6 ± 0.1ab	1.1 ± 0.2a	0.3 ± 0.1b	–	–
2	3-O-Caffeoylquinic acid ^b	0.9 ± 0.2a	0.2 ± 0.2c	0.5 ± 0.2b	–	–
3	5-O-Caffeoylquinic acid ^b	17.6 ± 0.9b	15.3 ± 1.2c	20.6 ± 1.8a	0.9 ± 0.1d	0.1 ± 0.0d
	<i>Total dicaffeoylquinic acids^k</i>	21.4 ± 1.7 ^j	16.8 ± 1.8 ^l	28.8 ± 1.3	4.8 ± 0.3	0.1 ± 0.1
5	1,3-Di-O-caffeoylquinic acid ^c	1.2 ± 0.1b	1.6 ± 0.1a	1.0 ± 0.1b	–	–
10	1,4-Di-O-caffeoylquinic acid ^c	1.5 ± 0.2b	0.9 ± 0.1b	2.7 ± 0.3a	–	–
12	1,5-Di-O-caffeoylquinic acid ^c	18.8 ± 1.4b	14.3 ± 1.7c	24.5 ± 0.9a	4.8 ± 0.3d	0.1 ± 0.1e
22	4-Acyl-di-O-caffeoylquinic acid isomer ^{b,k}	0.7 ± 0.1 ^{j(21+22)}	0.7 ± 0.1 ^{j(21+22)}	0.6 ± 0.1	–	–
	<i>Total dicaffeoylsuccinoylquinic acids</i>	18.5 ± 2.0a	16.1 ± 2.1a	–	–	–
18	1,5-Di-O-caffeoylsuccinoylquinic acid isomer ^c	12.4 ± 1.3a	10.7 ± 1.3a	–	–	–
19	4-Acyl-di-O-caffeoylsuccinoylquinic acid isomer ^c	2.7 ± 0.3a	2.8 ± 0.5a	–	–	–
23	Dicaffeoylsuccinoylquinic acid isomer ^c	1.5 ± 0.2a	1.1 ± 0.2a	–	–	–
26	Dicaffeoyldisuccinoylquinic acid isomer ^c	1.9 ± 0.3a	1.6 ± 0.2a	–	–	–
	Total coumarins	–	–	–	1.2 ± 0.1	–
4	Scopolin isomer ^l	–	–	–	1.2 ± 0.1	–
	Total flavonoids	3.7 ± 0.4c	2.4 ± 0.3c	9.9 ± 0.9b	30.7 ± 1.9a	10.2 ± 1.5b
	<i>Total flavanones</i>	–	–	–	7.9 ± 0.4	–
6	Eriodictyol hexoside ^e	–	–	–	0.1 ± 0.0	–
	<i>Total naringenin derivatives</i>	–	–	–	7.6 ± 0.4	–
13	Naringenin 7-O-glucoside ^e	–	–	–	3.2 ± 0.2	–
14	Naringenin rutinoside ^e	–	–	–	5.4 ± 0.2	–
28	Naringenin ^e	–	–	–	0.2 ± 0.0	–
	<i>Total flavones</i>	3.7 ± 0.4c	2.4 ± 0.3c	9.9 ± 0.9b	22.7 ± 1.6a	10.2 ± 1.5b
	<i>Total luteolin derivatives</i>	2.2 ± 0.2c	0.8 ± 0.1d	1.2 ± 0.1d	3.1 ± 0.2b	5.7 ± 0.8a
7	Luteolin glucuronide ^f	1.0 ± 0.1b	0.5 ± 0.0c	0.8 ± 0.1b	0.6 ± 0.0c	1.4 ± 0.2a
8	Luteolin 7-O-glucoside ^f	1.2 ± 0.1b	0.3 ± 0.0d	0.4 ± 0.0cd	0.6 ± 0.1c	3.0 ± 0.4a
9	Luteolin rutinoside ^f	–	–	–	0.3 ± 0.0a	0.1 ± 0.0b
21	Luteolin acetyl-hexoside ^{f,h}	^{j(21+22)}	^{j(21+22)}	–	0.3 ± 0.0b	0.7 ± 0.1a
24	Luteolin ^f	–	–	–	1.2 ± 0.1a	0.5 ± 0.1b
	<i>Total apigenin derivatives</i>	1.5 ± 0.2d	1.5 ± 0.2d	8.7 ± 0.8b	19.3 ± 1.4a	3.9 ± 0.6c
15	Apigenin glucuronide ^{g,k}	1.2 ± 0.1 ^{j(15+16)}	1.4 ± 0.2 ^{j(15+16)}	8.1 ± 0.7	13.8 ± 1.0 ^{j(15+16+17)}	2.9 ± 0.4 ^{j(15+16+17)}
16	Apigenin 7-O-glucoside ^g	^{j(15+16)}	^{j(15+16)}	–	^{j(15+16+17)}	^{j(15+16+17)}
17	Apigenin 7-O-rutinoside ^g	–	–	–	^{j(15+16+17)}	^{j(15+16+17)}
25	Apigenin acetyl-hexoside ^g	0.3 ± 0.0c	0.1 ± 0.0d	0.6 ± 0.1a	0.7 ± 0.0a	0.5 ± 0.1b
29	Apigenin ^g	–	–	–	4.8 ± 0.4a	0.5 ± 0.1b
	<i>Total chrysoeriol derivatives</i>	–	–	–	0.3 ± 0.1a	0.5 ± 0.3a
20	Chrysoeriol hexoside isomer ^f	–	–	–	0.2 ± 0.1a	0.5 ± 0.3a
30	Chrysoeriol isomer ^f	–	–	–	0.1 ± 0.0	–
	Total	63.5 ± 4.9a	52.5 ± 5.3b	60.2 ± 3.9a	37.6 ± 2.4c	10.4 ± 1.6d

Pandino *et al.* (2010) ha analizzato e confrontato il profilo fenolico tra capolino di cardo selvatico, carciofo e cardo coltivato, riscontrando che l'apigenina e il suo derivato 7-O-glucuronide sono i composti predominanti nel cardo coltivato, confermando così il loro potenziale utilizzo come fonte di tali flavonoidi.

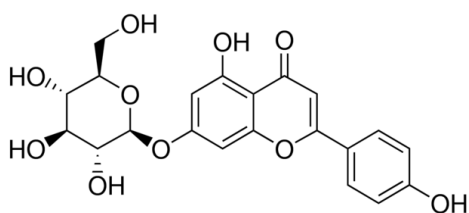
Dai dati presenti in letteratura i flavonoidi maggiormente presenti nel cardo sono i flavoni apigenina, luteolina e i loro coniugati (Lattanzio *et al.*, 2009; Pandino *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2014) (Tabella 1).



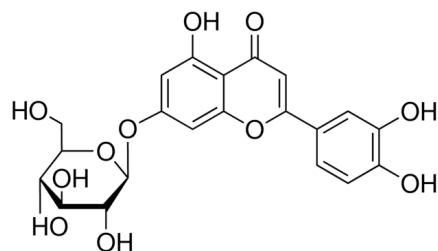
Apigenina



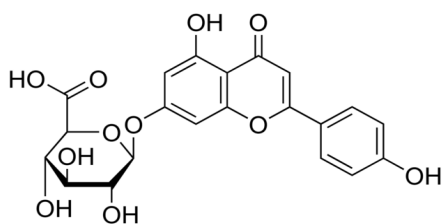
Luteolina



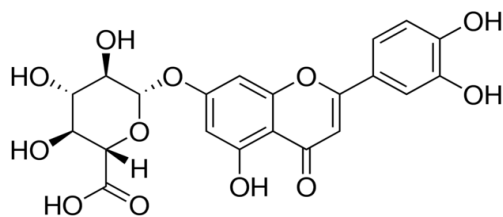
Apigenin-7-O-glucoside



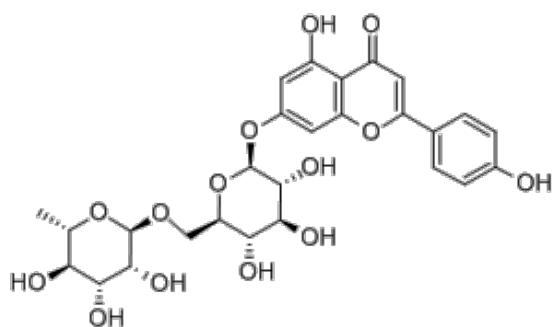
Luteolin-7-O-glucoside



Apigenin-7-O-glucuronide



Luteolin-7-O-glucuronide



Apigenin-7-O-rutinoside

Fig. 10 - Strutture chimiche dei flavoni apigenina, luteolina e loro derivati

Secondo altre ricerche (Pandino *et al.*, 2011) condotte su differenti genotipi di *C. cardunculus* L., coltivati e selvatici, è stata rilevata una differenza di concentrazione di apigenina, più alta in cardo rispetto al carciofo e di luteolina, più alta in carciofo rispetto al cardo. Tale studio inoltre ha messo in evidenza una maggiore concentrazione di flavonoidi (apigenina e luteolina) nelle foglie rispetto allo stelo floreale.

3. Il miele

L'apicoltura in Italia è un patrimonio di varietà climatico-vegetazionale straordinario, che la rende un punto di riferimento nel mondo per varietà di miele prodotto e per l'offerta qualitativa di altissimo livello.

“L'Italia del miele” vanta un record imbattibile: 51 varietà, tutte censite dal Ministero dell'Agricoltura, contro le 10-15 varietà degli altri Paesi. Migliaia di apicoltori presenti in tutte le regioni d'Italia hanno infatti a disposizione oltre 30 varietà uniflorali ed una grande varietà di millefiori a cui attingere, prodotti da circa 1.150.000 alveari (rapporto annuale 2015 dell'Osservatorio nazionale della produzione e del mercato del miele).

La direttiva 2001/110/CE del Consiglio dell'Unione Europea definisce il miele come “la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare”.

L'azione svolta dall'ape per trasformare il nettare o la melata (derivato della linfa degli alberi, prodotta da alcuni insetti succhiatori come la metcalfa) in miele è profonda e complessa e avviene ad opera di enzimi in essa presenti. L'ape bottinatrice raccoglie il nettare (o la melata) dalla pianta e lo trasporta all'alveare dove avviene il passaggio da un'ape all'altra; questa operazione provoca la riduzione del contenuto d'acqua per evaporazione, a causa dell'aria relativamente calda e secca presente all'interno dell'alveare. Durante questi passaggi il nettare si arricchisce di secrezioni ghiandolari dell'ape, cioè di enzimi che determinano una serie di trasformazioni chimiche, come ad esempio l'enzima invertasi che è in grado di scindere il saccarosio in glucosio e fruttosio (Perez *et al.*, 2002; Terrab *et al.*, 2003).

Il miele può essere definito una soluzione sovrassatura di carboidrati, che rappresentano circa il 95% del suo peso secco, i cui costituenti principali sono glucosio (31% w/w) e fruttosio (38% w/w). Il colore del miele può variare da una tinta quasi incolore al marrone scuro. Esso può avere una consistenza fluida, densa o cristallizzata (totalmente o parzialmente) e il sapore e l'aroma variano in base alla pianta d'origine.



Foto 3 - Diverse tonalità di colore del miele

La direttiva europea limita l'intervento umano che potrebbe alterare la composizione del miele e ne consente pertanto la conservazione del carattere naturale. In particolare è proibita l'aggiunta di qualsivoglia ingrediente alimentare al miele, compresi gli additivi, e anche l'eliminazione di qualunque componente specifica del miele, incluso il polline, a meno che tale eliminazione non sia inevitabile nel corso dell'estrazione di sostanze estranee. Tali requisiti sono conformi alla norma del Codex Alimentarius per il miele (Codex Stan 12-1981, 2001).

Il polline quindi fa parte della composizione del miele e le api sono all'origine della presenza di questo elemento, in quanto i granuli pollinici cadono nel nettare raccolto dalle api, che viene portato nell'alveare e successivamente trasformato in miele.

La melissopalinoologia è la disciplina scientifica che studia il polline presente nel miele, permettendo l'identificazione della provenienza botanica di tale polline. Grazie a questa analisi è possibile individuare l'origine geografica e il genere delle piante da cui le api hanno prelevato il polline, sebbene il miele possa contenere anche pollini di piante anemofile trasportati dall'aria, spore e polvere attirata elettrostaticamente dalle api stesse. Le informazioni ottenute dallo studio di un campione di miele (e di polline) sono utili quando si deve supportare l'indicazione di particolari fonti per il campione. Le moderne mappe dei pollini nei mieli permettono di identificare il luogo di origine del prodotto principe delle api. Si parla di miele uniflorale quando questo proviene principalmente da un'unica origine botanica e ne risulta sufficientemente caratterizzato dal punto di vista della composizione e delle caratteristiche organolettiche e microscopiche. In altre parole per potersi considerare uniflorale un miele deve

essere riconoscibile come tale dal punto di vista analitico e per aspetto, profumo e gusto. Il miele monoflora derivato da una pianta particolare può avere maggior valore rispetto a quello derivato da molti tipi di piante, così come in funzione della regione di origine il valore può essere diverso. Tuttavia la disciplina che tradizionalmente permette l'identificazione e la quantificazione dei grani di polline contenuti nel miele (Louveaux e Vergeron, 1964; Louveaux *et al.*, 1978) presenta alcune limitazioni (Soria *et al.*, 2004; Devillers *et al.*, 2004; Hermosin *et al.*, 2003). Una particolare difficoltà è che la melissopalinoologia richiede conoscenza precedente della morfologia del polline e personale professionale specializzato per poter ottenere risultati affidabili. Al giorno d'oggi però, malgrado questi problemi, la melissopalinoologia rimane un importante metodo di riferimento.

I mieli presentano evidenti differenze conseguenti alla diversa origine botanica. Dall'analisi di diversi mieli e dei corrispondenti fiori è emerso che vi è un diretto trasferimento di composti aromatici dalla pianta al miele (Seisonen *et al.*, 2015; Cuevas-Glory *et al.*, 2007; Aliferis *et al.*, 2010). Le denominazioni di vendita del miele danno indicazioni su:

- origine floreale o vegetale, se il prodotto è interamente o principalmente ottenuto dalla pianta indicata e ne possiede le caratteristiche organolettiche, fisicochimiche e microscopiche,
- origine regionale, territoriale o topografica, se il prodotto proviene interamente dall'origine indicata,
- criteri di qualità specifici (direttiva europea 2001/110/CE).

3.1 Composizione e caratteristiche nutraceutiche

Il miele è una miscela complessa di cui ad oggi sono state identificate più di 300 molecole; i principali componenti sono: zuccheri, acqua, sali minerali, acidi organici, enzimi e aromi (Fig.11).

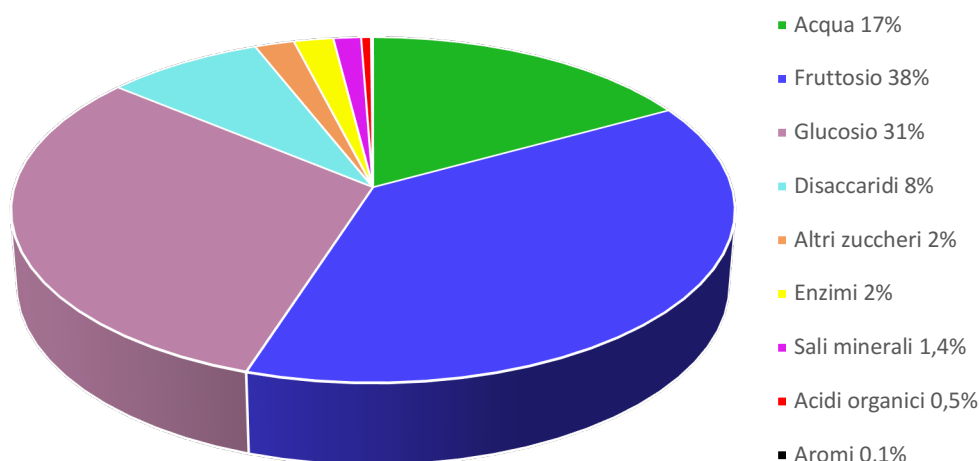


Fig. 11 - Composizione del miele

La composizione è alquanto variabile e dipende da numerosi fattori tra cui l'origine botanica e geografica, la natura del suolo, l'andamento climatico, le specie di api, lo stato fisiologico della colonia e le tecniche apistiche impiegate (Frankel *et al.*, 1998; Al-Mamary *et al.*, 2002; Gheldof *et al.*, 2002; Pichichero *et al.*, 2009).

3.1.1 Carboidrati

Gli zuccheri (saccaridi) sono i principali componenti del miele, di cui i maggiori costituenti sono i monosaccaridi glucosio(G) e fruttosio(F); solitamente il contenuto di fruttosio è superiore a quello di glucosio. Il fruttosio è molto solubile in acqua ed essendo una sostanza igroscopica permette di conservare il miele allo stato liquido. Al contrario, un alto contenuto di glucosio comporta una maggiore propensione del miele alla cristallizzazione, dato che questo zucchero ha una minor solubilità in acqua. Le concentrazioni di questi analiti, così come il loro rapporto (F/G), sono stati proposti come utili indicatori per la classificazione dei mieli uniflorali (Persano Oddo *et al.*, 1995, 2004). L'elevato contenuto di zuccheri contribuisce in modo fondamentale a definire numerose proprietà fisiche e alimentari del miele: la viscosità, l'igroscopicità, lo stato

fisico (liquido o cristallino), il valore energetico e il potere dolcificante. Inoltre nel miele sono presenti diversi oligosaccaridi (disaccaridi, trisaccaridi e tetrasaccaridi), il cui contenuto medio è del 5-10% rispetto agli zuccheri totali.

La presenza di saccarosio è dovuta al fatto che l'enzima invertasi non idrolizza tutte le molecole di saccarosio, ma una minima quantità rimane nel miele. Il maltosio e l'isomaltosio sono altri due disaccaridi normalmente presenti nel miele. Altri zuccheri (come i trisaccaridi erlosio e raffinosio) non sono presenti nella melata o nel nettare, ma sono il risultato di trasformazioni enzimatiche. Questi zuccheri non influiscono sulle proprietà fisiche e organolettiche, come il glucosio e il fruttosio, ma possono essere utili per determinare l'origine botanica del miele, in quanto la loro composizione dipende dalla pianta dalla quale esso deriva. Ad esempio, attraverso la presenza del trisaccaride melezzitiosio (Fig.12), si può stabilire se un miele contenga della melata: se il valore di melezzitiosio è maggiore dello 0,5% è molto probabile che contenga melata.

Nel processo di digestione, dopo l'assunzione del miele, i carboidrati principali, quali fruttosio e glucosio, vengono rapidamente trasportati nel sangue e possono essere prontamente utilizzati dall'organismo (Bogdanov *et al.*, 2008). Più precisamente, il glucosio entra direttamente in circolo e viene quindi utilizzato immediatamente mentre il fruttosio è consumato più lentamente garantendo un apporto energetico diluito nel tempo.

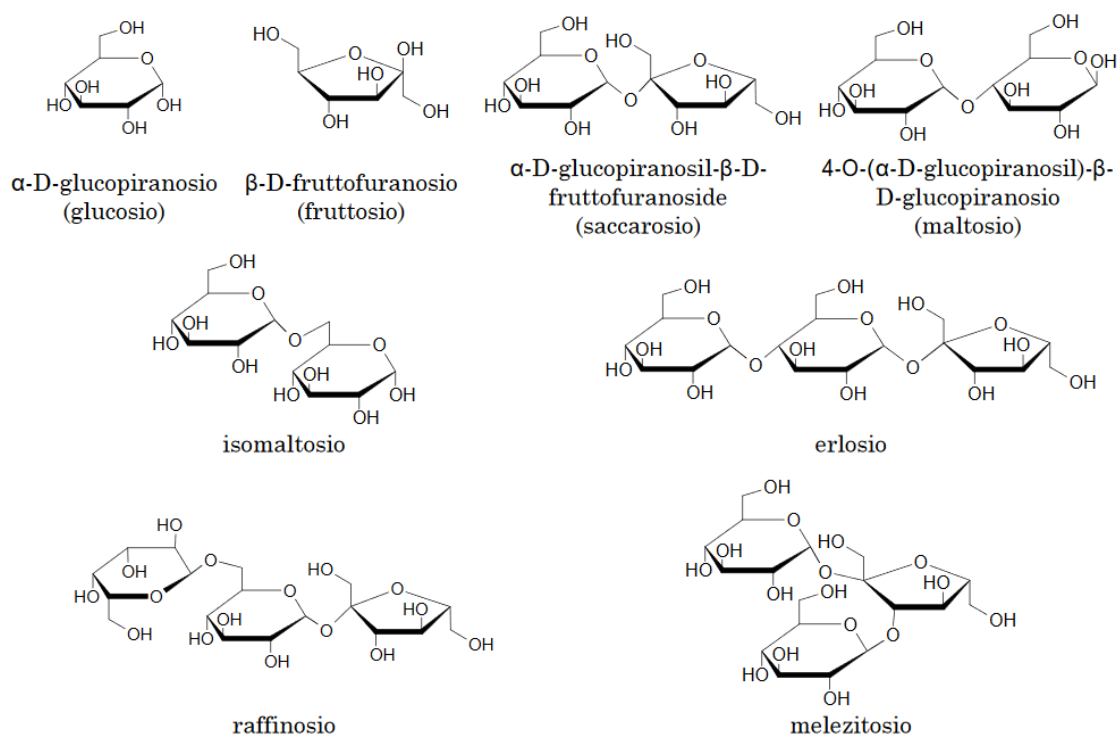


Fig. 12 - Strutture chimiche di alcuni glucidi presenti nel miele

3.1.2 Acqua

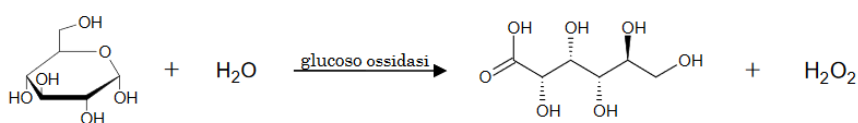
Il contenuto d'acqua (mediamente del 17%) è una caratteristica importante del miele in quanto ne influenza la conservabilità e la lavorabilità. Percentuali elevate di acqua facilitano processi di fermentazione, mentre valori troppo bassi peggiorano la lavorabilità del miele (in particolare nella centrifugazione e nell'estrazione).

Il contenuto d'acqua dipende da diversi fattori quali l'origine botanica, le condizioni atmosferiche e ambientali, la stagione di produzione, le tecniche dell'apicoltore e le condizioni di conservazione.

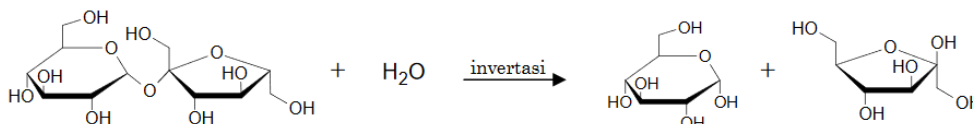
3.1.3 Enzimi, acidi organici e composti azotati

Il miele contiene circa 0,5% di proteine, principalmente enzimi e aminoacidi liberi. Il contributo di questa frazione all'assunzione di proteine per l'uomo è marginale (Bogdanov *et al.*, 2008).

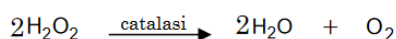
Per quanto riguarda gli enzimi contenuti nel miele, essi provengono dalle secrezioni ghiandolari delle api, dalla melata, dal nettare e dagli insetti produttori di melata. Questi enzimi si degradano progressivamente nel tempo o in seguito a trattamenti termici, quindi la quantità di enzimi presenti nel miele è indice di freschezza. Gli enzimi principali sono la glucosio ossidasi e l'invertasi (o saccarasi), secreti da una specifica ghiandola delle api. La diastasi (o amilasi) è di origine in parte animale e in parte vegetale. La catalasi deriva invece dal nettare e dalla melata. La glucosio ossidasi, in presenza di acqua, provoca l'ossidazione del glucosio con liberazione di acido gluconico e acqua ossigenata:



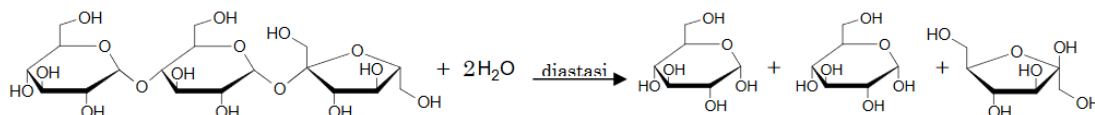
L'invertasi idrolizza il saccarosio in glucosio e fruttosio:



La catalasi catalizza la conversione dell'acqua ossigenata in acqua e ossigeno:



La diastasi, in presenza di acqua, scinde gli oligosaccaridi (come ad esempio l'erlosio) in composti più semplici:



La quantità di diastasi presente nel miele (indice diastatico) viene utilizzata come indice di freschezza e per determinare se un miele ha subito trattamenti termici. Infatti, questo enzima si degrada con il trascorrere del tempo o se viene sottoposto a temperature troppo elevate. L'indice diastatico, secondo la scala di Schade, non deve essere inferiore a 8, anche se può variare a seconda dell'origine botanica (il miele di agrumi è caratterizzato da un indice diastatico al di sotto del limite fissato).

Per quanto riguarda gli acidi organici (Fig. 13), nel miele ne sono presenti circa 0,1-1%, tra cui l'acido gluconico, formico, piruvico, tartarico, lattico, malico, succinico e butirrico. L'acido gluconico è il più abbondante e contribuisce a determinare l'aroma del miele. Esso si forma per l'azione dell'enzima glucosio ossidasi, che provoca l'ossidazione del glucosio con formazione di acqua ossigenata. Gli altri acidi organici provengono dal nettare o dalla melata oppure si formano durante l'elaborazione del miele per intervento delle api. La presenza di questi acidi determina un pH compreso tra 3,4 e 4,5, ma si possono anche trovare mieli con pH inferiore o superiore (ad esempio il miele di castagno ha un pH compreso tra 5 e 6).

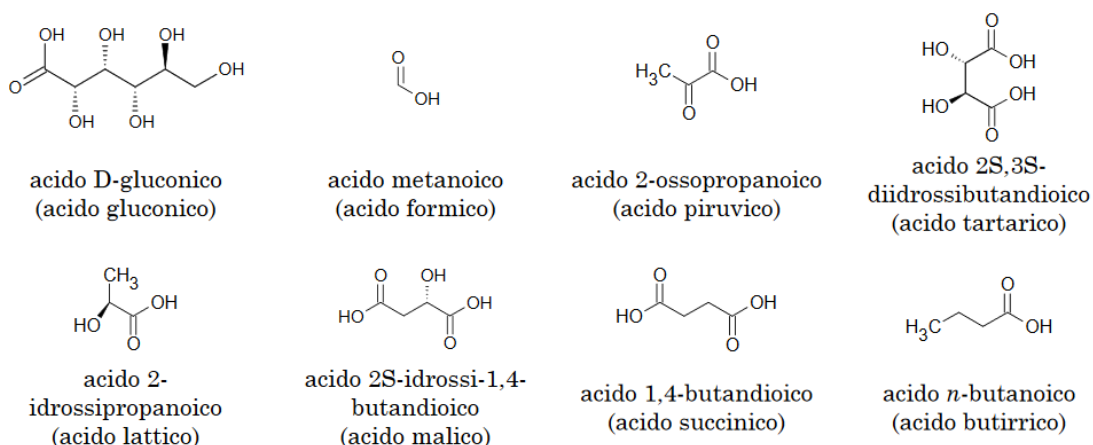


Fig. 13 - Strutture chimiche di alcuni acidi organici presenti nel miele

Nel miele la presenza di sostanze azotate (aminoacidi liberi e proteine) è minima. La loro presenza è imputabile sia alle api, che alla fonte vegetale da cui viene prodotto il miele: infatti si hanno aminoacidi comuni a molti tipi di miele, mentre altri dipendono solo dall'origine botanica (Paramás *et al.*, 2006). Dai dati presenti in letteratura la prolina risulta essere l'aminoacido in maggior percentuale, circa il 50% del totale degli aminoacidi liberi (Iglesias *et al.*, 2004; Meda *et al.*, 2005). Essa viene secreta da alcune ghiandole delle api, pertanto è presente in tutti i mieli. Fino ad oggi, nel miele sono stati identificati 20 aminoacidi, tra cui

prolina, arginina, istidina, leucina, lisina e metionina, e alcuni di questi sono stati classificati come marcatori dell'origine botanica del miele (Hermosín *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2007).

Le proteine contenute nel miele sono composte da tutti gli aminoacidi essenziali, ossia aminoacidi che il nostro organismo non può sintetizzare e che quindi devono essere assunti con il cibo. Alcune di esse sono: albumine, globuline, istoni e protamine.

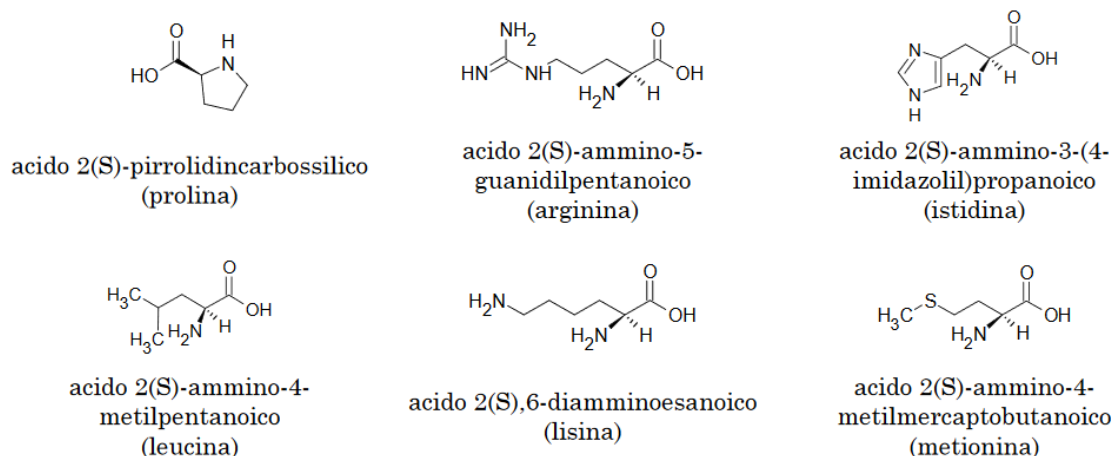


Fig. 14 - Strutture chimiche dei principali aminoacidi contenuti nel miele

3.1.4 Vitamine, minerali e composti in tracce

La quantità di vitamine e minerali è minima e il contributo del miele alla dose giornaliera raccomandata (RDI) delle diverse sostanze in tracce è marginale. Il miele può contenere provitamina A (o carotene), alcuni gruppi della vitamina B, vitamina C, D ed E. Questi ultimi derivano dai granuli di polline che si trovano nel miele. Inoltre, il miele contiene 0,3-25 mg kg⁻¹ di colina e 0,06-5 mg kg⁻¹ di acetilcolina. La colina è essenziale per la funzione cardiovascolare e cerebrale, nonché per la composizione e la riparazione della membrana cellulare, mentre l'acetilcolina funge da neurotrasmettitore.

È noto che i diversi mieli uniflorali contengono varie quantità di minerali e di elementi di traccia (Bensch, 1992). Il minerale che si riscontra in maggior quantità è il potassio (costituisce circa 50-75% dei minerali presenti), seguito da sodio, magnesio e calcio. Inoltre il miele contiene zolfo, fosforo, silicio, ferro, rame e manganese. Il contenuto minerale deriva principalmente dal nettare della pianta da cui proviene e quindi dalla sua origine botanica e geografica e per tale motivo può essere utilizzato come strumento per valutare la tracciabilità del miele (Di Bella *et*

al., 2015). I sali minerali caratterizzano la colorazione del miele: quelli scuri sono solitamente ricchi di sali minerali, mentre quelli chiari ne sono poveri. Dal punto di vista nutrizionale il cromo, il manganese e il selenio sono importanti, soprattutto per i bambini da 1 a 15 anni. Elementi come zolfo, boro, cobalto, fluoruro, ioduro, molibdeno e silicio possono essere importanti anche nell'alimentazione umana, anche se non sono presenti valori di RDI proposti per questi elementi.

3.1.5 Sostanze volatili e polifenoli

Esiste un'ampia varietà di miele con diversi gusti e colori, a seconda della loro origine botanica. Gli zuccheri sono i principali composti di costruzione del gusto, infatti il miele con un alto contenuto di fruttosio (ad es. miele di acacia) è più dolce rispetto a quelli con elevata concentrazione di glucosio. L'aroma del miele dipende anche dalla quantità e dal tipo di acidi e aminoacidi presenti. Negli ultimi decenni è stata condotta un'ampia ricerca sui composti aromatici. Sono stati individuati più di 500 composti volatili in diversi tipi di miele. Le sostanze volatili contribuiscono a definire l'aroma del miele, il quale subisce notevoli variazioni con l'invecchiamento o a causa di trattamenti termici troppo drastici. Si tratta di composti chimici diversi tra cui alcoli, acidi grassi, aldeidi, chetoni, esteri, eteri e altre sostanze ancora. Essendo sostanze volatili e termolabili si degradano e si trasformano con facilità.

Un altro importante gruppo di composti che determinano l'aspetto e le proprietà funzionali del miele è costituito dai polifenoli, di cui i principali sono i flavonoidi (es. quercetina, luteolina, kaempferolo, apigenina, crisina, galangina), e i derivati dell'acido fenolico (Martos *et al.*, 2000; Gheldof *et al.*, 2002). Essi contribuiscono in maniera significativa alla definizione dell'aroma e in generale delle caratteristiche organolettiche del miele e ne influenzano l'attività biologica (antiossidante e antimicrobica) (Weston *et al.*, 1999; Gheldof *et al.*, 2002).

Molti composti fenolici sono stati classificati come marcatori dell'origine botanica del miele (Ferrerres *et al.*, 1993, 1994; Andrade *et al.*, 1997; Tomas-Barberan *et al.*, 2001; Cabras *et al.*, 1999; Tuberoso *et al.*, 2011), di cui le principali fonti sono le piante.

3.1.6 Altre sostanze

L'idrossimetilfurfurale (HMF) è un prodotto di disidratazione del fruttosio e viene utilizzato come indice della freschezza del miele e del suo stato di conservazione. È praticamente assente nel miele appena estratto, aumenta proporzionalmente con l'invecchiare del miele e cresce molto rapidamente se il miele è stato sottoposto a trattamenti termici a temperature elevate.

Si forma in ambiente acido per degradazione degli zuccheri, in particolare per l'ossidazione del fruttosio. Il limite massimo di HMF è stato fissato a 40 mg kg^{-1} , seppur in mieli di qualità tale parametro, alla produzione, non supera il valore di 10 mg kg^{-1} .

Il miele ha un contenuto di lipidi praticamente nullo. I pochi lipidi presenti sono dovuti a qualche traccia di cera derivata dall'estrazione del miele.

Tra pigmenti vegetali contenuti nel miele si trovano, carotenoidi, flavonoidi, antociani e xantofille. Essi contribuiscono alla determinazione della colorazione del miele. Questi pigmenti sono prodotti dalle piante e arrivano al miele tramite il nettare e la melata raccolti dalle api.

3.2 Proprietà salutistiche

Le sostanze presenti nel miele indicano un elevato profilo nutrizionale dello stesso, tanto da renderlo un alimento completo, come mostrato nelle tabelle in Fig.15.

Table 1 Nutritional composition of honey*

	Blossom honey		Honeydew honey	
	Range	Mean	Range	Mean
Water	15 – 20	17.2	15 – 20	16.3
Total sugars		79.7		80.5
<i>Monosaccharides</i>				
fructose	30 – 45	38.2	28 – 40	31.8
glucose	24 – 40	31.3	19 – 32	26.1
<i>Disaccharides</i>				
sucrose	0.1 – 4.8	0.7	0.1 – 4.7	0.5
others	2.0 – 8.0	5.0	1.0 – 6.0	4.0
<i>Trisaccharides</i>				
oligosaccharides		3.1		10.1
erlose	0.5 – 6.0	0.8	0.1 – 6.0	0.1
melezitose		< 0.1	0.3 – 2.2	4.0
others	0.5 – 1.0	0.5	0.1 – 6.0	3.0
Minerals	0.1 – 0.5	0.2	0.6 – 2.0	0.9
Amino acids, proteins	0.2 – 0.4	0.3	0.4 – 0.7	0.6
Acids	0.2 – 0.8	0.5	0.8 – 1.5	1.1
pH value	3.2 – 4.5	3.9	4.5 – 6.5	5.2

*Data in g/100 g of honey, Adapted from [2,3].

Table 2 Chemical elements found in honey*

Minerals	Amount (mg/100 g)	Vitamins	Amount (mg/100 g)
Sodium (Na)	1.6 – 17	Thiamine (B ₁)	0.00 – 0.01
Calcium (Ca)	3 – 31	Riboflavin (B ₂)	0.01 – 0.02
Potassium (K)	40 – 3500	Niacin (B ₃)	0.10 – 0.20
Magnesium (Mg)	0.7 – 13	Pantothenic acid (B ₅)	0.02 – 0.11
Phosphorus (P)	2 – 15	Pyridoxine (B ₆)	0.01 – 0.32
Selenium (Se)	0.002 – 0.01	Folic acid (B ₉)	0.002 – 0.01
Copper (Cu) ^a	0.02 – 0.6	Ascorbic acid (C)	2.2 – 2.5
Iron (Fe) ^a	0.03 – 4	Phyllochinon (K)	0.025
Manganese (Mn) ^a	0.02 – 2		
Chromium (Cr) ^a	0.01 – 0.3		
Zinc (Zn) ^a	0.05 – 2		

*Adapted from [2,3] ^aHeavy metals.

Table 3 Other chemical elements found in honey*

Element	Amount (mg/100 g)	Element	Amount (mg/100 g)
Aluminium (Al)	0.01 – 2.4	Lead (Pb) ^{a,b}	0.001 – 0.03
Arsenic (As) ^{a,b}	0.014 – 0.026	Lithium (Li)	0.225 – 1.56
Barium (Ba)	0.01 – 0.08	Molybdenum (Mo) ^a	0 – 0.004
Boron (B)	0.05 – 0.3	Nickel (Ni) ^a	0 – 0.051
Bromine (Br)	0.4 – 1.3	Rubidium (Rb)	0.040 – 3.5
Cadmium (Cd) ^{a,b}	0 – 0.001	Silicon (Si)	0.05 – 24
Chlorine (Cl)	0.4 – 56	Strontium (Sr)	0.04 – 0.35
Cobalt (Co) ^a	0.1 – 0.35	Sulphur (S)	0.7 – 26
Fluoride (F)	0.4 – 1.34	Vanadium (V)	0 – 0.013
Iodide (I)	10 – 100	Zirconium (Zr)	0.05 – 0.08


*Adapted from [2,3] ^aHeavy metals.

^bToxic heavy metals listed amongst the first 20 top hazardous substances in the priority list compiled by ATSDR thus 1 : Ar, 2 : Pb, 7 : Cd; Presence and toxicity in NH can be due to contamination through human error or inimical practices.

Fig. 15 - Tabelle nutrizionali del miele (da Ajibola *et al.*, 2012)

Il miele è largamente utilizzato dalla medicina tradizionale in diverse culture, sebbene il suo impiego prevalente sia connesso con il suo ruolo di dolcificante. Infatti la sua composizione chimica gli permette di avere non solo un alto valore nutritivo, ma anche interessanti proprietà biologiche (Molan e Betts, 2004).

Il suo effetto benefico sull'apparato digerente e su quello respiratorio, la sua attività antibiotica unita a numerosi altri peculiari benefici sulla salute (Krell, 1996), permettono di classificare il miele come alimento nutraceutico. È piuttosto diffusa l'abitudine di attribuire ad ogni miele uniflorale, soprattutto quelli provenienti da piante officinali, particolari proprietà terapeutiche (Fig.16).



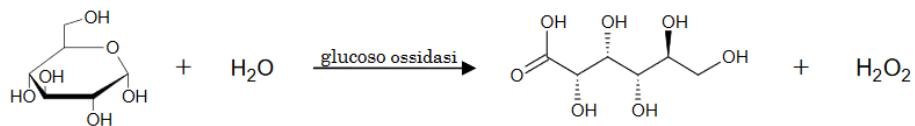
Tipo di miele	Colore e aspetto	Proprietà
Acacia	Miele chiaro, quasi trasparente, liquido	Disintossica il fegato, disinfiamma la gola, lassativo
Castagno	Ambrato, molto scuro, liquido trasparente	Disinfetta vie urinarie, favorisce la circolazione, consigliato in casi di anemia
Millefiori	Dal bianco all'ambrato, di norma cristallizza	Antinfiammatorio per la gola, tonificante
Tiglio	Da ambrato chiaro a scuro, cristallizzato fine	Calmante della tosse, sedativo, lievemente diuretico
Rododendro	Miele chiaro e cristallizzato omogeneo	Utile per curare bronchiti, ricostituente, combatte l'artrite
Agumi	Chiaro, quasi lucido, cristallizza in vari modi	Sedativo, utile per l'insonnia, ricco di vitamine e di calcio.
Eucalipto	Ambrato, cristallizzato fine e compatto	Calmante della tosse, cura il raffreddore, anticatarrale e antibiotico
Rosmarino	Miele bianco e cristallizzato molto fine	Cura il fegato e la colite, utile in caso di affaticamento
Tarassaco	Giallo vivo tendente al beige, cristallizzato fine	Indicato per sportivi, depura le vie urinarie e protegge il fegato
Girasole	Giallo paglierino vivo, cristallizzato fine	Ricalcificante delle ossa, combatte il colesterolo
Melata	Molto scuro, quasi nero, solitamente liquido	Utile per bronchiti e faringiti, antisettico delle vie respiratorie
Lavanda	Chiaro e ambrato, cristallizzato molto fine	Utile contro l'insonnia, digestivo, analgesico, calma le punture d'insetto

Fig. 16 - Proprietà terapeutiche attribuite ai mieli uniflorali

3.2.1 Attività antimicrobica e antibatterica

L'attività antimicrobica è presente in tutti i tipi di miele (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010). Il miele naturale può essere considerato un antibiotico di ampio spettro molto potente.

La proprietà antibatterica del miele non può essere ricondotta ad un unico elemento, ma i fattori da prendere in considerazione sono molteplici. Uno di questi è la concentrazione di zuccheri: se è molto elevata, gli agenti patogeni vengono privati dell'acqua (elemento vitale) per osmosi. Un altro fattore da considerare è il pH acido, dovuto principalmente alla presenza di acidi organici (prevalentemente acido gluconico), compreso fra 3,4 e 4,5, il quale impedisce la riproduzione batterica. Tuttavia, i mieli di castagno e di melata hanno un pH che varia tra 5 e 6, e il miele liquefatto ha una concentrazione di zuccheri relativamente bassa, ma tale da impedire comunque la proliferazione degli agenti patogeni. Di conseguenza, la proprietà antibatterica non è riconducibile solo all'elevata concentrazione zuccherina o al pH acido. Nel miele sono state identificate delle sostanze, dette inibine, che svolgono un ruolo determinante in questo ambito. L'acqua ossigenata è considerata la principale inibina del miele e viene prodotta dalla seguente reazione:



L'enzima glucosio ossidasi, in presenza di acqua, provoca l'ossidazione del glucosio con formazione di acido gluconico e acqua ossigenata. La glucosio ossidasi è un enzima prodotto da una ghiandola specifica delle api. Il suo antagonista è l'enzima catalasi, il quale scinde il perossido di idrogeno rispettivamente in acqua e ossigeno.

La concentrazione di perossido di idrogeno presente nel miele dipende dall'attività di questi due enzimi. L'azione della glucosio ossidasi è inibita dalla presenza di luce o calore, ed inoltre la produzione di acqua ossigenata può avvenire solo in soluzione acquosa. Il miele maturo presenta una concentrazione di acqua troppo bassa e di conseguenza la reazione è bloccata (può avvenire solo nel miele immaturo, più ricco di acqua). Pertanto, la concentrazione di acqua ossigenata nel miele maturo è appena sufficiente ad impedire la proliferazione batterica. Per spiegare la proprietà antibatterica del miele maturo si devono prendere in considerazione le

inibine non perossidi, che sono poco sensibili alla luce e al calore rispetto all'acqua ossigenata, pertanto rivestono un ruolo di notevole importanza nell'attività antibatterica del miele.

Inoltre diverse prove scientifiche suggeriscono l'uso del miele nel controllo e nel trattamento di ferite acute e nelle bruciature, questa proprietà del miele è dovuta alla sua capacità di attivare la risposta immunitaria (proliferazione dei linfociti B e T) che porta al processo di riparazione del tessuto, in più il miele induce la generazione degli anticorpi (Cornara *et al.*, 2017; Meo *et al.*, 2017; Samarghandian *et al.*, 2017).

3.2.2 Proprietà antiossidanti

L'ossidazione è una reazione biochimica che genera radicali liberi, sostanze in grado di danneggiare le cellule, i tessuti e influenzare le normali funzioni fisiologiche dell'organismo. Grazie al suo contenuto in vitamina C, tocoferolo e composti fenolici, il miele ha numerose proprietà antiossidanti con ruolo preventivo verso diverse patologie infiammatorie, cardiovascolari, neurologiche e tumorali, nonché è in grado di rallentare l'invecchiamento cellulare. L'origine botanica del miele influenza profondamente la sua attività antiossidante, la quale è fortemente correlata con il contenuto di fenoli totali.

Inoltre, grazie al suo contenuto in antiossidanti, il miele può essere utilizzato nella conservazione degli alimenti per ritardare l'ossidazione lipidica, come valida alternativa ad alcuni additivi alimentari.

3.2.3 Attività anti-infiammatoria

Questa attività è dovuta alla componente fenolica del miele, in particolare ai flavonoidi come daidzeina, apigenina, genisteina, luteolina, kaempferolo e quercetina per i quali è stata riportata la capacità di inibire il rilascio di citochine ad azione pro-infiammatoria e ridurre le attività della cicloossigenasi-1 e cicloossigenasi-2, modulando così l'infiammazione. In particolare il miele è stato riscontrato essere utile nel trattamento della malattia di Alzheimer, una grave patologia neuro-degenerativa, caratterizzata dall'accumulo di placca beta-amiloide che porta alla progressiva degenerazione dei neuroni. Le ricerche scientifiche mostrano come la pinocembrina, un flavonoide con spiccata azione antiossidante contenuto nel miele, protegge i neuroni dall'azione tossica della placca beta-amiloide e sarebbe anche in grado di interrompere l'avanzamento della degenerazione (Cornara *et al.*, 2017; Meo *et al.*, 2017; Samarghandian *et al.*, 2017).

3.3 Miele di cardo

Tra i mieli uniflorali vi è quello di cardo, un miele piuttosto “di nicchia”, la cui reperibilità non è molto ampia ed è prodotto soprattutto in Sicilia e Sardegna.

Il colore è ambrato, di tonalità piuttosto chiara, con tendenza a cristallizzare nel giro di alcuni mesi dalla raccolta, trasformando il miele in una pasta più compatta dal colore ancora più chiaro. Presenta un aroma molto intenso e ricco, con un’importante nota floreale, dolce e gradevole, unita a una più forte che ricorda il cuoio; alcuni notano aromi che ricordano la cannella. Il sapore, influenzato da questo complesso di aromi, si presenta al palato in modo molto consistente, persistendo per parecchio tempo con un gusto dolce e caratteristico.

Da un punto di vista analitico il miele di cardo è scarsamente caratterizzato e nessuno degli aspetti chimico-fisici può al momento dare indicazioni certe per la definizione dell’origine botanica.

Le principali proprietà del miele di cardo sono le seguenti:

- 1) Ottime qualità digestive;
- 2) Ottimo colagogo: Il miele di cardo aiuta a disintossicare e stimola l’attività epatica migliorando la digestione;
- 3) Alleato del cuore: Il miele di cardo, noto per i suoi benefici effetti sull’apparato circolatorio, è un buon cardio-stimolatore;
- 4) Ricco di vitamine e minerali: Il miele di cardo oltre ad essere una fonte di vitamine e minerali, è ricco di molti altri nutrienti (polifenoli) dalla forza antiossidante, capace di contrastare i temuti radicali liberi all’interno del nostro organismo.



Fig. 13 - Miele di cardo

Essendo il cardo una pianta con alto contenuto di acidi fenolici e flavonoidi e riscontrando dai dati presenti in letteratura che i componenti bioattivi della pianta di origine possono essere trasferiti al miele (Baltrušaitytė *et al.*, 2007), è possibile considerare il miele di cardo una buona fonte di antiossidanti per la dieta.

4. Le api (*Apis mellifera*)

Tra i parametri che influenzano la qualità del miele vi è anche l'utilizzo di particolari tecniche apistiche, adottate per incrementare la produzione e per aumentarne la purezza; il loro pregio consiste nell'unicità delle caratteristiche organolettiche e della composizione del miele. L'utilizzo di diversi genotipi di api può significativamente influenzare la quantità e qualità del miele prodotto.

L'ape ligustica (*Apis mellifera ligustica* Spinola, 1806) è una sottospecie dell'ape mellifera (*Apis mellifera*) ed è la più diffusa in Italia, per tale motivo viene definita ape italiana. Caratterizzata dai segmenti dell'addome giallo-chiaro e una peluria di colore giallo (Foto 4), questa sottospecie si è formata sopravvivendo all'era delle glaciazioni come le sottospecie geneticamente differenti della Spagna e della Sicilia. L'ape ligustica ha origine nel nord Italia, in Liguria e Piemonte. È la più diffusa al mondo tra le api mellifere, per l'apprezzamento che ha tra gli apicoltori, in quanto ha dimostrato di essere adattabile alla maggior parte dei climi dal subtropicale al temperato, seppur con minor adattamento ai climi umidi tropicali. Essendosi evoluta in Italia in una posizione geografica che favorisce la crescita di una vasta gamma di piante nettariifere e povera di predatori di miele, l'ape italiana è tendenzialmente docile. Questa sottospecie è particolarmente laboriosa, caratterizzata da regine precoci, prolifiche e con scarsa tendenza alla sciamatura anche se, di contro, presenta propensione al saccheggio e deriva. Le api italiane consumano una notevole quantità di riserve in inverno e la tendenza alla covata in autunno aumenta il consumo di miele.

L'ape nera sicula (*Apis mellifera sicula*), detta anche "ape sicula", classificata ad opera di Montagano nel 1911, ha l'addome scurissimo, una peluria giallastra e ali più piccole rispetto alla ligustica (Foto 5).

Quest'ape è simile morfologicamente all'ape nera africana (da cui differisce per la minore aggressività) e presenta nel DNA un miotipo genetico africano (Arias e Sheppard, 1996; Sinacori *et al.*, 1998).



Foto 4 - *Apis mellifera ssp. ligustica*



Foto 5 - *Apis mellifera ssp. sicula*

L'ape sicula ha popolato per millenni la Sicilia e poi è stata abbandonata negli anni '70 quando gli apicoltori siciliani iniziarono a importare api ligustiche dal nord Italia, in quegli anni rischiò la totale estinzione, evitata grazie agli studi e alle ricerche di alcuni entomologi siciliani che hanno preso diversi alveari di api nere e li hanno portati alle Isole Eolie di Vulcano, Alicudi e Filicudi, al largo della costa nord orientale della Sicilia, per poterle riprodurre in isolamento, senza il rischio di contaminazione da parte di altre api. L'ape nera sicula è molto docile, tanto che non servono maschere nelle operazioni di smielatura; è molto produttiva anche a temperature elevate (oltre i 40°C) e sopporta bene gli sbalzi di temperatura. Inoltre, l'ape nera possiede una notevole capacità di impollinazione, tale da garantire la persistenza di molte specie di frutta e verdura, alcune delle quali sono in pericolo di estinzione come il nespolo giapponese. Infatti l'ape viene anche utilizzata dai serricoltori per l'impollinazione delle colture protette (angurie, cantalupi, fragole, etc.) essendo nella sua rusticità attiva e funzionale nelle situazioni estreme dei tunnels, in cui si possono avere variazioni di temperatura da 0° gradi della notte a 40° gradi del giorno. È interessante notare l'elevata resistenza fisica dell'ape nera sicula, in comune con le api africane, per la quale si differenzia dalle altre sottospecie, generalmente caratterizzate da una tipica debolezza immunologica (Franck *et al.*, 2000).

L'ape sicula ha consumi di miele molto ridotti, che le consente, a parità di scorte di miele, una maggiore probabilità di sopravvivenza rispetto ad altre api. Inoltre possiede una forte capacità di autodifesa che le permette di non lasciarsi saccheggiare. Il miele di ape nera sicula dal 2008 è Presidio Slow Food, processo avviato da Carlo Amodeo per sollecitare l'attenzione e lanciare un allarme circa il rischio di estinzione di questa preziosa razza autoctona. Recenti studi hanno

evidenziato che il miele prodotto dall'ape nera sicula è caratterizzato da un alto valore nutraceutico, derivante dal contenuto di polifenoli totali e da una maggiore capacità antiossidante rispetto a quanto già riportato per la stessa varietà di mieli prodotti da altre sottospecie di api provenienti da Sicilia, altre regioni italiane e dall'estero (Tenore *et al.*, 2012; Attanzio *et al.*, 2016).

4.1 Bioindicatori di contaminazione ambientale

Le api e i loro prodotti possono essere impiegati come potenziali bioindicatori di contaminazione ambientale (Conti *et al.*, 2001) e possono essere utilizzati per monitorare l'inquinamento da sostanze chimiche quali pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici o metalli pesanti. Tuttavia, non tutti i prodotti delle api possono essere considerati biomarker per l'inquinamento. Nella fattispecie, il miele non è una matrice biologica sensibile per il monitoraggio dei metalli pesanti presenti nell'ambiente. Esso non può indicare il livello di contaminazione dell'aria, dell'acqua, della pianta e del suolo della zona di foraggio delle api, a causa della debole evidenza di bioaccumulo dei metalli. La sua utilità è limitata a casi di contaminazioni ambientali gravi. L'assenza di metalli pesanti nel miele è dovuta alla presenza di un sistema di disintossicazione presente nel sistema digestivo delle api, che coinvolge le metallotioneine (Salvaggio *et al.*, 2017).

Le metallotioneine (MT) sono proteine non enzimatiche con un basso peso molecolare, alto contenuto di cisteina, mancanza di aminoacidi aromatici e stabilità termica. Esse hanno un ruolo nel controllo omeostatico dei metalli essenziali e non essenziali perché i gruppi tiolici dei residui di cisteina permettono alle MT di legare i metalli pesanti. In molte specie è stata dimostrata la sintesi di metallotioneine indotta da contaminanti metallici (Mazzei *et al.*, 2015), suggerendo il potenziale utilizzo di MT come biomarcatori di esposizione metallica. Pertanto, il sistema di disintossicazione è principalmente basato sull'induzione di MT (Salvaggio *et al.*, 2017).

Scopo del lavoro

Il miele ha un effetto benefico sull'apparato digerente e su quello respiratorio, oltre a presentare attività antibiotica unita a numerosi altri peculiari benefici sulla salute, caratteristiche che permettono di classificarlo come alimento nutraceutico. Inoltre ai mieli di provenienza uniflorale, soprattutto quelli provenienti da piante officinali, vengono attribuite particolari proprietà terapeutiche.

Dal cardo (*C. cardunculus* var. *atilis*), pianta ampiamente conosciuta per l'elevata concentrazione di molecole bioattive, si produce in Sicilia e Sardegna un miele uniflorale dalle caratteristiche organolettiche peculiari, miele che in Sicilia è spesso ottenuto mediante l'uso dell'ape sicula.

Considerate le poche conoscenze riguardo la composizione del miele di cardo e l'esigua disponibilità di dati relativi alle proprietà dei mieli prodotti da ape sicula, nell'ambito di questo lavoro si sono volute ampliare le conoscenze riguardo ai vari aspetti che concernono il miele di cardo prodotto da ape sicula. L'obiettivo generale di questa lavoro è stato raggiunto attraverso i seguenti obiettivi specifici:

- 1) Determinare e quantificare l'eventuale passaggio di composti biologicamente attivi di interesse nutraceutico, sintetizzati dal cardo, dalla pianta al polline e al miele da essa ottenuto mediante l'utilizzo di due genotipi di ape (*Apis mellifera ligustica* e *sicula*);
- 2) Valutare l'influenza esercitata dal genotipo di ape sui principali parametri di qualità di mieli di cardo prodotti in purezza in condizioni controllate e di mieli di cardo commerciali;
- 3) Verificare l'eventuale influenza del genotipo di ape sul contenuto fenolico totale e sulla capacità antiossidante in mieli commerciali di varia origine botanica prodotti in Sicilia da ape sicula e ligustica.

Parte Sperimentale

Le attività di ricerca condotte nell'ambito di questa tesi di Dottorato sono state realizzate con il supporto della Sede Secondaria di Catania del Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per i sistemi agricoli e forestali del Mediterraneo (CNR-ISAFOM), che ha messo a disposizione sia i campi di cardo (*Cynara Cardunculus* var. *altilis*), che le apparecchiature scientifiche necessarie per le indagini analitiche, e con l'ausilio del dott. Agronomo Forestale Giuseppe Fugazzotto, che ha fornito, nell'ambito del progetto, le api (sia *Apis mellifera ligustica* che *Apis mellifera sicula*).

Per raggiungere gli obiettivi del presente progetto di ricerca sono state condotte 2 prove sperimentali:

PROVA A

Nel corso della prima prova è stato messo a punto l'impianto destinato alla produzione, in condizioni controllate, di miele di cardo in purezza ottenuto mediante l'utilizzo di due diversi genotipi di ape (*Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera sicula*).

Nella prima parte è stata eseguita l'analisi del contenuto di fenoli e flavonoidi totali e dei metaboliti biologicamente attivi nelle foglie, nel polline di cardo e nel miele da esso ottenuto.

Nella seconda parte è stata effettuata la caratterizzazione dei mieli di cardo prodotti nella prova sperimentale da *Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera sicula* e di mieli di cardo siciliani commerciali prodotti dai due genotipi di ape.

PROVA B

Nel corso della seconda prova è stata effettuata l'analisi del contenuto di fenoli e flavonoidi totali e dell'attività antiossidante (saggi DPPH, FRAP e ABTS) di diversi tipi di miele prodotti in Sicilia da *Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera sicula*, per valutarne la correlazione con l'origine floreale e il tipo di ape utilizzata.

Materiali e metodi

1. Materiale vegetale

Presso il campo sperimentale di cardo (*Cynara cardunculus* var. *altilis*) di 3° anno sito ad Assoro (EN), nella disponibilità del CNR-ISAFOM di Catania, condotto in biologico, si è provveduto all'installazione di un tunnel con rete antinsetto, su un'area di circa 400 m².



Foto 6 - Immagini del campo di *Cynara cardunculus* var. *altilis* utilizzato per la produzione di miele

Verso la fine di aprile, prima della fioritura, è stato effettuato il campionamento delle foglie di alcune piante per eseguire una prima caratterizzazione di molecole bioattive, che da bibliografia risultano presenti nel cardo, e testare l'omogeneità del genotipo di cardo messo in coltura. In particolare da nove piante di cardo, scelte in maniera randomizzata, sono state raccolte due foglie per pianta, una nella parte basale ed una in quella apicale, lungo lo scapo florale in corrispondenza delle principali ramificazioni. Le foglie sono state portate in laboratorio, lavate con acqua corrente, asciugate e suddivise in tre campioni (ciascuno formato dalle foglie di tre piante). Successivamente le foglie sono state ridotte in piccoli pezzi, triturate con azoto liquido, mediante pestello e mortaio, e sottoposte ad estrazione.



Foto 7 - Preparazione del campione (foglie di *Cynara cardunculus* var. *altilis*)

In considerazione delle difficoltà tecniche per il campionamento del nettare, le analisi sono state condotte su polline. Durante il periodo di fioritura è stato effettuato il campionamento di polline di cardo. È stato raccolto un congruo numero di capolini presenti nel tunnel e successivamente in laboratorio, in condizioni controllate, è stato campionato il polline, raccolto in 3 piastre Petri e conservato a -80°C in attesa di analisi.



Foto 8 - Campo di cardo interno al tunnel



Foto 9 - Preparazione del campione (polline di *Cynara cardunculus* var. *altilis*)

2. Miele

Miele in purezza

Al fine di produrre il miele di cardo, verso la fine di giugno all'interno del tunnel sono state inserite 2 arnie, una di *Apis mellifera ligustica* (circa 60.000 api) e l'altra di *Apis mellifera sicula* (circa 40.000 api). Le due arnie sono state posizionate alle due estremità del tunnel per evitare il rischio di deriva delle api operaie.



Foto 10 – Operazioni di posizionamento delle arnie all'interno del tunnel

Il campionamento di miele di cardo prodotto in purezza dalla ligustica e dalla sicula è stato effettuato dopo circa 20 giorni, in corrispondenza della fine del periodo di fioritura. I telaini da melario contenenti il miele (3 telaini di miele prodotto dalla sicula e 2 telaini di miele prodotto dalla ligustica) sono stati trasportati in laboratorio ed immediatamente conservati a -80°C , in attesa di analisi.



A



B

Foto 11 – Arnie di *Apis mellifera ligustica* (A) e *Apis mellifera sicula* (B)



Foto 12 - Telaino da melario con miele di ape nera sicula

Mieli commerciali

In totale sono stati reperiti 19 mieli siciliani, di cui 8 prodotti da ape ligustica e 11 da ape nera sicula. In particolare le fonti floreali e il numero di campioni prelevati sono stati i seguenti: 6 di cardo (4 di ape sicula e 2 di ape ligustica), 3 di eucalipto (2 di ape sicula e 1 di ape ligustica), 2 di sulla (1 di ape sicula e 1 di ape ligustica), 2 di arancio (1 di ape sicula e 1 di ape ligustica), 2 di ferula (1 di ape sicula e 1 di ape ligustica), 2 di castagno (1 di ape sicula e 1 di ape ligustica) e 2 millefiori (1 di ape sicula e 1 di ape ligustica).

I mieli, prodotti in diverse zone della Sicilia (Fig.17), sono stati ottenuti direttamente da apicoltori siciliani. Questi campioni sono stati raccolti tenendo presente il periodo dell'anno e i luoghi in cui ogni campione di miele è stato prodotto e sono stati certificati come uniflorali tramite l'analisi melissopalinologica (Louveaux *et al.*, 1978).

I mieli sono stati conservati in barattoli di vetro, a 4°C e al buio fino al momento delle analisi (circa 4 mesi).

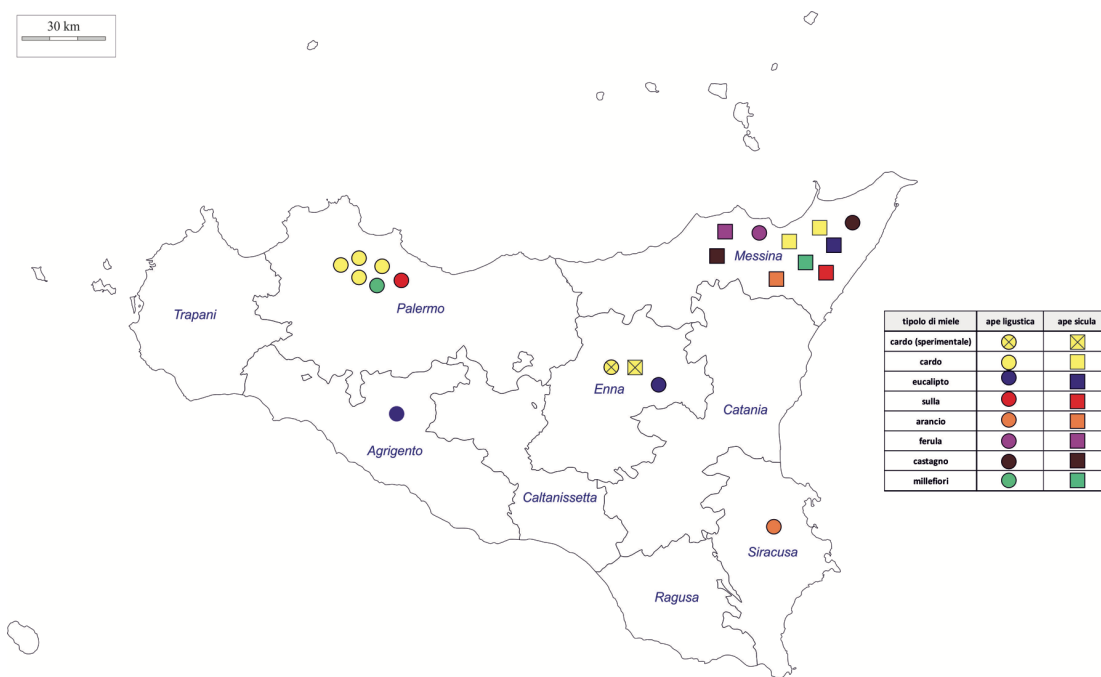


Fig. 17 – Zone di produzione dei mieli analizzati

3. Reagenti e standard

Tutti i prodotti chimici e i reagenti utilizzati erano di grado analitico o di grado HPLC. L'acqua utilizzata (Tipo I) per la preparazione dei campioni e per l'analisi di carboidrati e cationi inorganici è stata prodotta tramite un sistema di purificazione dell'acqua Milli-Q (Millipore, MA, USA) prima dell'uso. Per l'analisi HPLC sono stati utilizzati acqua, metanolo, acido formico e acetonitrile di grado HPLC acquistati da Merck (Darmstadt, Germany). Apigenina, apigenin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-rutinoside, luteolina, luteolin-7-O-glucoside, acido 3-O-caffeilchinico (acido clorogenico), acido 5-O-caffeilchinico (acido neoclorogenico), acido 1,5-O-dicaffeilchinico (cinarina), acido gallico e quercetina sono stati acquistati da Extrasynthese (Genay, Francia). Apigenin-7-O-glucuronide, luteolin-7-O-glucuronide, fruttosio, glucosio, saccarosio, soluzioni standard 1000 mg l⁻¹ di sodio, potassio, magnesio e calcio, acido metansolfonico, idrossido di sodio, Folin-Ciocalteu, carbonato di sodio, nitrito di sodio, alluminio cloruro, 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH), acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ), potassio persolfato e Trolox, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le cartucce SPE Strata-X (200 mg/ 3ml) sono state ottenute da Phenomenex (Torrance, CA, USA). I filtri PTFE per siringa (0,20 µm) e filtri a membrana in Nylon (0,45 µm) sono stati acquistati da Supelco (Bellafonte, PA).

4. Preparazione del campione

4.1 Foglie di cardo

I tre campioni di foglie di cardo e le relative repliche (3 repliche per ogni campione) sono stati sottoposti al processo di estrazione dei composti fenolici tramite l'uso di ultrasuoni (sonicazione), una tecnica utilizzata per potere disgregare a livello molecolare la struttura cellulare e migliorare l'efficienza estrattiva. L'estrazione è stata condotta seguendo il protocollo di Lucini *et al.* (2016) con qualche modifica:

1 g di campione di foglie macinate è stato addizionato con 10 ml di una soluzione metanolica 80% (v/v) e sottoposto a sonicazione per 30 minuti. L'estratto è stato centrifugato, filtrato (0,20 μm) e sottoposto ad analisi.

4.2 Polline di cardo

I tre campioni di polline di cardo e le relative repliche (3 repliche per ogni campione) sono stati sottoposti al processo di estrazione dei composti fenolici, seguendo il protocollo di Kaskoniene *et al.* (2014) con piccole modifiche:

0.2 g di campione di polline è stato addizionato con 4 ml di una soluzione metanolica 80% (v/v) e sottoposto a sonicazione per 30 min. L'estratto è stato centrifugato, filtrato (filtro 0,20 μm) e sottoposto ad analisi.

4.3 Miele

I campioni di miele sono stati sottoposti a diversi tipi di estrazione in base al tipo di analisi:

- 1) Per effettuare le analisi di pH, carboidrati e minerali, il miele è stato sciolto in acqua ultrapura. In particolare:
 - per l'analisi del pH si è seguito il protocollo di Bogdanov (2009) sciogliendo 10 g di miele in 75 ml di acqua ultrapura;
 - per l'analisi dei carboidrati si è seguito il protocollo di Bogdanov (2009) sciogliendo 0,1 g di miele in 100 ml di acqua ultrapura. La soluzione ottenuta è stata filtrata (0,45 μm) prima dell'analisi;
 - per l'analisi del contenuto minerale è stato seguito il protocollo di Poiana *et al.* (1996)

sciogliendo 1 g di miele in 100 ml di acqua ultrapura e filtrando (0,20 μm) la soluzione prima dell'analisi;

- 2) Per quel che concerne le analisi di Fenoli Totali, Flavonoidi Totali, composizione fenolica (HPLC-UV/Vis) e attività antiossidante (DPPH, FRAP e ABTS), si è scelto di seguire il protocollo di Michalkiewicz *et al.* (2008) utilizzando cartucce SPE Strata-X, che permettono l'estrazione dei polifenoli e la rimozione degli interferenti. Nel dettaglio:

5 g di miele sono stati sciolti in 50 ml di acqua ultrapura acidificata con HCl (pH=2). La soluzione, dopo agitazione di 15 min, è stata passata attraverso una cartuccia SPE preconditionata con 5 ml di metanolo e 5 ml di acqua ultrapura. Dopo il passaggio del campione la cartuccia è stata lavata prima con 5 ml di acqua acidificata con HCl (pH=2) e dopo con 5 ml di acqua ultrapura per rimuovere tutti gli zuccheri e altri composti polari presenti nel miele. Infine la frazione fenolica è stata eluita con 5 ml di metanolo, l'estratto è stato filtrato (filtri a siringa PTFE, 0,20 μm) e sottoposto alle diverse analisi.

5. Analisi

5.1 Contenuto di Fenoli Totali

Per la determinazione del contenuto in fenoli totali (TPC) è stato utilizzato il reattivo di Folin-Ciocalteu, una miscela ossidante di colore giallo a base di acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e acido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). L'agente ossidante Folin reagisce con i gruppi ossidrilici dei composti fenolici presenti nel campione e con altre molecole antiossidanti come l'acido ascorbico. I composti fenolici in ambiente basico vengono ossidati dai metalli molibdeno e tungsteno presenti nei complessi ed assumono la colorazione blu, dovuta alla riduzione dei metalli, che viene misurata mediante uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 760 nm. Per la determinazione del TPC è stato seguito il protocollo proposto da Dewanto *et al.* (2002) con alcune modifiche.

Un' aliquota (0,125 ml) di ciascun estratto è stato addizionata con 0,625 ml di reagente di Folin-Ciocalteu (diluito 5 volte con H_2O deionizzata), sottoposta ad agitazione e lasciata riposare per 6 minuti. In seguito sono stati aggiunti 1,25 ml di soluzione acquosa di Na_2CO_3 al 7% e 1 ml di H_2O deionizzata. La miscela di reazione dopo agitazione è stata posta al buio a temperatura ambiente per 60 minuti. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla determinazione spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 760 nm tramite lo spettrofotometro UV/Vis BioSpectrometer (Eppendorf, Amburgo, Germania). Per il calcolo del contenuto in fenoli totali è stata necessaria la determinazione di una curva di taratura ($R^2=0,9987$) ottenuta da concentrazioni note di acido gallico in soluzione metanolica 80% (25-200 $mg\ l^{-1}$). I risultati sono stati riportati come valore medio di tre repliche ed espressi in mg di acido gallico equivalente (GAE) $100\ g^{-1}$ di peso fresco.

5.2 Contenuto di Flavonoidi Totali

Il metodo dell'alluminio cloruro, introdotto da Smirnova *et al.* (1998) permette di determinare il contenuto di flavonoidi totali, separando il loro contributo da quello dei polifenoli. Il principio si basa sul fatto che l'alluminio cloruro è in grado di formare complessi con i flavonoidi che possiedono gruppi orto-diidrossi, peri-idrossi-osso e orto-idrossi-osso. Il metodo è però limitato all'identificazione di alcune sottoclassi di flavonoidi, i flavoni (flavonoidi che contengono un carbonile in C4) e flavonoli (flavoni che contengono un ossidrilico in C3), che possiedono le caratteristiche strutturali indispensabili per la formazione di complessi con l'alluminio (Chang

et al., 2002). Utilizzando questo metodo si ha quindi una sottostima del contenuto di flavonoidi totali presenti nel campione, perché alcune sottoclassi non vengono rilevate.

Per la determinazione del contenuto in flavonoidi totali (TFC) è stato seguito il protocollo proposto da Zhishen *et al.* (1999) con alcune modifiche.

Aliquote di estratto (100 μ l) o di standard sono state mescolate con acqua distillata (volume finale 4 ml). Al tempo zero sono stati aggiunti 0,30 ml di soluzione acquosa di NaNO₂ (5%, w/v), seguiti, dopo 5 minuti, da 0,30 ml di soluzione acquosa di AlCl₃ (10%, w/v) e successivamente, dopo 6 minuti, da 2 ml di NaOH (1M). Il volume è stato immediatamente portato a 10 ml con acqua ultrapura, la miscela è stata agitata vigorosamente e l'assorbanza è stata misurata a 510 nm utilizzando lo spettrofotometro UV/Vis BioSpectrometer (Eppendorf, Amburgo, Germania). Per il calcolo del contenuto in flavonoidi totali è stata effettuata una curva di taratura ($R^2=0,9965$) ottenuta da concentrazioni note di quercetina in metanolo (20-100 mg l⁻¹). I risultati sono stati riportati come valore medio di tre repliche ed espressi in mg di quercetina equivalente (QE) 100 g⁻¹ di peso fresco.

5.3 Analisi HPLC con UV/Vis a 4 λ

La composizione fenolica negli estratti di foglie, polline e miele di cardo è stata analizzata utilizzando un HPLC Dionex U3000 (Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA) composto da pompa a gradiente quaternario, vano termostatazione colonna, autocampionatore e rivelatore UV/Vis a 4 lunghezze d'onda, il tutto gestito dal software Chromeleon. Per il metodo è stato seguito quello di Määttä *et al.* (2003) con alcune modifiche. La separazione dei composti è stata eseguita su una colonna C18 (Acclaim 120, 4,6x150 mm; 3 μ m) fornita da Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA) mediante un programma a gradiente, con un flusso di 0,8 ml min⁻¹, alla temperatura di 30°C e con un volume d'iniezione di 20 μ l.

Le fasi mobili erano costituite da acqua e acido formico (99:1, v/v) (eluente A) e da acetonitrile (eluente B). Il gradiente iniziava con il 5% di B per raggiungere il 20 % di B a 5 minuti, mantenere il 20% fino a 10 minuti per poi raggiungere il 30% di B a 11 minuti, il 60% a 20 minuti, il 90% a 25 minuti e mantenere il 90% fino a 29 minuti, per poi tornare alle condizioni iniziali a 35 minuti. Sono state impostate 3 lunghezze d'onda: 280, 310 e 350 nm. I picchi sono stati identificati sulla base della comparazione dei tempi di ritenzione di standard esterni. La quantificazione è stata eseguita mediante la creazione di una curva di calibrazione e la conferma della presenza degli analiti è stata eseguita utilizzando il metodo dell'aggiunta standard. Con questo metodo

aggiungendo al campione precedentemente analizzato un'aliquota nota di standard e misurando il tempo di ritenzione cromatografico del picco che aumenta le dimensioni, è possibile confermare la presenza dell'analita nel campione.

Tutti gli standard utilizzati (acido neoclorogenico, acido clorogenico, cinarina, luteolina, apigenina, luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside, luteolin-7-O-glucuronide, apigenin-7-O-glucuronide, apigenin-7-O-rutinoside) sono stati sciolti in metanolo alla concentrazione di 1 mg ml^{-1} e conservati a -20°C . Le curve di calibrazione (range $0,5\text{-}100 \text{ mg ml}^{-1}$) delle aree dei picchi hanno mostrato una buona correlazione lineare con $R^2 > 0,999$. Le deviazioni standard relative (RSD%) dei valori dei tempi di ritenzione dei picchi sono risultate inferiori a 0,5%, dimostrando una buona stabilità e riproducibilità dell'analisi mediante HPLC-UV. Tra i composti ricercati, i 3 acidi fenolici sono stati identificati e quantificati alla λ 310, mentre i 7 flavonoidi alla λ 350.

I risultati sono stati riportati come valore medio \pm deviazione standard di tre repliche ed espressi come $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ di peso fresco.

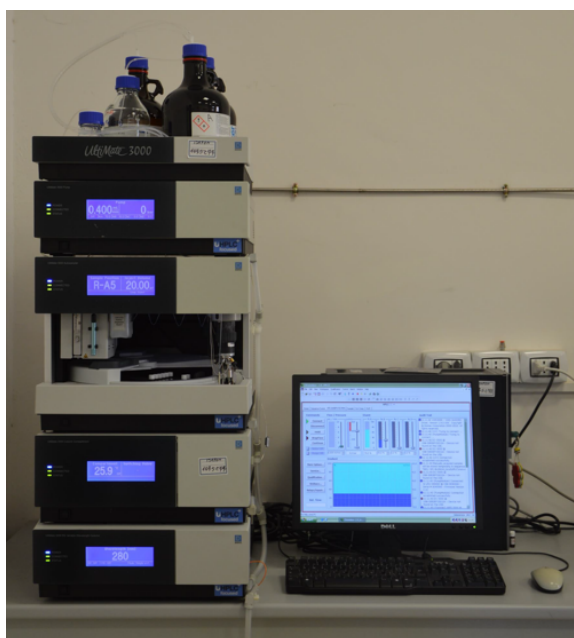


Foto 13 - Sistema di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

5.4 pH

Il pH è stato misurato su una soluzione acquosa di miele mediante un pHmetro digitale (XS Instruments mod. PC510 at 20 °C), precedentemente tarato con soluzioni tampone a pH 4 e pH7.

5.5 Minerali

Per l'analisi del contenuto minerale è stato seguito il protocollo di Poiana et al. (1996) utilizzando la cromatografia ionica con rivelatore conduttimetrico in presenza di soppressore e analizzando i costituenti minerali più importanti: Na, K, Mg, e Ca.

Tale tecnica analitica risulta facile, veloce, presenta elevata sensibilità e minimizza le operazioni analitiche sulla matrice da sottoporre ad indagine.

Per l'analisi è stato impiegato un cromatografo ionico Thermo Scientific Dionex ICS3000 (Sunnyvale, CA, USA), composto da una pompa isocratica, un soppressore cationico, un rivelatore conduttimetrico, una valvola di iniezione con un loop da 25 μl e un vano termostatazione colonna. Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna analitica Dionex CS12A (4 x 250 mm) e una precolonna CG12A (4 x 50 mm), mantenendo la temperatura a 30°C durante l'analisi. I cationi inorganici sono stati eluiti isocraticamente con una soluzione di acido metansolfonico 20 mM ad un flusso di 1 ml min⁻¹. La corsa cromatografica ha avuto una durata di 20 min e i picchi di Na, K, Mg e Ca sono stati identificati sulla base della comparazione dei tempi di ritenzione di standard esterni. La quantificazione è stata eseguita mediante la creazione di una curva di calibrazione (range 0,5-100 mg l⁻¹). Le curve di calibrazione delle aree dei picchi hanno mostrato una buona correlazione con $R^2 > 0,999$. Le deviazioni standard relative (RSD%) dei valori dei tempi di ritenzione dei picchi sono risultate < 0,5%.

I risultati sono stati riportati come valore medio \pm deviazione standard di tre repliche ed espressi come mg 100 g⁻¹ di miele.

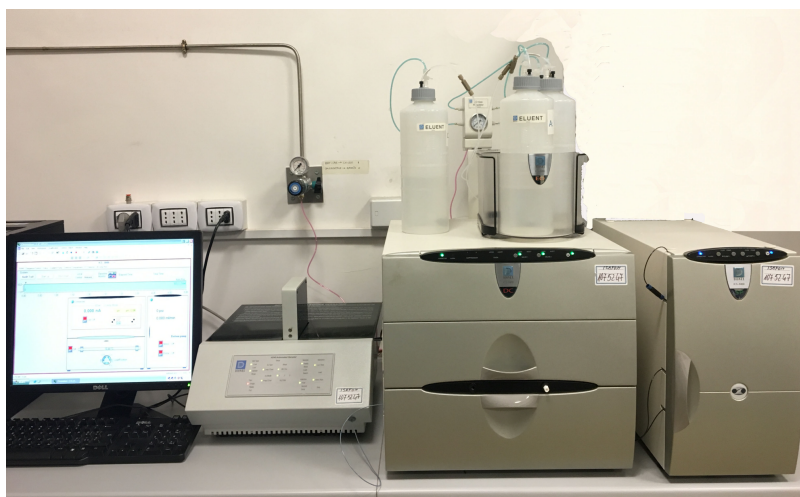


Foto 14 - Sistema di cromatografia ionica a doppio canale per analisi di cationi inorganici e carboidrati

5.6 Carboidrati

Per l'analisi dei carboidrati si è scelto di utilizzare il metodo cromatografico con detector amperometrico HPAE-PAD per l'alta risoluzione e selettività di questa tecnica. L'analisi è stata condotta mediante un cromatografo ionico Thermo Scientific Dionex ICS3000 (Sunnyvale, CA, USA)(Foto 14), composto da una pompa inerte a gradiente quaternario, un rivelatore ad amperometria pulsata con elettrodo d'oro, una valvola di iniezione con un loop da 25 μl , un autocampionatore AS40 e un vano termostatazione colonna. Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna analitica Dionex CarboPac PA10 (4 x 250 mm) e una precolonna CarboPac PA10 (4 x 50 mm), mantenendo la temperatura a 30°C durante l'analisi. I carboidrati sono stati eluiti isocraticamente con una fase mobile NaOH 100 mM ad un flusso di 0,80 ml min^{-1} .

La corsa cromatografica ha avuto una durata di 30 min, 20 min per l'analisi e 10 min per il condizionamento. I picchi di glucosio, fruttosio e saccarosio sono stati identificati sulla base della comparazione dei tempi di ritenzione di standard esterni. La quantificazione è stata eseguita mediante la creazione di una curva di calibrazione. Gli standard sono stati sciolti in acqua alla concentrazione di 1 mg ml^{-1} e conservati a -20°C. Le curve di calibrazione (range 0,5-100 mg l^{-1}) delle aree dei picchi hanno mostrato una buona correlazione con $R^2 > 0,999$. Le deviazioni standard relative (RSD%) dei valori dei tempi di ritenzione dei picchi sono risultate $< 0,7\%$.

I risultati sono stati riportati come valore medio \pm deviazione standard di tre repliche ed espressi come mg 100 g⁻¹ di miele.

Sono stati valutati inoltre i parametri F+G e F/G, che in letteratura vengono considerati utili indicatori per la classificazione di mieli monoflora (Persano Oddo *et al.*, 1995, 2004). Il rapporto F/G permette anche di valutare la tendenza del miele a cristallizzare. Mieli con un basso rapporto F/G cristallizzano più rapidamente, mentre mieli con un alto rapporto F/G (contenenti meno del 30% di glucosio) cristallizzano molto lentamente e restano liquidi per lungo tempo senza speciali trattamenti (Escuredo *et al.*, 2014; Oddo *et al.*, 1995).

5.7 Attività antiossidante

Per valutare l'attività antiossidante del miele sono stati utilizzati tre differenti metodi.

I test DPPH e ABTS misurano l'attività di scavenging dei radicali liberi dei campioni in soluzione, donando un elettrone (Huang *et al.*, 2005). Il saggio FRAP è considerato un utile indicatore della capacità antiossidante per contrastare il danno ossidativo a causa di ROS (Kucuk *et al.*, 2007) e fornisce una stima diretta dei riducenti presenti in un campione, basandosi sulla capacità dell'analita di ridurre la coppia Fe³⁺/Fe²⁺.

Per mettere a confronto i risultati ottenuti è stato utilizzato per ciascun metodo il Trolox come standard di riferimento. I risultati sono stati espressi come mmol di Trolox Equivalente (TE) 100 g⁻¹ di miele.

5.7.1 Saggio DPPH

I radicali liberi sono responsabili del danno ossidativo e sono noti per causare diversi disturbi degenerativi come mutagenesi, carcinogenesi, disturbi cardiovascolari ed invecchiamento, contro di essi agiscono gli antiossidanti che si trovano naturalmente in molti alimenti e pertanto è importante conoscerne il contenuto e la loro efficacia per la conservazione o la protezione contro il danno ossidativo.

La determinazione dell'attività antiossidante è stata effettuata attraverso il metodo DPPH descritto da Bland-William con alcune modifiche.

Questo metodo prevede l'uso di una soluzione di DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile), radicale organico azotato lievemente stabile nei confronti delle radiazioni solari, dovuto al fatto che l'elettrone spaiato situato sull'atomo di azoto viene stabilizzato per risonanza sull'anello

aromatico, inoltre la presenza di gruppi stericamente ingombranti come quelli fenoli e quelli nitro, conferiscono ulteriore stabilità allo stesso radicale (Fig. 18).

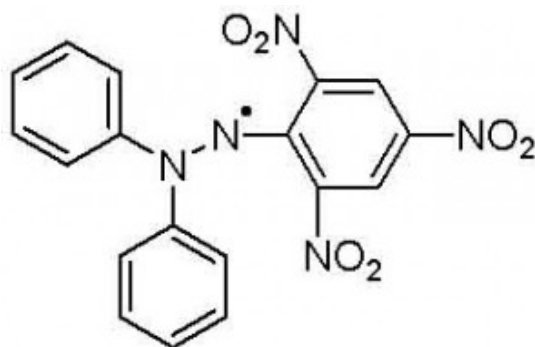


Fig. 18 - 2,2-difenil-1-picrilidrazile

In particolare la funzione dei nitro gruppi è quella di far sì che il composto possa essere letto mediante uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 517 nm (Molyneux *et al.*, 2004).

Il DPPH• si fa reagire con un composto antiossidante in grado di cedere un atomo di idrogeno al composto radicalico, in questo modo si verifica una decolorazione della soluzione dovuta alla scomparsa del radicale che verrà misurata attraverso lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento (λ_{\max} = 517 nm). Inoltre, la misurazione avviene a temperatura ambiente in modo da eliminare il rischio di degradazione termica delle molecole testate. Tuttavia, il meccanismo di reazione tra l'antiossidante e il DPPH• dipende dalla conformazione strutturale dell'antiossidante (Bondet *et al.*, 1997).

Questo metodo è limitato dal fatto che il radicale DPPH• interagisce con altri radicali e la curva di risposta temporale per raggiungere lo stato stazionario non è lineare, con differenti rapporti di antiossidanti/DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995; Sanchez-Moreno *et al.*, 1998). Il DPPH è sensibile ad alcune basi di Lewis e tipi di solventi così come l'ossigeno (Ancerewicz *et al.*, 1998). L'assorbimento di DPPH in metanolo e acetone diminuisce in presenza di luce (Min, 1998). Un altro limite di questo metodo è dato dal fatto che la reazione tra DPPH e l'antiossidante dipende dall'accessibilità dell'antiossidante nei confronti del sito radicalico. Le molecole meno ingombranti stericamente possono avere un valore antiossidante più elevato rispetto a quello reale (Prior *et al.*, 2005).

L'attività antiossidante è stata determinata utilizzando il metodo di Brand-Williams *et al.* (1995). Un'aliquota di estratto di miele (50 μ l) è stata addizionata con 3 ml di DPPH da 0,05 mM in

metanolo. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti al buio, l'assorbanza della miscela è stata misurata a 517 nm. Il metanolo è stato utilizzato come bianco.

Per la quantificazione è stata effettuata una curva di calibrazione con Trolox ($R^2=0,9992$). Sono state preparate 5 soluzioni standard ($10-200 \mu\text{mol l}^{-1}$) in metanolo, fatte reagire con DPPH ed effettuata la lettura a 517 nm.

I risultati sono stati riportati come valore medio \pm deviazione standard di tre repliche ed espressi come mmol di Trolox Equivalente (TE) 100 g^{-1} di miele.

5.7.2 Saggio ABTS

Questo metodo permette di determinare il potere antiossidante di diverse matrici biologiche (estratti acquosi di alimenti, bevande, succhi di frutta/verdura, plasma, saliva, etc.) tramite la reazione fra il campione da analizzare e un radicale catione. In questo saggio, il radicale catione colorato e stabile ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) viene generato mediante l'ossidazione del sale di diammonio dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonico) (ABTS) per mezzo di una soluzione di potassio persolfato ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Questo radicale catione ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) ha un picco di assorbimento a 734 nm.

I composti antiossidanti (AOH) che sono capaci di trasferire un atomo di idrogeno o un elettrone al radicale catione, causano una decolorazione della soluzione. Si analizza quindi all'UV-Vis la diminuzione del picco a 734 nm dell' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ dopo un tempo di incubazione prestabilito (15 min) e questa diminuzione (decolorazione) è proporzionale alla carica antiossidante presente nel campione.

L'attività antiossidante dei campioni di miele con saggio ABTS è stata determinata secondo il metodo descritto da Baltrusaityte *et al.* (2007). L' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ è stato prodotto facendo reagire 50 ml di soluzione ABTS con 200 μl di soluzione acquosa di $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 70 mM. La miscela è stata lasciata al buio a temperatura ambiente per 15-16 ore prima dell'uso. Per la valutazione dell'attività antiossidante, la soluzione $\text{ABTS}^{\bullet+}$ è stata diluita con PBS (tampono fosfato) per ottenere l'assorbanza di $0,800 \pm 0,030$ a 734 nm.

Un'aliquota di estratto (50 μl) di miele è stata mescolata con 3 ml di soluzione $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e l'assorbanza è stata letta dopo 15 min.

I risultati sono stati riportati come valore medio \pm deviazione standard di tre repliche ed espressi come mmol di Trolox Equivalente (TE) 100 g^{-1} di miele.

5.7.3 Saggio FRAP

Il saggio FRAP, acronimo di “Ferric Ion Reducing Antioxidant Power”, fu messo a punto da Benzie e Strain (1996) al fine di valutare a livello clinico la capacità antiossidante del plasma sanguigno, ma da diversi anni è stato impiegato anche per l’analisi di campioni alimentari e botanici.

Il metodo si basa sulla capacità dei vari antiossidanti di ridurre il complesso di Fe(III) 2,4,6-tripiridil-s-triazina (anche indicato come $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$) a Fe(II), $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$ a pH 3,6. Il complesso ridotto è colorato, per cui la reazione può essere monitorata spettrofotometricamente alla lunghezza di massimo assorbimento localizzata intorno a 593nm. Lo svantaggio di tale metodo è che il valore della capacità antiossidante può risultare sistematicamente maggiore se nel campione analizzato sono presenti composti che non appartengono alla famiglia degli antiossidanti, il cui potenziale di riduzione è inferiore a quello della coppia redox Fe(III)/Fe(II).

L'attività antiossidante dei campioni di miele con saggio FRAP è stata determinata secondo il metodo descritto da Benzie e Strain (1996). Il reagente FRAP è stato preparato miscelando una soluzione 10 mmol l⁻¹ di TPTZ in 40 mmol l⁻¹ HCl con cloruro ferrico 20 mmol l⁻¹ e una soluzione tampone di acetato di sodio (pH 3,6) 300 mmol l⁻¹, in rapporto 1:1:10. Aliquote di 50 µl di estratti di miele sono state addizionate con 3 ml della soluzione FRAP e l'assorbanza è stata letta spettrofotometricamente a 593 nm dopo un’incubazione di 10 min. Per la quantificazione è stata creata una curva di calibrazione con Trolox ed i risultati sono stati espressi come mmol di Trolox equivalente (TE) per 100 g di miele.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma software CoSTAT.

Tutti i dati sono stati sottoposti all’analisi della varianza (ANOVA) previa misura dell’omogeneità della varianza mediante test di Bartlett. In caso di F significativo è stato applicato il metodo di separazione delle medie di Student - Newman – Keuls. Le differenze tra i caratteri sono state calcolate con un valore di $P \leq 0,05$. Il grado di relazione lineare tra due variabili è stato misurato con il coefficiente di correlazione di Pearson (r) (Snedecor and Cochran, 1989).

Risultati e discussione

1. PROVA A

Nell'ambito di questa prova è stato verificato il trasferimento di molecole bioattive dalla pianta di *Cynara cardunculus* var. *atilis* DC. al miele da essa ottenuto ed è stata valutata l'influenza dell'origine botanica e del genotipo di ape sulla composizione del miele di cardo prodotto in purezza e commerciale.

I PARTE

Nella prima parte è stato analizzato il contenuto di fenoli e flavonoidi totali nelle foglie e nel polline di cardo e nel miele da esso ottenuto. Inoltre è stata effettuata l'analisi qualitativa e quantitativa (mediante HPLC-UV/Vis) dei composti fenolici più rappresentativi del cardo sia nelle foglie e nel polline, che nel miele di cardo prodotto in purezza nell'ambito di questo progetto di ricerca.

➤ **Contenuto di Fenoli e Flavonoidi Totali**

Foglie e polline di cardo

I contenuti di fenoli totali presenti nelle foglie e nel polline delle piante di cardo coltivate all'interno della serra destinata alla produzione di miele, sono risultati nella media pari a 61,76 e 432,03 mg GAE 100 g⁻¹ di peso fresco.

Per quanto riguarda il contenuto di flavonoidi totali, le foglie e il polline di cardo hanno mostrato nella media valori rispettivamente di 13,83 e 100,78 mg QE 100 g⁻¹ di peso fresco.

Miele di cardo

Il contenuto di fenoli totali rilevato nel miele di cardo è risultato, nella media dei due genotipi di ape, pari a 62,53 mg GAE 100 g⁻¹ di peso fresco; questo carattere è stato significativamente influenzato dal genotipo di ape che ha prodotto i miele, con valori nella media di 91,92 e 33,14 mg GAE 100 g⁻¹ rispettivamente per miele di ape sicula e ligustica.

Per quanto concerne il contenuto in flavonoidi totali il miele di cardo ha presentato, nella media dei genotipi di ape, un valore pari a 25,73 mg QE 100 g⁻¹ di peso fresco. Anche per questo

carattere il genotipo di ape ne ha significativamente influenzato il contenuto nel miele, con valori di 32,74 mg QE 100 g⁻¹ per quello di ape sicula e di 18,73 mg QE 100 g⁻¹ di peso fresco per quello prodotto da ape ligustica.

Mentre per il dato relativo al contenuto nelle foglie di cardo questo risulta in linea con quanto riportato da diversi autori (Ramos *et al.*, 2014; Pandino *et al.*, 2011), per quanto riguarda il contenuto nel polline di cardo la caratterizzazione di questa matrice, condotta per la prima volta nell'ambito della presente ricerca, dimostra che il polline è la componente della pianta di cardo con il più alto contenuto di fenoli e flavonoidi totali.

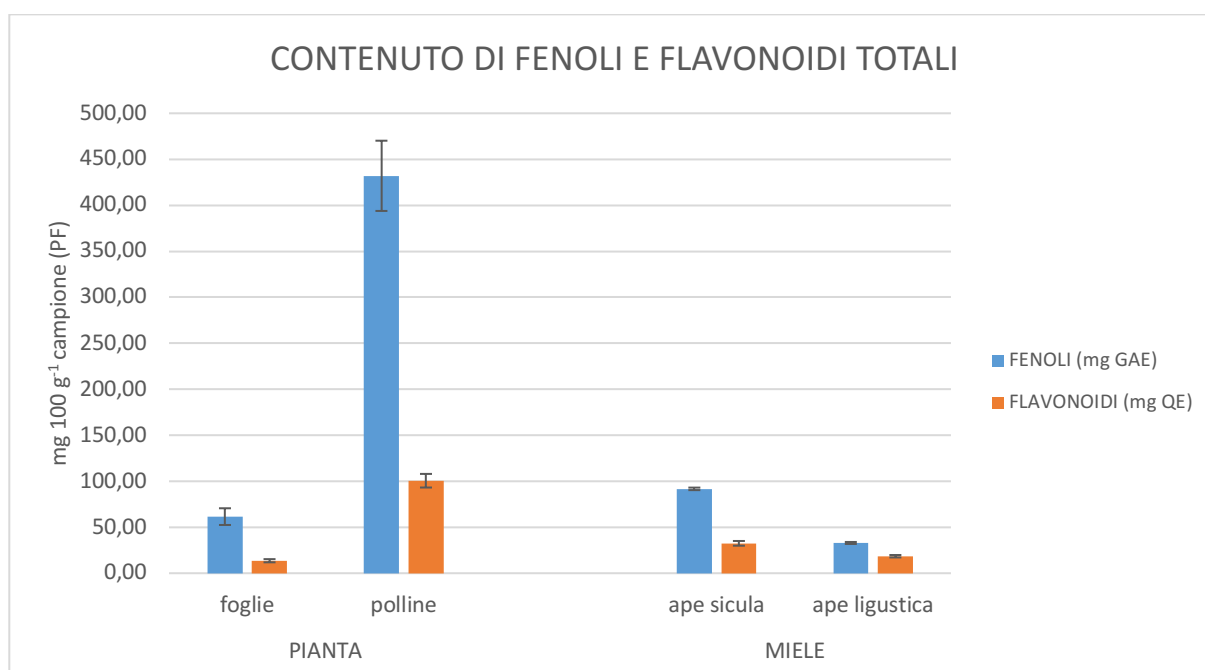


Fig. 19 - Contenuto di Fenoli e Flavonoidi Totali in foglie e polline di *Cynara cardunculus* var. altilis e in miele proveniente dalla stessa pianta (miele di cardo in purezza), prodotto con due diversi genotipi di ape (sicula e ligustica).

➤ Analisi dei composti fenolici mediante HPLC-UV/Vis

Nei campioni di foglie, polline e miele di cardo prodotto in purezza nell'ambito di questa ricerca è stata effettuata, tramite il metodo di cromatografia liquida HPLC-UV/vis, l'identificazione e la quantificazione dei metaboliti biologicamente attivi del cardo ed in particolare di acido neoclorogenico, acido clorogenico, cinarina, luteolin-7-O-glucoside, luteolin-7-O-glucuronide, apigenin-7-O-rutinoside, apigenin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucuronide, luteolina e

apigenina (Figg. 20-23). Le concentrazioni dei singoli analiti, nella media dei campioni presi in esame, sono presenti in Tabella 2.

Tabella 2 Contenuto fenolico (mg 100 g⁻¹ PF) di miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula e ligustica in relazione alla pianta di origine (*Cynara cardunculus* var. *altilis*).

N° PICCO ^a	COMPOSTO	PIANTA		MIELE	
		FOGLIE	POLLINE	APE SICULA	APE LIGUSTICA
1	Acido neoclorogenico	0,22 ± 0,11	-	-	-
2	Acido clorogenico	1,54 ± 0,51	-	3,42 ± 0,11	1,41 ± 0,06
3	Cinarina	1,18 ± 0,61	-	0,34 ± 0,02	0,08 ± 0,01
4	Luteolin-7-O-glucoside	3,67 ± 2,84	-	-	-
5	Luteolin-7-O-glucuronide	5,14 ± 3,43	8,98 ± 0,94	-	-
6	Apigenin-7-O-rutinoside	1,22 ± 0,69	-	-	-
7	Apigenin-7-O-glucoside	5,07 ± 1,86	10,29 ± 0,71	-	-
8	Apigenin-7-O-glucuronide	5,42 ± 1,26	56,83 ± 3,91	3,72 ± 0,05	1,06 ± 0,03
9	Luteolina	0,69 ± 0,51	0,74 ± 0,08	0,23 ± 0,02	0,07 ± 0,01
10	Apigenina	0,66 ± 0,52	73,52 ± 3,16	0,11 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	TOTALE	24,81	150,36	7,82	2,65

Ciascun valore rappresenta la media ± deviazione standard (n=3).

(-) Analita non rilevato o non quantificabile.

^a L'assegnazione del picco cromatografico fa riferimento alle Figg.20-23.

Foglie e polline

La somma dei polifenoli presi in esame nell'ambito di questa ricerca, nelle foglie di cardo è risultata pari a 24,80 mg 100 g⁻¹ di peso fresco, mentre nel polline ha mostrato un valore pari a 150,36 mg 100 g⁻¹ di peso fresco. Confrontando le variazioni nel contenuto tra foglia e polline emerge che, oltre a variare la somma dei polifenoli, cambia radicalmente anche la ripartizione tra i diversi composti analizzati. In particolare nel polline scompaiono tutti e tre gli acidi fenolici presi in esame, si assiste ad un forte incremento del contenuto dell'apigenina e dei suoi derivati, mentre la luteolina rimane invariata e tra i suoi derivati la luteolin-7-O-glucoside scompare e la luteolin-7-O-glucuronide incrementa di contenuto.

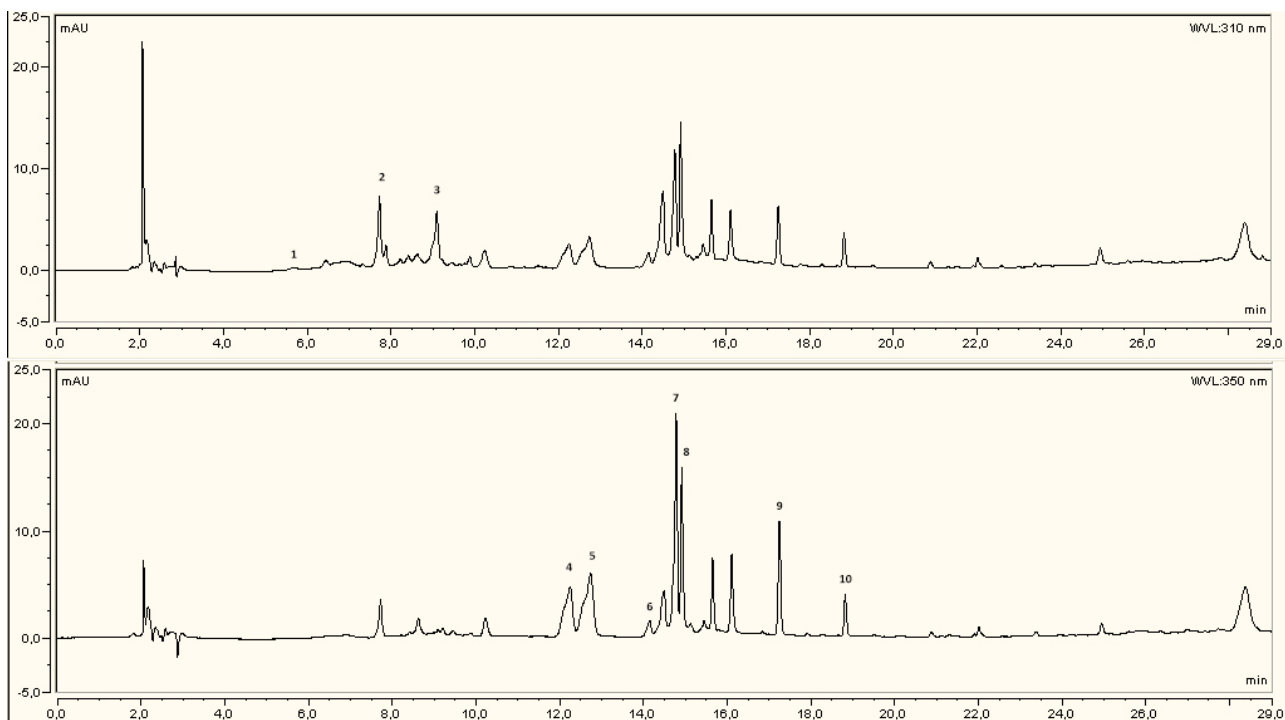


Fig. 20 - Cromatogrammi HPLC-UV/Vis di foglie di *Cynara cardunculus* var. *altilis* acquisiti a 310 nm e 350 nm. L'assegnazione dei picchi è riportata in Tabella 2.

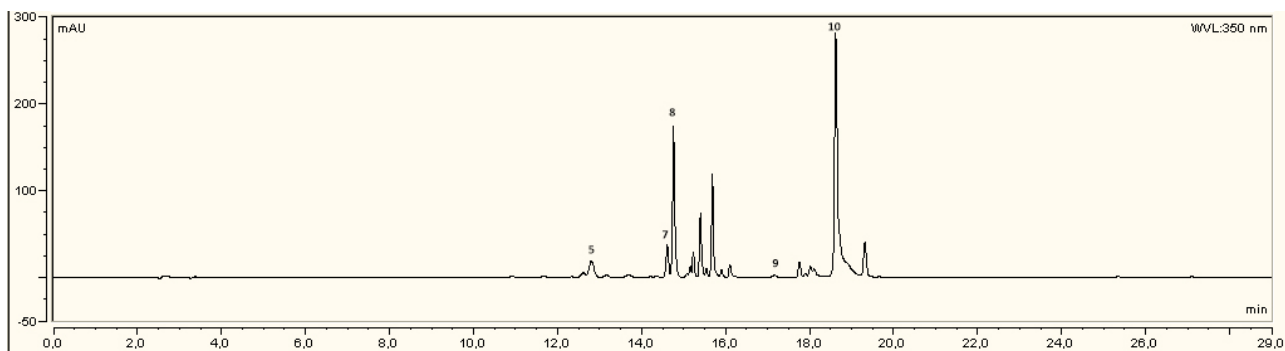


Fig. 21 - Cromatogramma HPLC-UV/Vis di polline di *Cynara cardunculus* var. *altilis* acquisito a 350 nm. L'assegnazione dei picchi è riportata in Tabella 2.

Miele

Il contenuto fenolico, rilevato mediante analisi HPLC, nel miele di cardo è risultato, nella media dei due genotipi di ape, pari a 5,24 mg 100 g⁻¹ di peso fresco. Questo carattere è stato significativamente influenzato dal genotipo di ape che ha prodotto il miele, con valori di 7,82 e 2,65 mg 100 g⁻¹ di peso fresco rispettivamente per miele di ape sicula e ligustica.

I due tipi di miele hanno presentato profili cromatografici simili (Figg. 22-23)

Mentre non sono state riscontrate differenze tra i due mieli per quanto riguarda la natura dei singoli composti presenti, evidenti divergenze sono state osservate sia nel contenuto che nella

loro ripartizione percentuale. Infatti, l'acido clorogenico, che è risultato il composto maggiormente presente tra gli acidi fenolici in ambedue i mieli, con valori di 3,42 e 1,41 mg 100 g⁻¹ di peso fresco rispettivamente nel miele di ape sicula e di ligustica, ha rappresentato il 44% del totale nella sicula e il 53% nella ligustica. Di contro, tra i flavonoidi l'apigenin-7-O-glucuronide, che è risultato l'analita maggiormente presente con 3,72 e 1,06 mg 100 g⁻¹ rispettivamente nel miele di ape sicule e ligustica, ha rappresentato il 47,6 % del totale nel miele della prima e il 40% in quello della seconda. Nel complesso l'ape sicula ha determinato una presenza di polifenoli nel miele maggiore del 195% rispetto alla ligustica ed una più alta concentrazione di flavonoidi rispetto agli acidi fenolici.

Anche in questo caso, confrontando le variazioni nel contenuto tra le due matrici vegetali analizzate e il contenuto nel miele, emerge che oltre a variare la somma dei polifenoli cambia radicalmente anche la ripartizione tra i diversi composti analizzati. In particolare nel miele di ape nera sicula scompare uno degli acidi fenolici riscontrati nella pianta e si assiste ad un forte incremento del contenuto di acido clorogenico rispetto a quello presente nella foglia. Tra i flavonoidi quello che transita in misura maggiore in ambedue i mieli è l'apigenin-7-O-glucuronide, con luteolina e apigenina che fanno registrare bassi contenuti, e la scomparsa di tutti gli altri analiti precedentemente riscontrati nella foglia di cardo (Tabella 2).

Questi primi dati potrebbero rappresentare la base di partenza per la definizione di marker chimici in grado di differenziare il miele di cardo prodotto in purezza dai due genotipi di ape, a parità di condizioni ambientali.

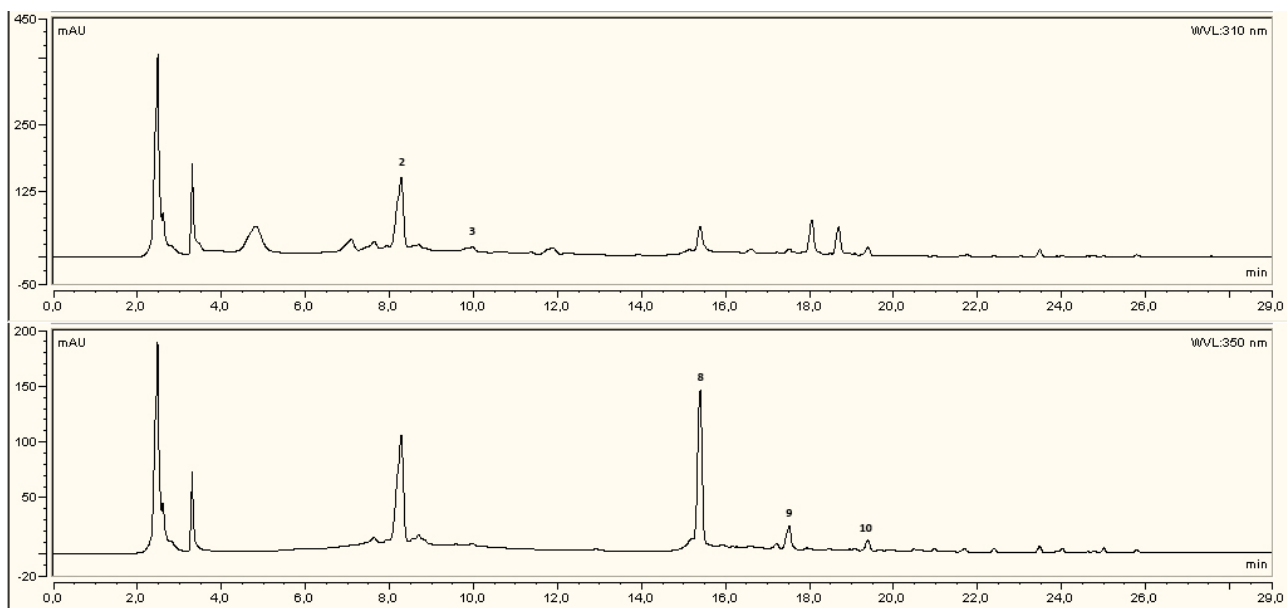


Fig. 22 - Cromatogrammi HPLC-UV/Vis di miele di cardo prodotto in purezza da ape nera sicula acquisiti a 310 nm e 350 nm. L'assegnazione dei picchi è riportata in Tabella 2.

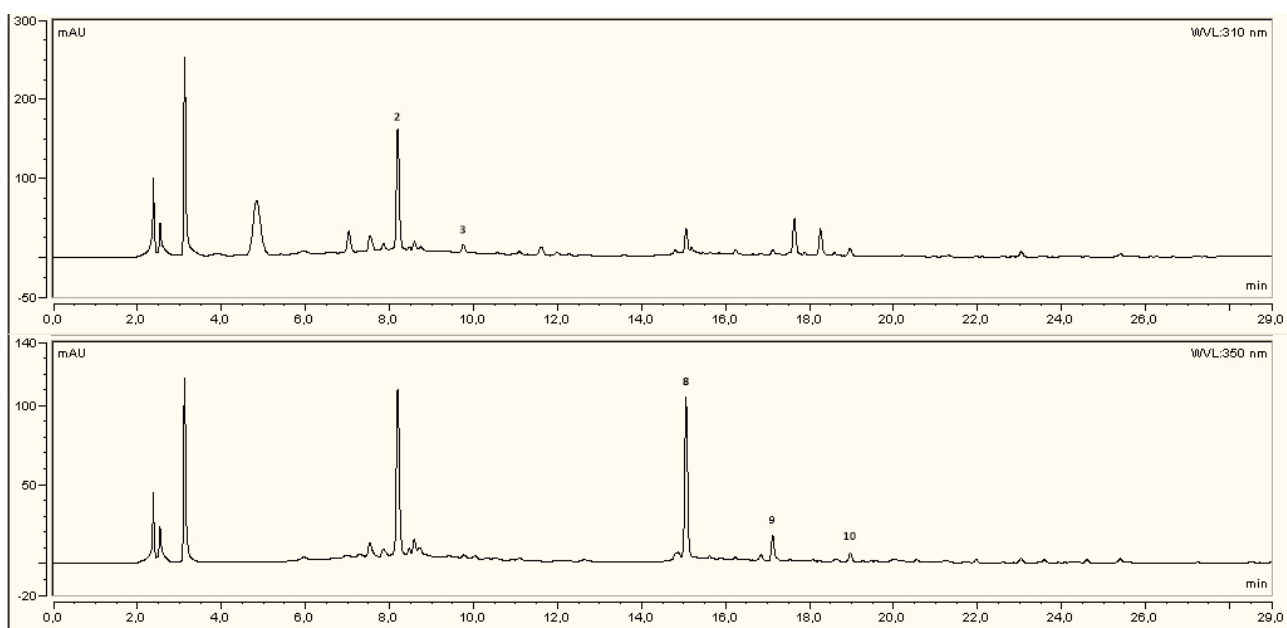


Fig. 23 - Cromatogrammi HPLC-UV/Vis di miele di cardo prodotto in purezza da ape ligustica acquisiti a 310 nm e 350 nm. L'assegnazione dei picchi è riportata in Tabella 2.

II PARTE

Nella seconda parte è stata effettuata la caratterizzazione del miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula e ligustica e di mieli commerciali siciliani con origine floreale comune, prodotti con lo stesso genotipo di ape, valutando la variabilità per i seguenti parametri: pH, cationi inorganici, zuccheri, fenoli totali, flavonoidi totali, composizione fenolica mediante HPLC, potere riducente (saggio FRAP) e capacità di scavenger radicale (saggi DPPH e ABTS).

➤ pH

Il valore di pH pari nella media di tutti i fattori allo studio a 3,96, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele (prodotto in purezza e miele commerciale). Infatti, il miele di cardo prodotto dall'ape sicula, nella media dell'origine, ha presentato un valore di pH maggiore del 8,1% rispetto a quello della ligustica, mentre per quanto concerne l'origine, nella media dei genotipi di ape, quello prodotto in purezza ha presentato un valore di pH che è risultato del 7,7% maggiore rispetto a quello commerciale (Fig.24).

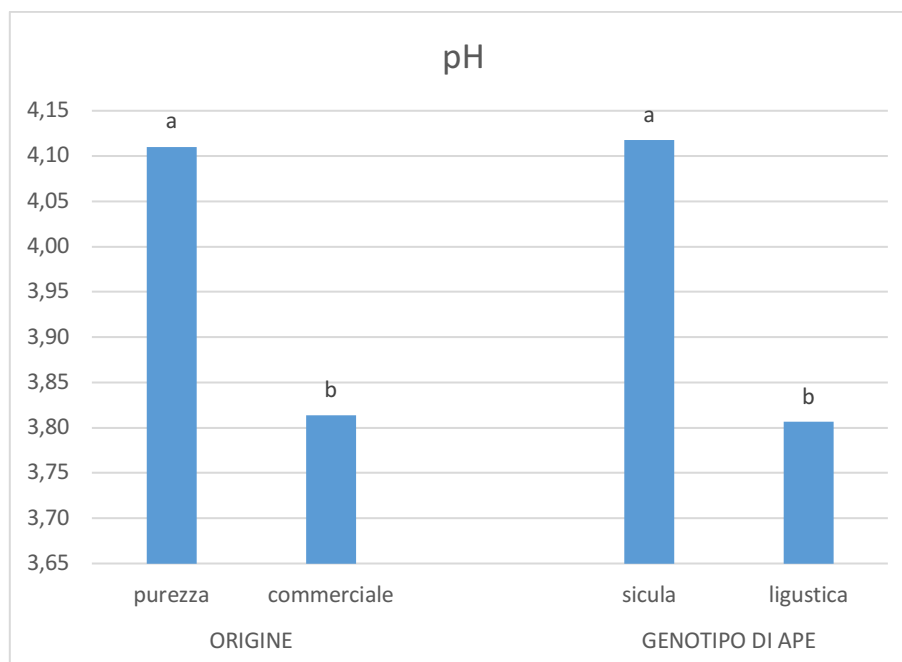


Fig. 24 - Valori di pH di miele di cardo nella media dell'origine (miele prodotto in purezza e commerciale) e nella media del genotipo di ape utilizzata (sicula o ligustica). Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

➤ Minerali

Per quanto concerne i cationi inorganici, sodio, potassio, magnesio e calcio, identificati e quantificati nei mieli di cardo oggetto di studio, mediante il metodo di cromatografia ionica, nella media di tutti i fattori è stato riscontrato un valore di 95,31 mg 100 g⁻¹.

I mieli di cardo prodotti da ape sicula hanno presentato un contenuto maggiore sia nel miele in purezza che in quello commerciale (rispettivamente 128,63 mg 100 g⁻¹ e 101,51 mg 100 g⁻¹), rispetto ai mieli prodotti dall'ape ligustica (69,50 mg 100 g⁻¹ e 80,62 mg 100 g⁻¹).

Per quanto riguarda i singoli elementi minerali, il potassio è risultato quantitativamente il più importante tra quelli analizzati (circa il 90% del contenuto totale) e il suo contenuto, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 83,52 mg 100 g⁻¹, è risultato maggiormente influenzato dal genotipo di ape che dall'origine del miele. Infatti nella media dell'origine (miele di cardo prodotto in purezza e commerciale) il miele di ape sicula ha presentato un valore di K pari a 103,59 mg 100 g⁻¹ contro i 63,45 mg 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 63,3% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape quello prodotto in purezza ha presentato un valore di K pari a 88,26 mg 100 g⁻¹, che è risultato maggiore solo del 12,0 % rispetto a quello commerciale (78,78 mg 100 g⁻¹).

Il contenuto di sodio, pari a 4,87 mg 100 g⁻¹ nella media di tutti i fattori, è risultato influenzato solo dal genotipo di ape. Infatti, nella media dell'origine, il miele di ape sicula ha presentato un valore di Na pari a 5,97 mg 100 g⁻¹ contro i 3,76 mg 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 58,8%, mentre nella media del genotipo di ape i mieli di cardo commerciale e quello in purezza, hanno presentato differenze inferiori al 2%.

Andamenti diversi sono stati riscontrati per il contenuto in cationi bivalenti, infatti, sia per il magnesio, pari nella media di tutti i fattori a 1,94 mg 100 g⁻¹, che per il calcio, pari nella media a 4,75 mg 100 g⁻¹, i valori maggiori sono stati mostrati dal miele di ape ligustica.

In particolare il contenuto del calcio è risultato pari nella media dell'origine a 5,13 mg 100 g⁻¹ per la ligustica, contro i 4,36 mg 100 g⁻¹ di quello di ape sicula con un incremento del 17,7%; mentre nella media del genotipo di ape i valori di 4,76 mg 100 g⁻¹ del miele di cardo commerciale e 4,74 mg 100 g⁻¹ di quello in purezza, hanno presentato una differenza trascurabile (0,4%).

Il contenuto di magnesio, nella media dell'origine, ha presentato un valore pari a 2,73 mg 100 g⁻¹ nel miele di ape ligustica contro 1,14 mg 100 g⁻¹ in quello di sicula, con un incremento del 139,5%, mentre nella media del genotipo di ape, il miele di cardo commerciale con un valore di

2,63 mg 100 g⁻¹ ha mostrato un incremento del 110,4% rispetto al miele in purezza (1,25 mg 100 g⁻¹).

Tabella 3 Contenuto minerale (mg 100 g⁻¹) di miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula e ligustica in relazione al miele di cardo commerciale ottenuto con lo stesso genotipo di ape.

N°PICCO ^a	CATIONE	MIELE IN PUREZZA		MIELE COMMERCIALE	
		SICULA	LIGUSTICA	SICULA	LIGUSTICA
1	Na	6,50 ± 0,31	3,15 ± 0,14	5,45 ± 0,30	4,36 ± 0,13
2	K	117,49 ± 2,99	59,03 ± 1,77	89,70 ± 2,60	67,86 ± 1,62
3	Mg	0,93 ± 0,22	1,56 ± 0,22	1,35 ± 0,11	3,90 ± 2,38
4	Ca	3,71 ± 0,45	5,76 ± 0,49	5,01 ± 0,41	4,50 ± 0,31
TOTALE		128,63	69,50	101,51	80,62

Ciascun valore rappresenta la media ± deviazione standard (n=3).

^a L'assegnazione del picco cromatografico fa riferimento alla Fig.25.

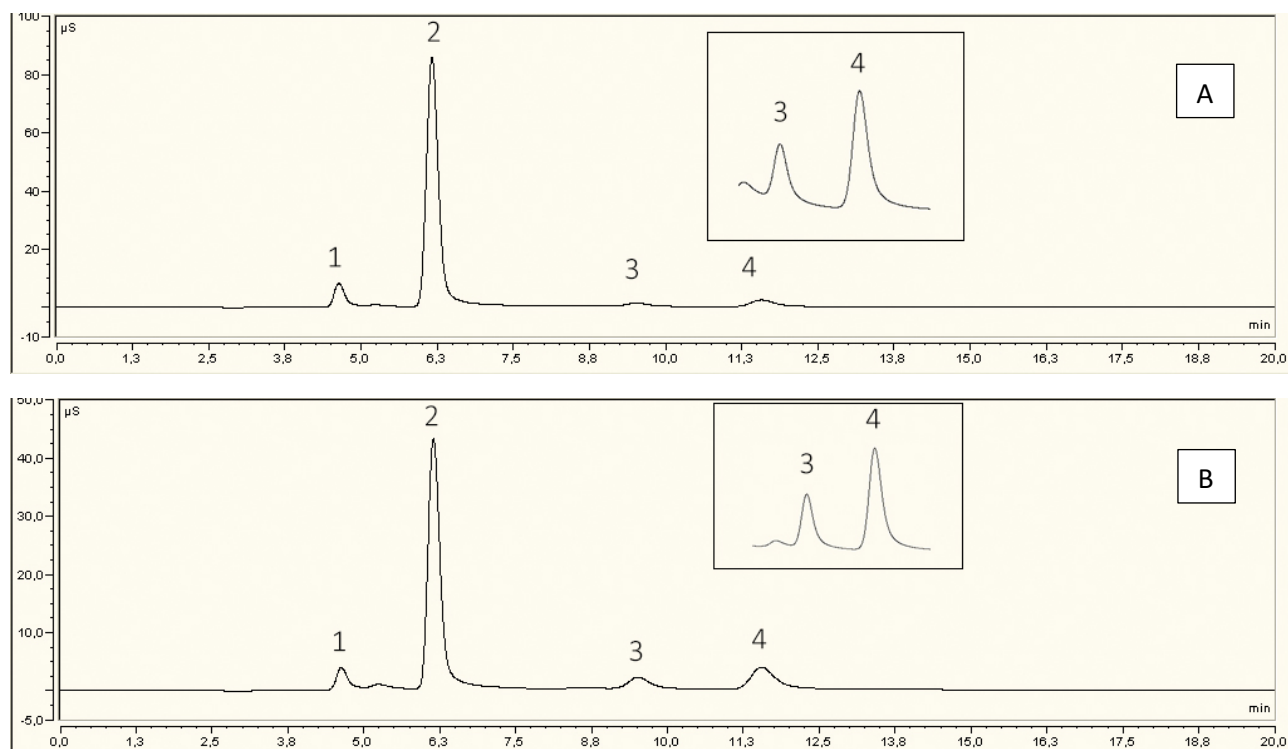


Fig. 25 - Cromatogrammi IC di miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula (A) e da ape ligustica (B). L'assegnazione dei picchi è riportata in Tabella 3.

La composizione minerale viene di norma considerata un potenziale indicatore dell'origine geografica del miele (Di Bella *et al.*, 2015; Anklan, 1998), infatti i vari lavori pubblicati negli ultimi anni riportano che il contenuto di questi elementi riflette non solo le differenze botaniche ma soprattutto le condizioni ambientali e la geologia delle aree di produzione (Fernandez-Torres *et al.*, 2004; Rashed and Soltan, 2004; Bogdanov *et al.*, 2007; Pisani *et al.*, 2008). Di Bella *et al.* (2015), analizzando mieli di diversa origine botanica prodotti in Sicilia e Calabria, ha riscontrato differenze anche tra mieli di uguale origine botanica ma prodotti in differenti province della Sicilia. I dati ottenuti nell'ambito di questa ricerca, relativi alla produzione del miele di cardo in purezza nel medesimo ambiente da due genotipi di ape, ci portano ad affermare che il contenuto minerale totale e la sua ripartizione sia determinato in misura significativa anche dal genotipo di ape che lo produce.

➤ **Carboidrati**

I monosaccaridi, fruttosio (F), glucosio (G) e saccarosio, sono i maggiori costituenti del miele, e sono stati quantificati mediante metodo di cromatografia HPAE-PAD per valutarne la variabilità nel miele di cardo, in funzione dei fattori posti allo studio nell'ambito di queste prove. Questi analiti sono stati rivelati in tutti i campioni di miele analizzati, sia quelli prodotti in purezza da ape sicula o ligustica, che quelli commerciali prodotti dai due diversi genotipi di ape, e le concentrazioni dei singoli analiti, nella media dei campioni presi in esame, sono presenti in Tabella 4.

Lo zucchero maggiormente presente, il fruttosio, pari nella media di tutti i fattori allo studio a $38,93 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, è risultato significativamente influenzato solo dall'origine del miele.

Il miele di ape sicula, nella media dell'origine (miele di cardo prodotto in purezza e commerciale), ha presentato un valore di F pari a $39,35 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ contro i $38,51 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ della ligustica, con un incremento del 2,2% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape i valori sono oscillati tra $39,58 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ del miele di cardo in purezza e $38,28 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ di quello commerciale, con un incremento pari al 3,4%.

Di poco inferiore il contenuto di glucosio, che ha mostrato, nella media di tutti i fattori allo studio, un valore pari a $36,80 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, ed è risultato influenzato sia dall'origine del miele che dal genotipo di ape. Infatti, nella media dell'origine, il miele di ape sicula ha presentato un valore di G pari a $37,49 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ contro i $36,11 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ della ligustica, con un incremento del

3,8% del contenuto. Mentre, nella media del genotipo di ape, i valori sono oscillati tra 37,81 g 100 g⁻¹ del miele di cardo in purezza e 35,79 g 100 g⁻¹ di quello commerciale, con un incremento pari al 5,6%.

Per quel che concerne il saccarosio, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 1,67 g 100 g⁻¹, l'influenza dell'origine del miele (miele di cardo prodotto in purezza e commerciale) è prevalsa sul genotipo di ape e, contrariamente agli altri analiti, l'ape ligustica ha mostrato un valore maggiore rispetto alla sicula. Infatti nella media dell'origine, il miele di ape ligustica ha presentato un valore pari a 1,73 g 100 g⁻¹ contro 1,61 g 100 g⁻¹ della sicula, con un incremento del 7,8% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape i valori sono oscillati tra 1,81 g 100 g⁻¹ del miele di cardo in purezza e 1,53 g 100 g⁻¹ di quello commerciale, con un incremento pari al 18,0%.

Tabella 4 Contenuto zuccherino (g 100 g⁻¹) di miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula e ligustica in relazione al miele di cardo commerciale ottenuto con lo stesso genotipo di ape.

N° PICCO ^a	SACCARIDE	MIELE IN PUREZZA		MIELE COMMERCIALE	
		SICULA	LIGUSTICA	SICULA	LIGUSTICA
1	GLUCOSIO	38,88 ± 1,01	36,73 ± 0,75	36,10 ± 0,81	35,49 ± 1,40
2	FRUTTOSIO	40,23 ± 1,06	38,92 ± 0,96	38,47 ± 0,95	38,10 ± 0,89
3	SACCAROSIO	1,78 ± 0,10	1,83 ± 0,08	1,43 ± 0,08	1,63 ± 0,07
	F+G	79,11	75,65	74,57	73,59
	F/G	1,03	1,06	1,07	1,07

Ciascun valore rappresenta la media ± deviazione standard (n=3).

^a L'assegnazione del picco cromatografico fa riferimento alla Fig.26.

La Tabella 4 mostra che la somma di F+G è variata da 73,59 g 100 g⁻¹ (miele di cardo commerciale prodotto da ape ligustica) a 79,11 g 100 g⁻¹ (miele di cardo in purezza prodotto da ape sicula) e che il rapporto di F/G ha presentato lievi oscillazioni tra 1,03 e 1,07, rispettivamente per il miele di cardo in purezza prodotto da ape sicula e il miele commerciale.

Tutti i risultati ottenuti sono nei limiti stabiliti dalla Direttiva Europea (1974) e presenti nella regolamentazione del Codex Alimentarius (1993), con valori di F/G >1, F+G > 60 g 100 g⁻¹ di miele e saccarosio < 5 g 100 g⁻¹ di miele.

Per quanto riguarda questo parametro i valori da noi riscontrati per il miele di cardo si avvicinano a quelli riportati da Escuredo *et al.* (2014) e da Cotte *et al.* (2004) per il miele di girasole, pianta appartenente alla famiglia delle Asteracee, come il cardo. Il basso valore di F/G indica che il miele di cardo presenta una maggiore tendenza a cristallizzare rispetto ad altri mieli (castagno, eucalipto, acacia, erica e melata), i cui valori oscillano da 1,4 a 1,6 (Escuredo *et al.*, 2014; Kowalski *et al.*, 2013; Cotte *et al.*, 2004; Mateo and Bosch-Reig, 1998).

I primi dati ottenuti per il miele di cardo nell'ambito di questa ricerca, ci permettono di affermare che questo è un carattere sostanzialmente non influenzato dal genotipo di ape, e con valori di F/G pari a 1,06, presenta una notevole tendenza a cristallizzare.

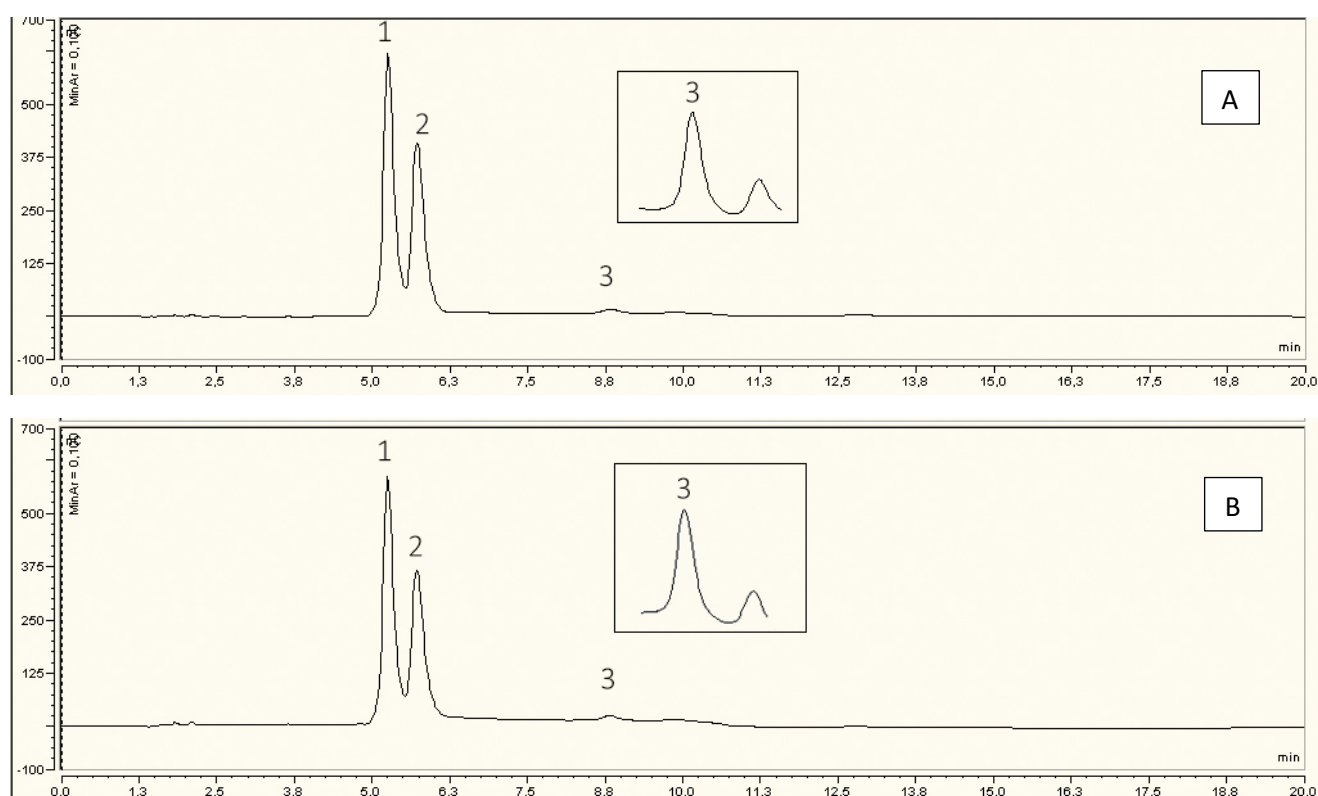


Fig. 26 - Cromatogrammi HPAE-PAD di miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula (A) e da ape ligustica (B). L'assegnazione dei picchi è riportata in Tabella 4.

➤ **Contenuto di Fenoli Totali**

Il contenuto di fenoli totali, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 47,00 mg GAE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato oltre che dall'origine del miele anche dal genotipo di ape. Infatti, nella media dell'origine, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 64,83 mg GAE 100 g⁻¹ contro i 29,17 mg GAE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 122,2% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape il miele prodotto in purezza ha presentato un valore pari a 62,53 mg GAE 100 g⁻¹ contro i 31,48 mg GAE 100 g⁻¹ del miele commerciale, con un incremento del 98,6% del contenuto (Fig.27).

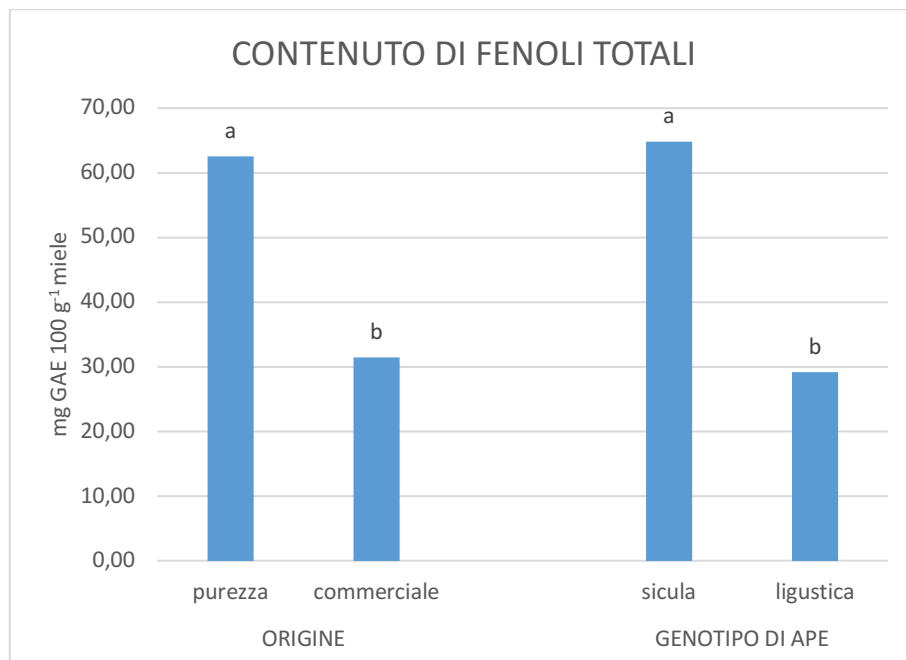


Fig. 27 -Contenuto di Fenoli Totali in miele di cardo nella media dell'origine (miele prodotto in purezza e commerciale) e nella media del genotipo di ape utilizzata (sicula o ligustica). Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

I dati ottenuti per il miele di cardo nell'ambito di questa ricerca ci permettono di affermare che questo carattere, oltre ad essere influenzato dall'origine, è notevolmente influenzato dal genotipo di ape. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Tenore *et al.* (2012) e Attanzio *et al.* (2016), che, analizzando mieli siciliani di diversa origine botanica prodotti da ape sicula, avevano riscontrato valori più alti di contenuto fenolico rispetto a quelli riportati da altri autori (Pichichero *et al.*, 2009; Truchado *et al.*, 2009; Escriche *et al.*, 2011; Isla *et al.*, 2011) per mieli prodotti da altre sottospecie di api.

➤ **Contenuto di Flavonoidi Totali**

Anche il contenuto di flavonoidi totali, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 21,61 mg QE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele. Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 27,57 mg QE 100 g⁻¹ contro i 15,65 mg QE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 76,2% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape il miele di cardo prodotto in purezza ha presentato un valore pari a 25,73 mg QE 100 g⁻¹ contro i 17,49 mg QE 100 g⁻¹ del miele commerciale, con un incremento del 47,1% (Fig.28).

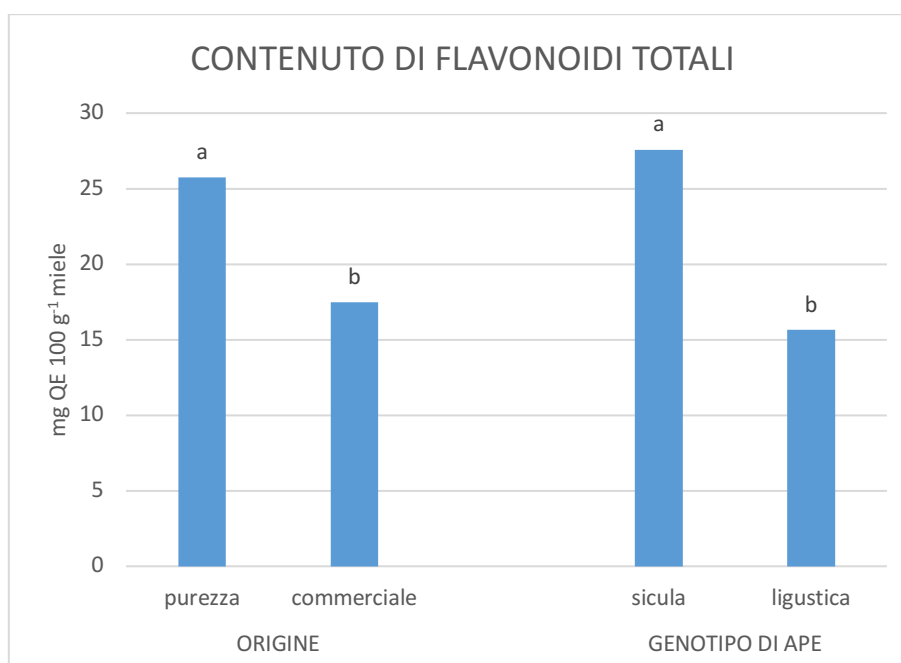


Fig. 28 - Contenuto di Flavonoidi Totali in miele di cardo nella media dell'origine (miele prodotto in purezza e commerciale) e nella media del genotipo di ape utilizzata (sicula o ligustica). Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

➤ **Analisi dei composti fenolici mediante HPLC-UV/Vis**

Il metodo di cromatografia liquida HPLC-UV/vis ha permesso nei mieli di cardo allo studio l'identificazione e la quantificazione di acido clorogenico (picco 2), cinarina (picco 3), apigenin-7-O-glucuronide (picco 8), luteolina (picco 9) e apigenina (picco 10) (Figg. 22 e 23). In generale questi composti fenolici sono stati rivelati in tutti i campioni di miele di cardo analizzati, sia quelli prodotti in purezza da ape sicula o ligustica, che quelli commerciali prodotti dai 2 diversi

genotipi di ape. Complessivamente il contenuto medio dei composti fenolici è risultato nell'ordine il seguente: acido clorogenico ($1,60 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) > apigenin-7-O-glucuronide ($1,59 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) > cinarina ($0,12 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) > luteolina ($0,11 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) > apigenina ($0,05 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). La Fig.29 mostra chiaramente che i composti dominanti, l'acido clorogenico e l'apigenin-7-O-glucuronide, rappresentano rispettivamente il 46,1% e il 45,8% del contenuto fenolico totale presente nel miele di cardo.

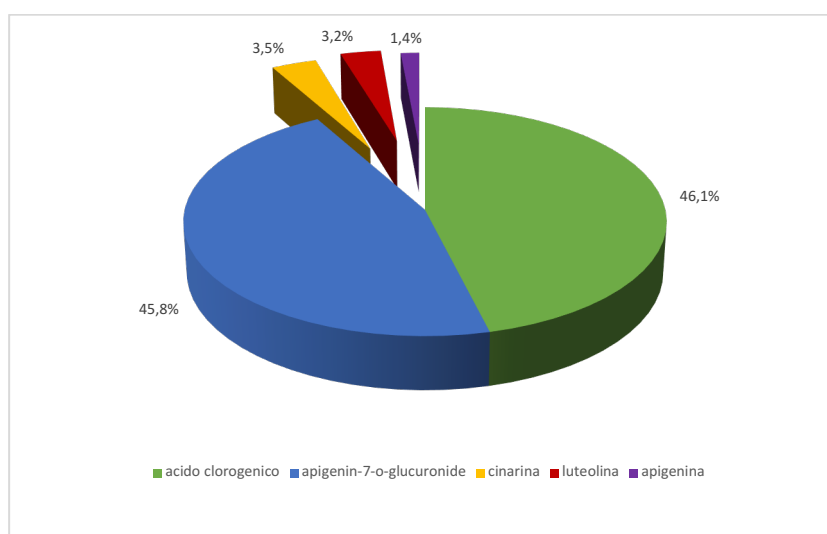


Fig. 29 - Percentuale di ciascun analita presente nel miele di cardo rispetto al contenuto fenolico totale.

La Fig.30 evidenzia notevoli differenze derivanti sia dall'origine del miele, che dal genotipo di ape utilizzata. Infatti i dati osservati sono risultati statisticamente significativi, ma in questo caso il maggior apporto di variabilità è dato dall'origine del miele. Per quel che concerne gli analiti dominanti, il miele di cardo prodotto dall'ape sicula, nella media dell'origine, ha presentato dei valori di acido clorogenico e apigenin-7-O-glucuronide rispettivamente pari a $2,25$ e $2,26 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, maggiori del 141 % e del 146% rispetto a quelli della ligustica. Mentre per quanto concerne l'origine, nella media dei genotipi di ape, il miele prodotto in purezza ha presentato dei valori di acido clorogenico e apigenin-7-O-glucuronide rispettivamente pari a $2,42 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e $2,39 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, maggiori del 213% e del 203% rispetto a quello commerciale.

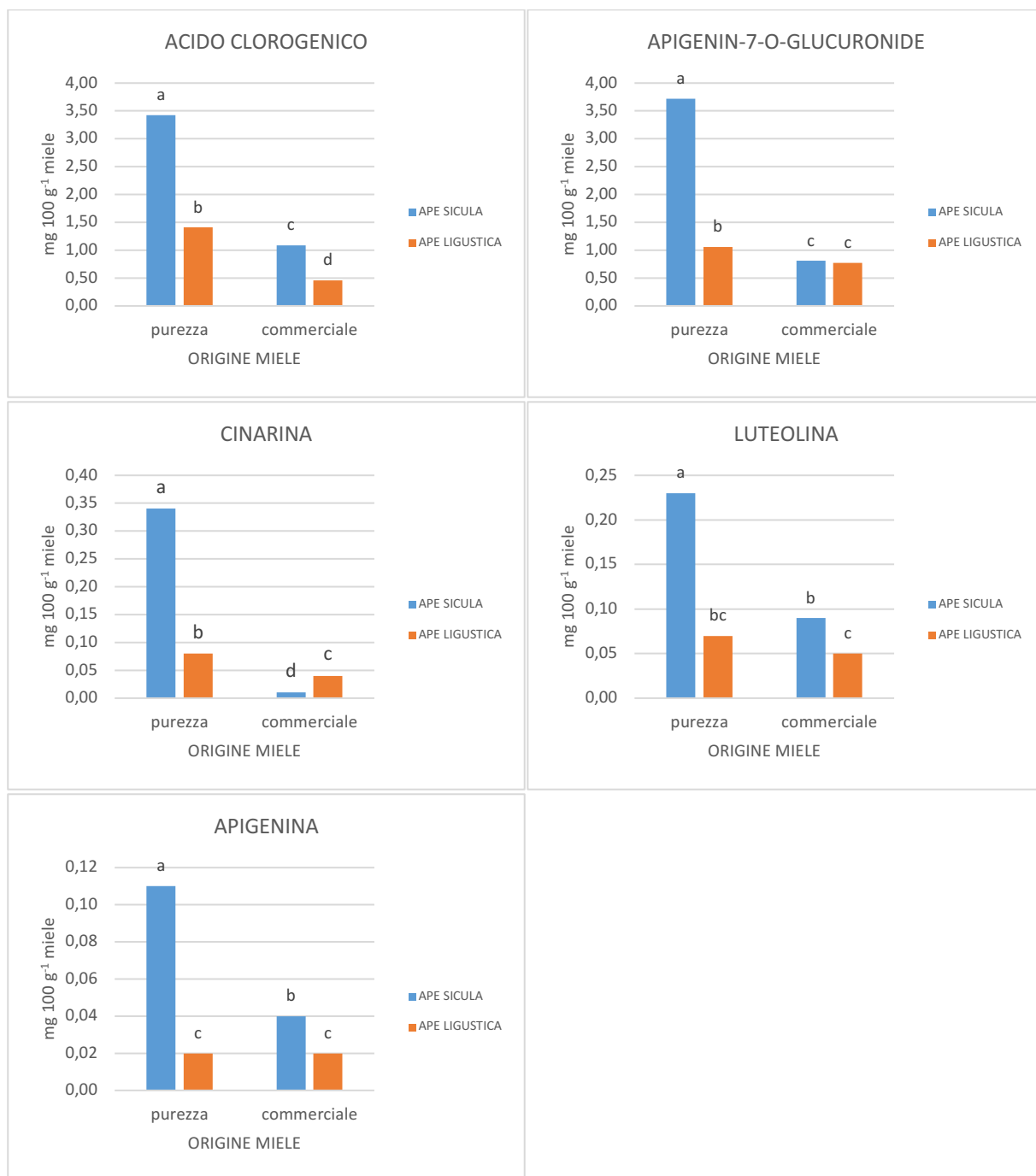


Fig. 30 - Profilo fenolico (mg 100 g⁻¹ di miele) in mieli di cardo aventi differente origine (prodotto in purezza e commerciale) e prodotti con diversi genotipi di ape (sicula e ligustica). Differenze statistiche significative in base al test t di Student (p < 0,05).

In particolare i valori di acido clorogenico oscillavano tra 3,42 mg 100 g⁻¹ (miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula) e 0,46 mg 100 g⁻¹ (miele commerciale prodotto da ape ligustica), mentre i valori di apigenin-7-O-glucuronide variavano da 3,72 mg 100 g⁻¹ (miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula) a 0,77 mg 100 g⁻¹ (miele commerciale prodotto da ape ligustica). Come riportato da altri autori (Gambacorta *et al.*, 2014, Gasic *et al.*, 2014; Yao *et al.*,

2004; Andrade *et al.*, 1997) l'acido clorogenico è presente in mieli di diverse origini floreali (acacia, tiglio, lavanda, eucalipto, erica) ed è considerato come una parte informativa del profilo fenolico caratteristico del miele (Yao *et al.*, 2003, 2004). Invece l'apigenin-7-O-glucuronide, che è tra i principali flavonoidi presenti nella pianta di cardo (Ramos *et al.*, 2014; Pandino *et al.*, 2011, 2015; Pinelli *et al.*, 2007), non essendo stato riscontrato in letteratura in nessun tipo di miele, potrebbe essere utilizzato come marker per il miele di cardo.

I valori di cinarina, luteolina ed apigenina, sono risultati notevolmente più bassi rispetto ai precedenti analiti, ma anch'essi statisticamente significativi. Il miele di cardo prodotto dall'ape sicula, nella media dell'origine, ha presentato dei valori di cinarina, luteolina e apigenina rispettivamente pari a 0,17, 0,16 e 0,08 mg 100 g⁻¹, con un incremento del 183,3%, del 166,7% e del 226% rispetto a quelli della ligustica. Mentre per quanto concerne l'origine, nella media dei genotipi di ape, il miele prodotto in purezza ha presentato dei valori di cinarina, luteolina e apigenina rispettivamente pari a 0,21, 0,15 e 0,07 mg 100 g⁻¹, maggiori del 950,0%, 114,3% e del 133,3% rispetto a quello commerciale.

Il contenuto di cinarina variava da 0,34 mg 100 g⁻¹ (miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula) a 0,01 mg 100 g⁻¹ (miele commerciale prodotto da ape sicula), con un valore medio pari al 3,5% del contenuto totale dei composti fenolici identificati. I valori di luteolina variavano da 0,23 mg 100 g⁻¹ (miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula) a 0,05 mg 100 g⁻¹ (miele commerciale prodotto da ape ligustica), con un valore medio pari al 3,2% del contenuto fenolico totale e infine quelli di apigenina, con il più piccolo valore medio pari all'1,4% del contenuto fenolico totale, variavano da 0,11 mg 100 g⁻¹ (miele di cardo prodotto in purezza da ape sicula) a 0,02 mg 100 g⁻¹ (miele prodotto da ape ligustica).

➤ **Attività antiossidante**

DPPH

Il valore di DPPH, relativo all'attività di scavenging dei radicali liberi dei campioni in soluzione, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 0,070 mmol TE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele (Fig.31).

Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 0,117 mmol TE 100 g⁻¹ contro 0,023 mmol TE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 408,7%. Mentre nella media del genotipo di ape il miele di cardo prodotto in purezza ha

presentato un valore di 0,111 mmol TE 100 g⁻¹, maggiore del 282,8% rispetto a quello commerciale, pari a 0,029 mmol TE 100 g⁻¹.

FRAP

Il valore di FRAP, relativo al potere riducente del campione, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 0,085 mmol TE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele (Fig.31).

Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 0,144 mmol TE 100 g⁻¹ contro 0,026 mmol TE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 453,8%. Mentre nella media del genotipo di ape il miele di cardo prodotto in purezza ha presentato un valore di 0,135 mmol TE 100 g⁻¹, maggiore del 285,7% rispetto a quello commerciale, pari a 0,035 mmol TE 100 g⁻¹.

ABTS

Il valore di ABTS, relativo alla capacità di scavenging dei radicali liberi, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 0,098 mmol TE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele (Fig.31).

Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 0,164 mmol TE 100 g⁻¹ contro 0,031 mmol TE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 429,0%. Mentre nella media del genotipo di ape il miele di cardo prodotto in purezza ha presentato un valore di 0,155 mmol TE 100 g⁻¹, maggiore del 287,5% rispetto a quello commerciale, pari a 0,040 mmol TE 100 g⁻¹.

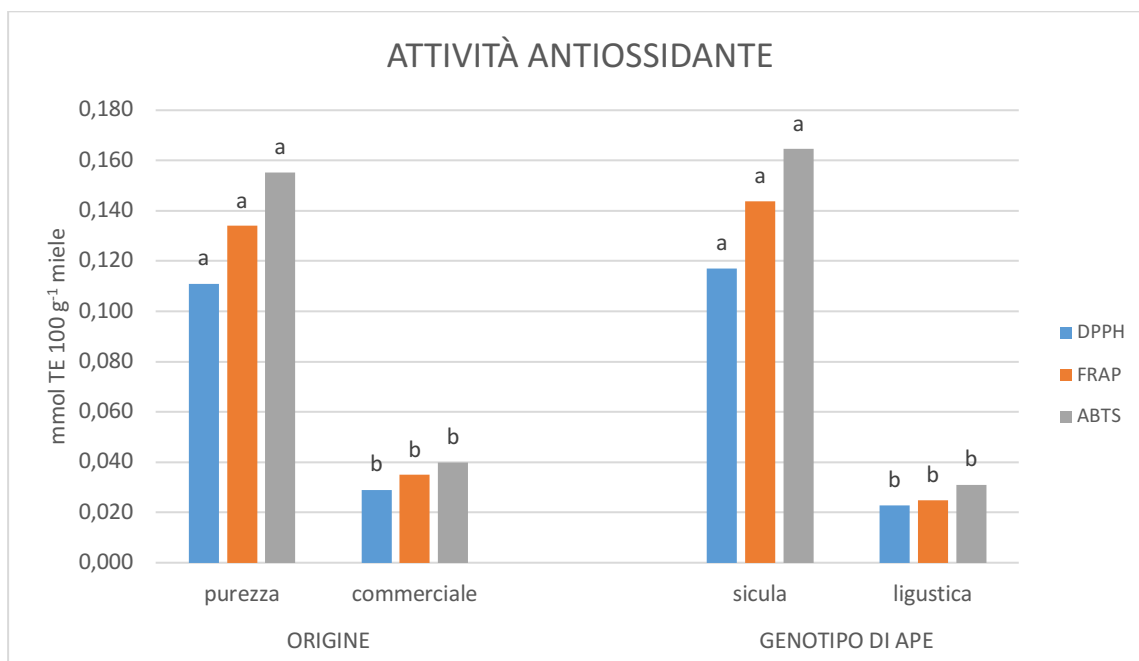


Fig. 31 - Valutazione dell'attività antiossidante del miele di cardo nella media dell'origine (miele prodotto in purezza e commerciale) e nella media del genotipo di ape utilizzata (sicula o ligustica). Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

I risultati ottenuti per la capacità antiossidante (sia potere riducente che di scavenger radicale) del miele di cardo ci permettono di affermare che questo carattere risulta fortemente influenzato sia dall'origine del miele, che dal genotipo di ape. È noto che la composizione polifenolica e la capacità antiossidante del miele dipendono dall'origine botanica, che è notevolmente influenzata dalle condizioni climatiche e ambientali (Al-Mamary *et al.*, 2002). Infatti zone caratterizzate da un clima caldo, umido e con alti livelli di esposizione al sole, esercitano una marcata influenza sul contenuto polifenolico delle piante, aumentandone la percentuale rispetto alle stesse varietà cresciute all'ombra (Spayd *et al.*, 2002).

L'influenza dell'ape sicula permette di ottenere mieli con valori di potere riducente e capacità di scavenger radicale più alti rispetto a quelli prodotti da ape ligustica. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Tenore *et al.* (2012) e Attanzio *et al.* (2016), che, analizzando mieli siciliani di diversa origine botanica prodotti da ape sicula, hanno riscontrato valori più alti di attività antiossidante rispetto a quelli riportati da altri autori (Pichichero *et al.*, 2009; Truchado *et al.*, 2009; Escriche *et al.*, 2011; Isla *et al.*, 2011) per mieli prodotti da altre sottospecie di api.

➤ **Correlazione tra i parametri osservati**

L'esame dei coefficienti di correlazione tra i diversi parametri osservati, calcolati utilizzando i dati ottenuti da questa prova, permette di osservare una stretta correlazione tra la composizione fenolica e l'attività antiossidante dei mieli analizzati. Tra i composti l'unico a presentare un $p \leq 0,01$ è stata la cinarina con i flavonoidi totali.

Quanto riscontrato riguardo alla correlazione tra contenuto in composti fenolici e attività antiossidante è perfettamente in accordo con quanto presente in letteratura.

Tabella 5 Matrice di correlazione dei parametri studiati (coefficienti di correlazione di Pearson)

	Fenoli Totali	Flavonoidi totali	DPPH	FRAP	ABTS	Acido clorogenico	Cinarina	Apigenin-7-O-glucuronide	Luteolina
Fenoli totali	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoidi totali	0,936***	-	-	-	-	-	-	-	-
DPPH	0,994***	0,895***	-	-	-	-	-	-	-
FRAP	0,993***	0,894***	0,999***	-	-	-	-	-	-
ABTS	0,994***	0,902***	0,998***	0,999***	-	-	-	-	-
Acido clorogenico	0,974***	0,925***	0,960***	0,956***	0,958***	-	-	-	-
Cinarina	0,945***	0,800**	0,957***	0,955***	0,954***	-	-	-	-
Apigenin-7-O-glucuronide	0,984***	0,870***	0,990***	0,989***	0,990***	0,970***	0,986***	-	-
Luteolina	0,987***	0,904***	0,993***	0,992***	0,987***	0,962***	0,940***	0,974***	-
Apigenina	0,981***	0,896***	0,986***	0,984***	0,979***	0,936***	0,915***	0,959***	0,988***

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

2. PROVA B

Nell'ambito di questa prova è stata verificata l'influenza del genotipo di ape sul contenuto totale di molecole bioattive e relativa attività antiossidante in mieli commerciali di origine botanica diversa (tra cui il miele commerciale di cardo) e miele di cardo prodotto in purezza.

➤ Fenoli Totali

Il contenuto di fenoli totali, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 40,37 mg GAE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato oltre che dall'origine del miele anche dal genotipo di ape. Infatti, nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 50,92 mg GAE 100 g⁻¹ contro i 29,82 mg GAE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 70,8% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape i valori sono oscillati tra 16,11 mg GAE 100 g⁻¹ del miele di sulla e 62,53 mg GAE 100 g⁻¹ del miele di cardo in purezza.

Nell'ambito delle diverse origini botaniche i mieli prodotti da ape sicula hanno mostrato valori da 22,72 mg GAE 100 g⁻¹ a 91,92 mg GAE 100 g⁻¹ (rispettivamente per sulla e cardo in purezza), mentre quelli di ape ligustica oscillavano da 9,50 mg GAE 100 g⁻¹ a 49,27 mg GAE 100 g⁻¹ (rispettivamente per sulla e ferula) (Fig.32). Se analizziamo i singoli mieli l'ape nera sicula ha determinato un incremento del contenuto di fenoli totali presenti nel miele che è variato dal 14% riscontrato per il miele di ferula, al 165% per il miele millefiori, tra i commerciali, fino a raggiungere l'incremento del 177% nel caso del miele di cardo prodotto in purezza, rispetto a quello di ape ligustica (Fig.32).

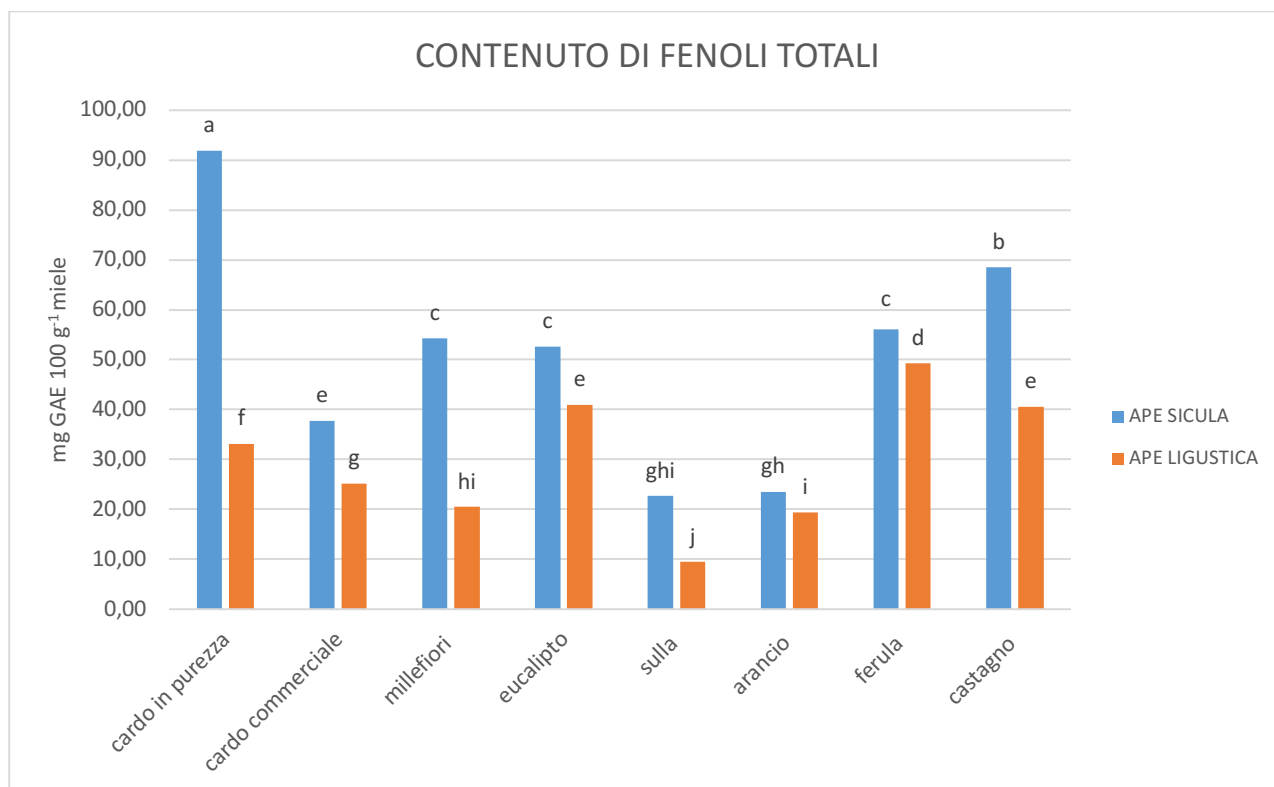


Fig. 32 - Contenuto di fenoli totali di estratti polifenolici di mieli di differente origine botanica, prodotti da 2 diversi genotipi di ape. Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

Quanto riscontrato nell'ambito di questa ricerca per la variabilità del contenuto in fenoli totali in funzione dell'origine floreale è risultato in accordo con quanto riportato da altri autori (Amiot *et al.*, 1989; Ferreres *et al.*, 1991; Gil *et al.*, 1995; Martos *et al.*, 2000a, Martos *et al.*, 2000b; Tomás-Barberán *et al.*, 2001). Le uniche ricerche finora condotte su mieli prodotti da ape nera sicula sono quelle di Tenore *et al.* (2012), Mannina *et al.* (2015) e Attanzio *et al.* (2016), che hanno analizzato i mieli di ape nera sicula confrontandoli con i dati presenti in letteratura. La metodologia da loro adottata non tiene conto delle differenze dovute all'origine geografica, alla variabilità del clima e ai fattori stagionali che influenzano il contenuto dei componenti fenolici nei mieli, come già ampiamente dimostrato da altri autori (Al-Mamary *et al.*, 2002; Yaoa *et al.*, 2005; Cowan, 1999), mostrando evidenti limiti che vengono superati da questo studio che è stato condotto valutando l'influenza dei due genotipi di ape nell'ambito della medesima origine geografica e dello stesso anno di produzione.

➤ Flavonoidi Totali

Anche il contenuto di questo importante fattore di qualità del miele, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 17,89 mg QE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele. Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 21,55 mg QE 100 g⁻¹ contro i 14,23 mg QE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 51,4% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape i valori sono oscillati tra 4,92 mg QE 100 g⁻¹ del miele di sulla e 26,43 mg QE 100 g⁻¹ del castagno.

Dall'analisi dei singoli mieli, quello prodotto dall'ape sicula ha presentato valori che oscillavano da 5,42 mg QE 100 g⁻¹ (sulla) a 32,74 mg QE 100 g⁻¹ (cardo in purezza), mentre il miele di ape ligustica ha mostrato valori da 4,41 mg GAE 100 g⁻¹ (sulla) a 22,01 mg QE 100 g⁻¹ (eucalipto) (Fig.33).

Se analizziamo i singoli mieli in base all'origine botanica, l'ape nera sicula ha determinato un incremento del contenuto di flavonoidi totali presenti nel miele che è variato tra i commerciali, dal 14%, riscontrato per il miele di eucalipto, al 88,7% per il miele di ferula, mentre nel miele di cardo prodotto in purezza è stato riscontrato un incremento del 74,8%, rispetto a quello di ape ligustica.

La Fig.33 mostra risultati statisticamente differenti per tutti i mieli ad eccezione di quelli di arancio e sulla.

Anche per questo carattere i risultati ottenuti nell'ambito delle ricerche condotte, mostrano la variabilità del contenuto in flavonoidi totali in funzione dell'origine floreale, in accordo a Ferreres *et al.* (1991), Martos *et al.* (2000a, 2000b) e Tomás-Barberán *et al.* (2001).

Mentre per quanto concerne l'influenza del genotipo di ape i risultati ottenuti sono in linea con quanto riportato da Attanzio *et al.* (2016).

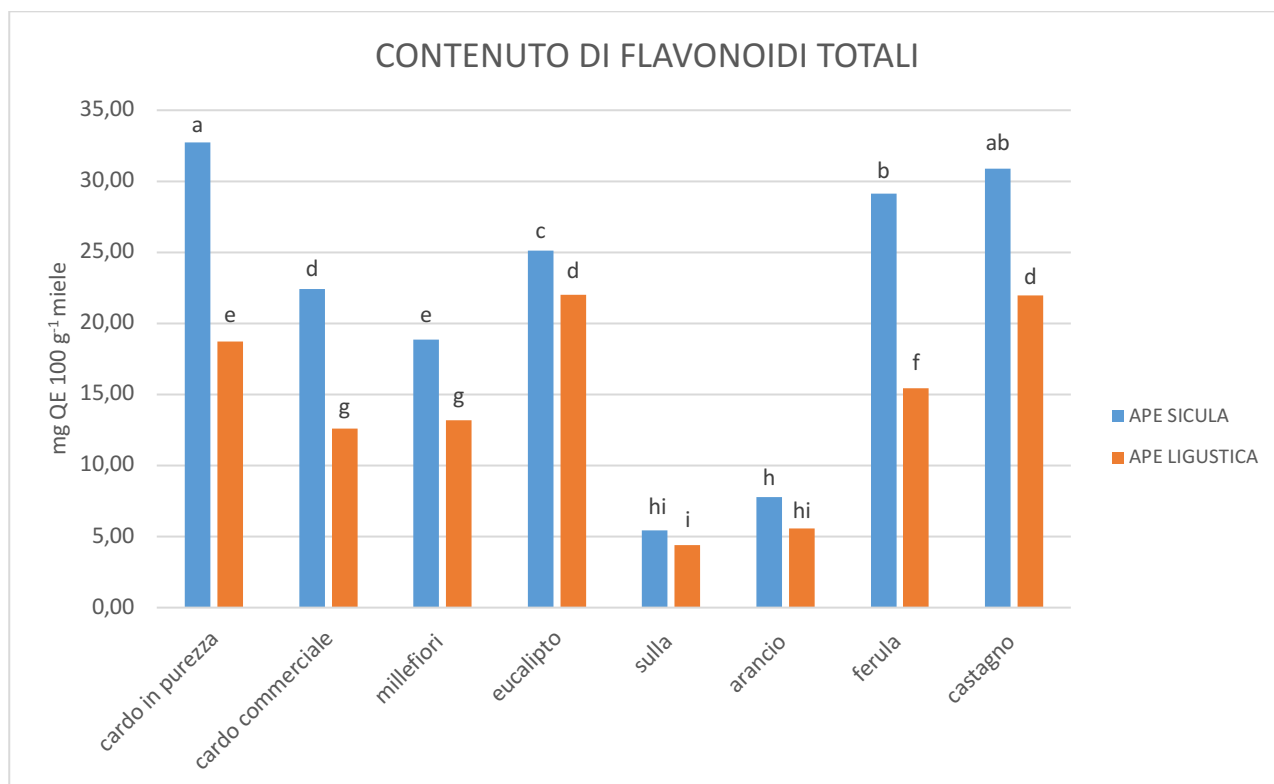


Fig. 33 - Contenuto di flavonoidi totali di estratti polifenolici di mieli di differente origine botanica, prodotti da 2 diversi genotipi di ape. Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

➤ Attività antiossidante

DPPH

Il valore di DPPH, pari nella media di tutti i fattori allo studio a $0,079 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele, fatta eccezione per i mieli di arancio e di sulla, che sono risultati statisticamente identici (Fig.34).

Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a $0,100 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ contro i $0,057 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ della ligustica, con un incremento del 75,1% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape i valori sono oscillati tra $0,019 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ del miele di arancio e $0,151 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ del miele di castagno.

Nell'ambito delle diverse origini botaniche i mieli prodotti da ape sicula hanno mostrato valori da $0,021 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ a $0,196 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ (rispettivamente per arancio e cardo in purezza), mentre quelli di ape ligustica oscillavano da $0,017 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ a $0,138 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ (rispettivamente per arancio ed eucalipto) (Fig.34). Se analizziamo i singoli mieli l'ape nera sicula rispetto alla ligustica ha determinato un incremento della capacità di scavenger radicale del miele che è variato dal 17%, riscontrato per il miele di eucalipto, al 92%, nel miele

di cardo, tra i commerciali, fino a raggiungere l'incremento del 654% nel caso del miele di cardo prodotto in purezza (Fig.34).

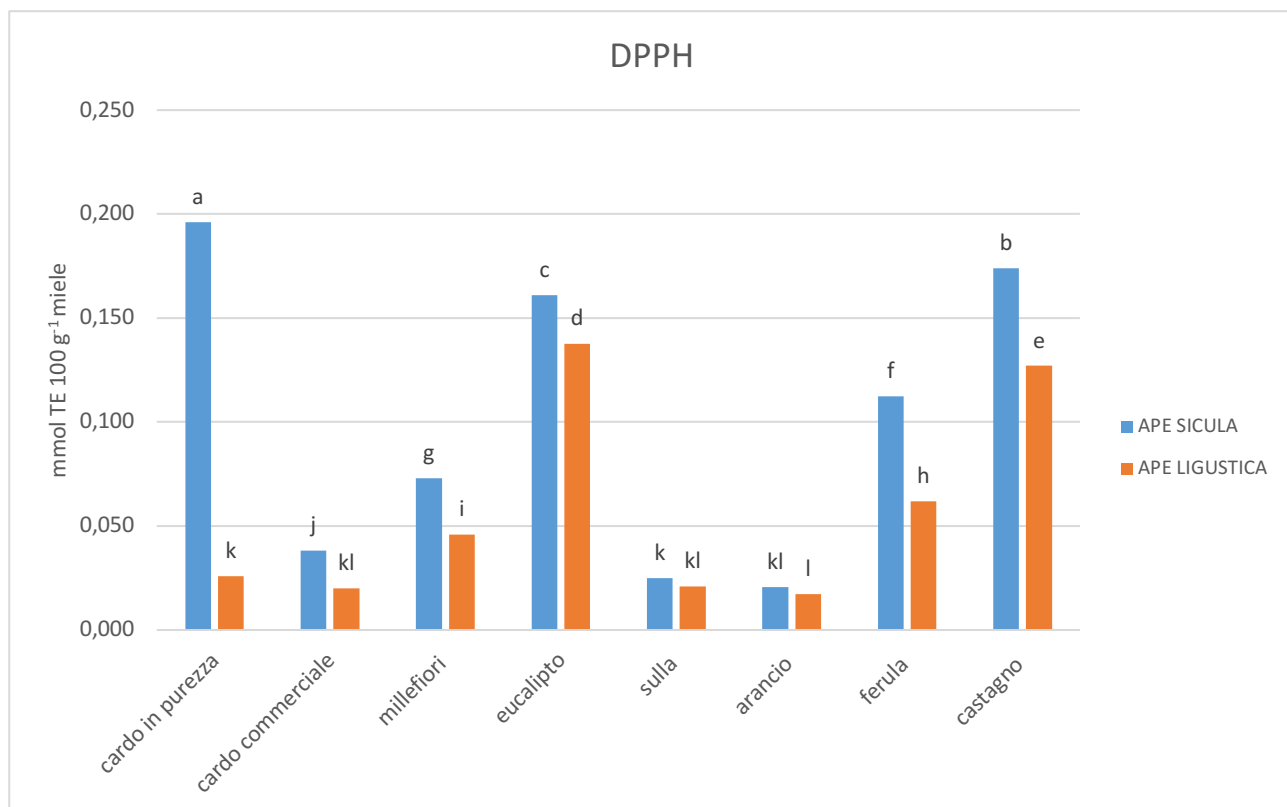


Fig. 34 -Capacità antiossidante, misurata con saggio DPPH, di estratti polifenolici di mieli di differente origine botanica, prodotti da 2 diversi genotipi di ape. Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

FRAP

Il valore di FRAP, pari nella media di tutti i fattori allo studio a $0,089 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele. Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a $0,116 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ contro i $0,062 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ della ligustica, con un incremento del 87,2% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape i valori sono oscillati tra $0,021 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ del miele di arancio e $0,165 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ del miele di eucalipto.

Nell'ambito delle diverse origini botaniche i mieli prodotti da ape sicula hanno mostrato valori da $0,022 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ a $0,242 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ (rispettivamente per arancio e cardo in purezza), mentre quelli di ape ligustica oscillavano da $0,019 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ a $0,149 \text{ mmol TE}$

100 g⁻¹ (rispettivamente per arancio ed eucalipto) (Fig.35). Analizzando i singoli mieli per origine botanica, l'ape nera sicula rispetto alla ligustica ha determinato un incremento della capacità riducente del miele dal 14%, riscontrato per il miele di arancio, al 92%, nel miele di cardo, tra i commerciali, fino a raggiungere l'incremento del 764% nel caso del miele di cardo prodotto in purezza (Fig.35).

La Fig. 35 mostra che i mieli di arancio e di sulla sono risultati statisticamente identici, così come i mieli di cardo in purezza e commerciale prodotti dall'ape ligustica.

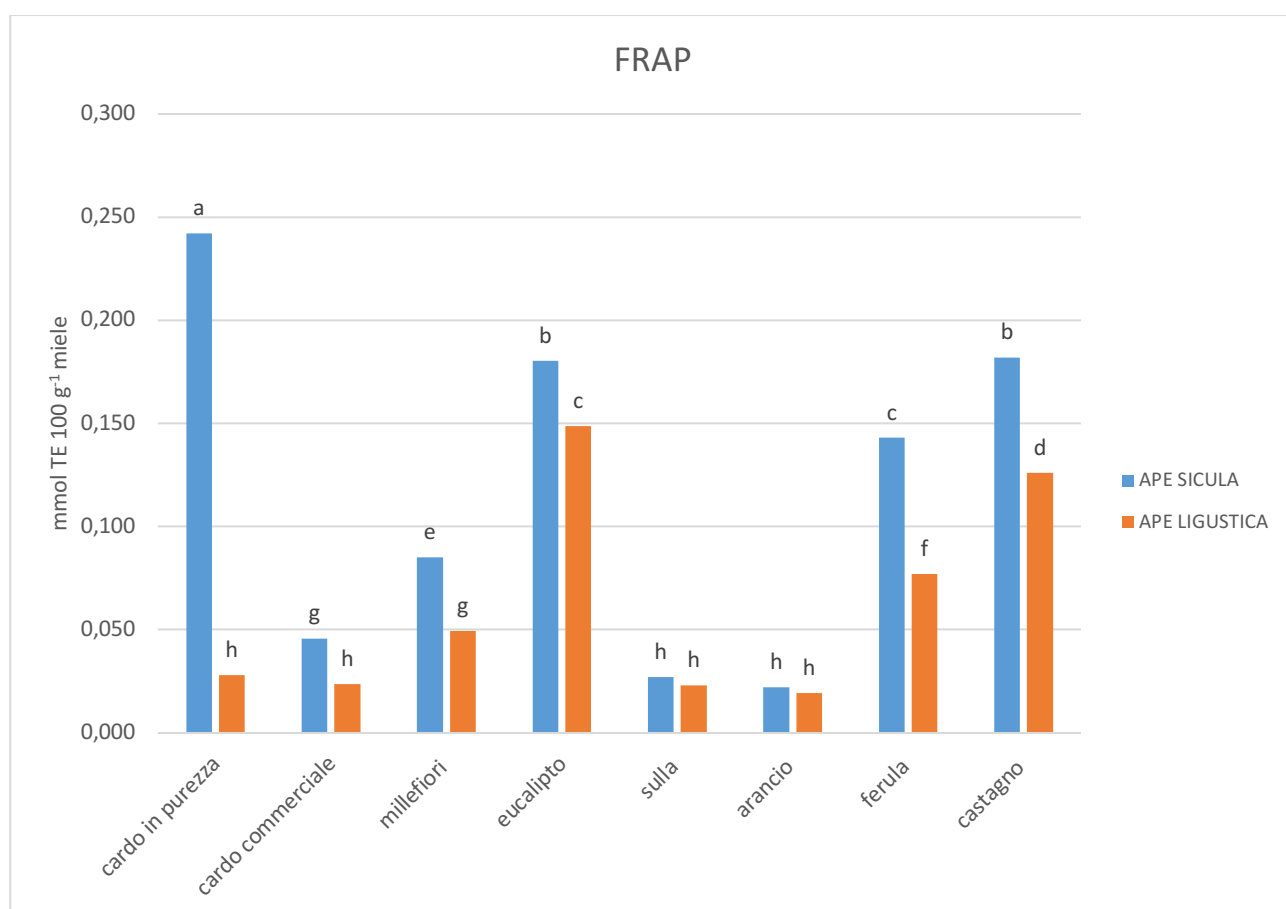


Fig. 35 - Capacità antiossidante, misurata con saggio FRAP, di estratti polifenolici di mieli di differente origine botanica, prodotti da 2 diversi genotipi di ape. Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

ABTS

Il valore di ABTS, pari nella media di tutti i fattori allo studio a 0,101 mmol TE 100 g⁻¹, è risultato significativamente influenzato sia dal genotipo di ape che dall'origine del miele.

Nella media dell'origine floreale, il miele prodotto dall'ape sicula ha presentato un valore pari a 0,131 mmol TE 100 g⁻¹ contro i 0,071 mmol TE 100 g⁻¹ della ligustica, con un incremento del 84,4% del contenuto. Mentre nella media del genotipo di ape i valori sono oscillati tra 0,025 mmol TE 100 g⁻¹ del miele di arancio e 0,180 mmol TE 100 g⁻¹ del miele di eucalipto.

Nell'ambito delle diverse origini botaniche i mieli prodotti da ape sicula hanno mostrato valori di ABTS che oscillavano da 0,027 mmol TE 100 g⁻¹ a 0,276 mmol TE 100 g⁻¹ (rispettivamente per arancio e cardo in purezza), mentre quelli di ape ligustica oscillavano da 0,022 mmol TE 100 g⁻¹ a 0,165 mmol TE 100 g⁻¹ (rispettivamente per arancio ed eucalipto) (Fig.36). Dall'analisi dei singoli mieli l'ape nera sicula rispetto alla ligustica ha determinato un incremento della capacità antiossidante del miele che è variato dal 13%, riscontrato per il miele millefiori, al 111%, nel miele di ferula, tra i commerciali, fino a raggiungere l'incremento del 688% nel caso del miele di cardo prodotto in purezza (Fig.36).

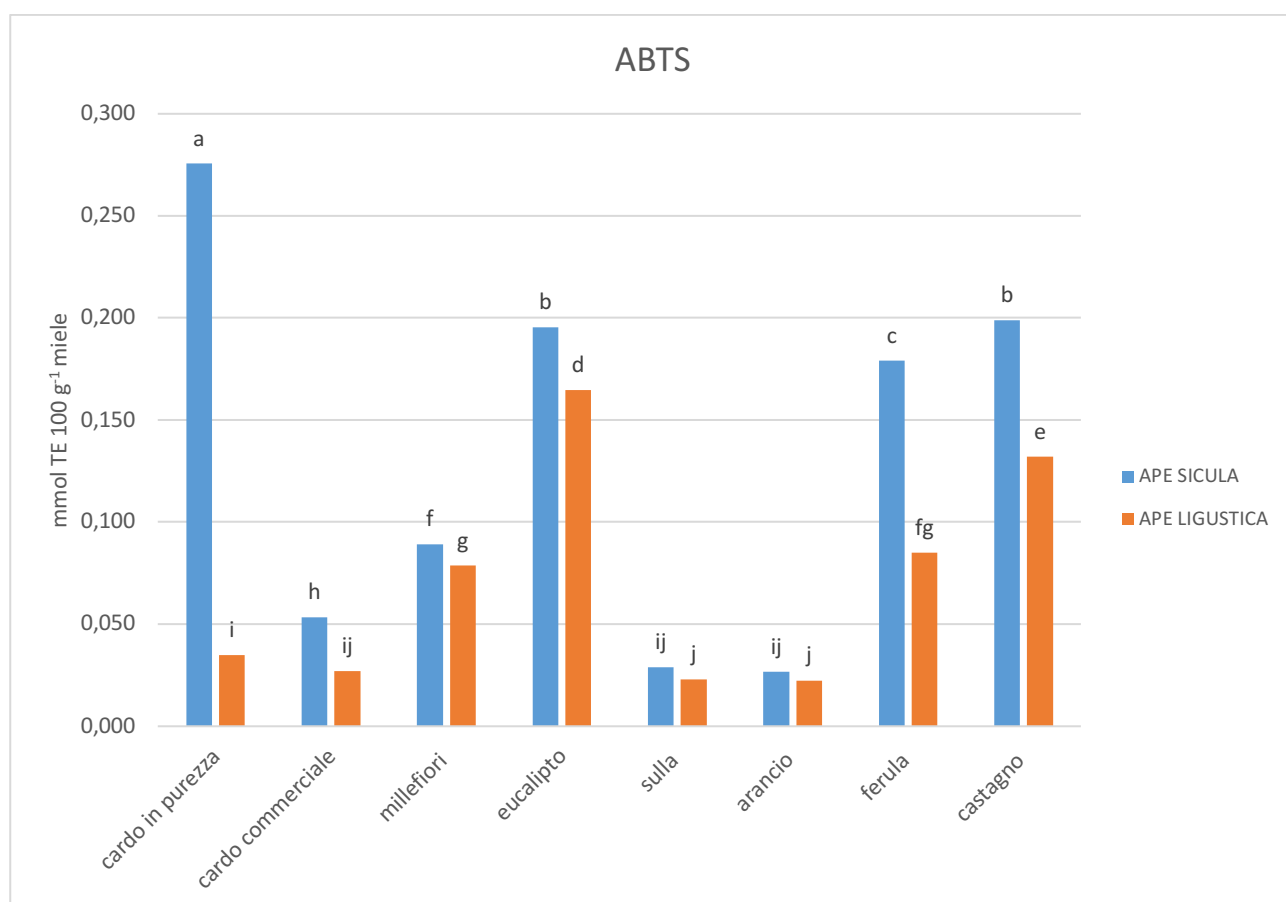


Fig. 36 - Capacità antiossidante, misurata con saggio ABTS, di estratti polifenolici di mieli di differente origine botanica, prodotti da 2 diversi genotipi di ape. Differenze statistiche significative in base al test t di Student ($p < 0,05$).

➤ Correlazione tra i parametri osservati

Anche nel caso dei mieli commerciali di varia origine botanica, l'esame dei coefficienti di correlazione tra i diversi parametri osservati, calcolati utilizzando i dati ottenuti nell'ambito di questa prova, permette di osservare una stretta correlazione tra la composizione fenolica e l'attività antiossidante dei mieli analizzati.

Quanto riscontrato riguardo alla correlazione tra contenuto in composti fenolici e attività antiossidante è perfettamente in accordo con quanto presente in letteratura (Tenore *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2009; Estevinho *et al.*, 2008; Vela *et al.*, 2007; Ghedolf *et al.*, 2002).

Tabella 6 Matrice di correlazione dei parametri studiati (coefficienti di correlazione di Pearson)

	Fenoli Totali	Flavonoidi Totali	DPPH	FRAP	ABTS
Fenoli Totali	-	-	-	-	-
Flavonoidi Totali	0,8858***	-	-	-	-
DPPH	0,8498***	0,8523***	-	-	-
FRAP	0,8870***	0,8657***	0,9906***	-	-
ABTS	0,8825***	0,8755***	0,9768***	0,9930***	-

*** $p < 0,001$

Conclusioni

I risultati sperimentali hanno evidenziato che nel miele di cardo, è possibile riscontrare alti contenuti di composti fenolici derivanti dalla pianta, che gli conferiscono un elevato valore nutraceutico, ciò risultato maggiormente evidente nel caso di miele di cardo prodotto in purezza.

I principali polifenoli presenti in tutti i mieli di cardo analizzati sono risultati l'acido clorogenico e l'apigenin-7-O-glucuronide; quest'ultimo, non essendo stato riscontrato in letteratura in nessun tipo di miele, potrebbe essere utilizzato come marker chimico del miele di cardo.

Il contenuto in molecole bioattive nel cardo prodotto in purezza e in quello commerciale è risultato significativamente influenzato dal genotipo di ape che lo ha prodotto. L'ape sicula, ha influenzato diverse caratteristiche di qualità del miele di cardo da essa prodotto, determinando, rispetto all'ape ligustica, un aumento significativo del contenuto fenolico e minerale, oltre che della capacità antiossidante.

Dall'analisi di mieli siciliani di diversa origine botanica, prodotti da ape sicula e ape ligustica, è emerso che la composizione del miele risulta significativamente influenzata, oltre che dall'origine floreale, dal genotipo di ape utilizzata, mostrando che l'ape sicula produce mieli di qualità superiore rispetto a quelli prodotti dall'ape ligustica.

Bibliografia

- Adzet, T., Camarasa, J., & Laguna, J.C. (1987). Hepatoprotective Activity of Polyphenolic Compounds from *Cynara scolymus* Against CCl₄ Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Journal of Natural Products*, 50(4), 612–617. doi:10.1021/np50052a004.
- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., & Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 61. doi:10.1186/1743-7075-9-61
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22(9), 1041–1047. doi:10.1016/s0271-5317(02)00406-2
- Aliferis, K. A., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Alissandrakis, E. (2010). Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food Chemistry*, 121(3), 856–862. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.098
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., ... Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2490–2499. doi:10.1016/j.fct.2010.06.021
- Amiot M.J., Aubert S., Gonnet M., Tacchini M. (1989). Phenolic composition of honeys: preliminary study on identification and group quantification. *Apidologie* 20, 115-125.
- Ancerewicz, J., Migliavacca, E., Carrupt, P.-A., Testa, B., Brée, F., Zini, R., ... Le Ridant, A. (1998). Structure–Property Relationships of Trimetazidine Derivatives and Model Compounds as Potential Antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(1), 113–120. doi:10.1016/s0891-5849(98)00072-0
- Andrade, P., Ferreres, F., & Amaral, M. T. (1997). Analysis of Honey Phenolic Acids by HPLC, Its Application to Honey Botanical Characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20(14), 2281–2288. doi:10.1080/10826079708006563
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549–562. doi:10.1016/s0308-8146(98)00057-0
- Antunes, A., Amaral, E., & Belgacem, M. N. (2000). *Cynara cardunculus* L.: chemical composition and soda-antraquinone cooking. *Industrial Crops and Products*, 12(2), 85–91. doi:10.1016/s0926-6690(00)00040-6
- Arias, M. C., & Sheppard, W. S. (1996). Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera*L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(3), 557–566. doi:10.1006/mpev.1996.0050

- Attanzio, A., Tesoriere, L., Allegra, M., & Livrea, M. A. (2016). Monofloral honeys by Sicilian black honeybee (*Apis mellifera* ssp. *sicula*) have high reducing power and antioxidant capacity. *Heliyon*, 2(11), e00193. doi:10.1016/j.heliyon.2016.e00193
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., & Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101(2), 502–514. doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.007
- Banguela, A. and Hernández L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnología Aplicada*, Vol.23, N.3.
- Basnizki, J. and Zohary, D. (1994). Breeding of seed-planted artichoke. *Plant Breeding Rev.* 12, 253–269 <http://dx.doi.org/10.1002/9780470650493.ch9>
- Bensch, E. (1992). Connaissance du miel. Des oligo-elements pour la santé. *Rev franc. apicult.* 569:383–386.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bogdanov, S. (2009). Harmonised methods of the international honey commission. Retrieved September 21, 2017, from <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbuhl, W., & Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689. doi:10.1080/07315724.2008.10719745
- Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method, *Lebensmittel- Wissenschaft und - Technologie/Food Science and Technology*, 30: 609-615.
- Brand-Williams, W., Culivier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Cabras, P., Angioni, A., Tuberoso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C., & Ghelli, S. (1999). Homogentisic Acid: A Phenolic Acid as a Marker of Strawberry-Tree (*Arbutus unedo*) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4064–4067. doi:10.1021/jf990141o
- Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10, 3, 178-182.
- Chiavaro, E., Vittadini, E., & Corradini, C. (2006). Physicochemical characterization and stability of inulin gels. *European Food Research and Technology*, 225(1), 85–94. doi:10.1007/s00217-006-0385-y

- Codex Stan 12-1981 Codex Alimentarius (2001). Revised Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981. Codex Alimentarius Commission. Rev. 1(1987), Rev. 2(2001).
- Conti M.E. & Botrè F. (2001). Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environ Mon Ass*, 69:267-282.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., & Burlando, B. (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology*, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00412
- Cotte, J. F., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J., & Grenier-Loustalot, M. F. (2004). Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(4), 698–705. doi:10.1007/s00216-004-2764-1
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
- Cuevas-Glory L.F., Pino J.A., Santiago L.S., & Sauri-Duch E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem* 103:1032–43.
- Curt, M. D., Sánchez, G., & Fernández, J. (2002). The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass Bioenerg.* 23(1), 33–46. [http://dx.doi.org/10.1016/s0961-9534\(02\)00030-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0961-9534(02)00030-2).
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- Devillers, J., Morlot, M., Pham-Delègue, M. H., & Doré, J. C. (2004). Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, 86(2), 305–312. doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.029
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. doi:10.1021/jf0115589
- Di Bella, G., Lo Turco, V., Potortì, A. G., Bua, G. D., Fede, M. R., & Dugo, G. (2015). Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 25–35. doi:10.1016/j.jfca.2015.05.003
- Encinar, J., González, J., & González, J. (2002a). Steam gasification of *Cynara cardunculus* L.: influence of variables. *Fuel Processing Technology*, 75(1), 27–43. doi:10.1016/s0378-3820(01)00247-8
- Encinar, J.M., Gonzàles, J.F., Rodríguez, J.J., and Tejedor, A. (2002b). Biodiesel fuels from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with ethanol. *Energ. Fuel*. 16, 443-450. <http://dx.doi.org/10.1021/ef010174h>
- Escarré, J., Lefèbvre, C., Gruber, W., Leblanc, M., Lepart, J., Rivière, Y., & Delay, B. (2000). Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. *New Phytologist*, 145(3), 429–437. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00599.x>

- Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borr.s, M., & Domenech, E. (2011). Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, 44(5), 1504–1513
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84–90. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.097
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774–3779. doi:10.1016/j.fct.2008.09.062
- European Commission, Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Off J Eur Commun L10*:47–52 (2002).
- Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Berti, F., Rossoni, G., Bombardelli, E., & Morazzoni, P. (1999). Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sciences*, 64(8), 627–642. doi:10.1016/s0024-3205(98)00605-5
- Fernandez-Torres, R., Perez-Bernal, J.L., Bello-Lopez, M.A., Callejon-Mochon, M., Jimenez-Sanchez, J.C., Guiraum-Perez, A. (2004). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta* 65, 686–691. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.030
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., & Estevinho, L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114(4), 1438–1443. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.028
- Ferreres, F., Andrade, P., Gil, M.I., & Tomas-Barberan, F.A. (1996). Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 202(1), 40-44. doi:10.1007/bf01229682
- Ferreres F., Andrade P., & Tomas-Barberan F.A.(1994a). Flavonoids from Portuguese heather honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199(1), 32-37. doi:10.1007/bf01192949
- Ferreres, F., Giner, J. M., & Tomás-Barberán, F. A. (1994b). A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(3), 371–372. doi:10.1002/jsfa.2740650316
- Ferreres, F., García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., & Tomás-Barberán, F. A. (1993). Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(1), 121–123. doi:10.1002/jsfa.2740610119
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M., & Cornuet, J.-M. (2000). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*, 9(7), 907–921. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x
- Frankel, S., Robinson, G. E., & Berenbaum, M. R. (1998). Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37(1), 27–31. doi:10.1080/00218839.1998.11100951

- Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T., & Kasahara, T. (2011). Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *International Immunopharmacology*, 11, 1150-1159.
- Gambacorta, E., Simonetti, A., Garrisi, N., Intaglietta, I., & Perna, A. (2014). Antioxidant properties and phenolic content of sulla (*Hedysarum* spp.) honeys from Southern Italy. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(10), 2260–2268. doi:10.1111/ijfs.12541
- Genovese, C., Platania, C., Venticinque, M., Calderaro, P., Argento, S., Scandurra, S., & Raccuia, S. A. (2016a). Evaluation of cardoon seeds presscake for animal feeding. *Acta Horticulturae*, (1147), 323–328. doi:10.17660/actahortic.2016.1147.45
- Genovese, C., Brundo, M. V., Toscano, V., Tibullo, D., Puglisi, F., & Raccuia, S. A. (2016b). Effect of *Cynara* extracts on multiple myeloma cell lines. *Acta Horticulturae*, (1147), 113–118. doi:10.17660/actahortic.2016.1147.16
- Ghedolf, N., Wang, X. H., & Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honey from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5870–5877.
- Gominho, J., Fernandez, J., & Pereira, H. (2001). *Cynara cardunculus* L. — a new fibre crop for pulp and paper production. *Ind. Crop Prod.* 13(1), 1–10. [http://dx.doi:10.1016/s0926-6690\(00\)00044-3](http://dx.doi:10.1016/s0926-6690(00)00044-3)
- Paramás, A. M. G., Báñez, J. A. G., Marcos, C. C., García-Villanova, R. J., & Sánchez, J. S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, 95(1), 148–156. doi:10.1016/j.foodchem.2005.02.008
- González, J., Pérez, F., Fernández, J., Lezaun, J. A., Rodríguez, D., & Perea, F. (2004a). Study of *Cynara cardunculus* l. lignocelulosic biomass production in dry conditions. *Acta Hortic.* (660), 221–227. <http://dx.doi:10.17660/actahortic.2004.660.29>
- González, J. F., González-García, C. M., Ramiro, A., González, J., Sabio, E., Gañán, J., & Rodríguez, M. A. (2004b). Combustion optimization of biomass residue pellets for domestic heating with a mural boiler. *Biomass Bioenerg.* 27(2), 145–154. <http://dx.doi:10.1016/j.biombioe.2004.01.004>
- Guo, M., & Gokavi, S. S. (2005). Prebiotics and Probiotics for the Prevention of Colon Cancer. *JOURNAL OF CANCER INTEGRATIVE MEDICINE*, 03(03), 112. doi:10.2310/7200.2005.33005. *International Immunopharmacology*, 11, 1150-1159
- Hermosín, I., Chicón, R. M., & Dolores Cabezudo, M. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83(2), 263–268. doi:10.1016/s0308-8146(03)00089-x
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73–82. doi:10.1016/j.copbio.2008.03.003

- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. doi:10.1021/jf030723c
- Iglesias, M. T., de Lorenzo, C., Polo, M. del C., Martín-Álvarez, P. J., & Pueyo, E. (2004). Usefulness of Amino Acid Composition to Discriminate between Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 84–89. doi:10.1021/jf030454q
- Isla MI, Craig A, Ordoñez R, Zampini C, Sayago J, Bedascarrasbure E, Alvarez A, Salomon V, Maldonado L. (2011). Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT-Food Sci Technol* 44:1922–30.
- Kaškonienė, V., Kaškonas, P., & Maruška, A. (2015). Volatile compounds composition and antioxidant activity of bee pollen collected in Lithuania. *Chemical Papers*, 69(2). doi:10.1515/chempap-2015-0033
- Kaškonienė, V., Ruočkuvienė, G., Kaškonas, P., Akuneca, I., & Maruška, A. (2014). Chemometric Analysis of Bee Pollen Based on Volatile and Phenolic Compound Compositions and Antioxidant Properties. *Food Analytical Methods*, 8(5), 1150–1163. doi:10.1007/s12161-014-9996-2
- Kowalski S., Łukasiewicz M., Berski W. (2013). Applicability of physico-chemical parameters of honey for identification of the botanical origin. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 12(1), 51-59.
- Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. *FAO Agric. Serv.* 124, 87–113.
- Kücük, M. – Kolayli, S. – Karaoğlu, Ş. – Ulusoy, E. – Baltacı, C. – Candan, F.: Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 2007
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., & Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 131–144. doi:10.1016/j.jff.2009.01.002
- Leonardi, C., Pappalardo, H., Genovese, C., Puglia, G., Bua, G. D., Dugo, G., & Raccuia, S. A. (2016a). Mechanisms of phytoextraction in *Cynara cardunculus* L. growing under cadmium and arsenic stress. *Acta Horticulturae*, (1147), 139–144. doi: 10.17660/actahortic.2016.1147.19
- Leonardi, C., Toscano, V., Pappalardo, H., Genovese, C., & Raccuia, S. A. (2016b). The potential of *Cynara cardunculus* L. for phytoremediation of heavy metal in contaminated soils. *Acta Horticulturae*, (1147), 127–138. doi:10.17660/actahortic.2016.1147.18
- Leonardi, C., Pappalardo, H., Genovese, C., Pulvirenti M., Toscano V., Malilli M.G., & Raccuia, S. A. (2016c). Phytotoxicity of heavy metals in *Cynara cardunculus* L. growing in contaminated soil. *Acta Horticulturae*, (1147), 119–125. doi: 0.17660/ActaHortic.2016.1147.17
- Lombardo, S., Pandino, G., & Mauromicale, G. (2015). The nutraceutical response of two globe artichoke cultivars to contrasting NPK fertilizer regimes. *Food Research International*, 76, 852–859. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.042

- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59(4), 139–157. doi:10.1080/0005772x.1978.11097714
- Louveaux, J., & Vergeron, P. (1964). Étude du spectre pollinique de quelques miels espagnols. *Ann Abeille*, 1:329-347.
- Lucini, L., Kane, D., Pellizzoni, M., Ferrari, A., Trevisi, E., Ruzickova, G., & Arslan, D. (2016). Phenolic profile and in vitro antioxidant power of different milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] cultivars. *Industrial Crops and Products*, 83, 11–16. doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.023
- Määttä, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2003). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Phenolic Compounds in Berries with Diode Array and Electrospray Ionization Mass Spectrometric (MS) Detection: Ribes Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6736–6744. doi:10.1021/jf0347517
- Mannina, L.; Sobolev, A.P.; Di Lorenzo, A.; Vista, S.; Tenore, G.C.; Daglia, M. (2015). Chemical Composition of Different Botanical Origin Honey Produced by Sicilian Black Honeybees (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). *J. Agric. Food Chem.*, 63, 5864–5874.
- Martos, I., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Identification of Flavonoid Markers for the Botanical Origin of Eucalyptus Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1498–1502. doi:10.1021/jf991166q
- Mateo, R., & Bosch-Reig, F. (1998). Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 393–400
- Mazzei, V., Giannetto, A., Brundo, M. V., Maisano, M., Ferrante, M., Copat, C., ... Longo, G. (2015). Metallothioneins and heat shock proteins 70 in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea) exposed to cadmium and lead. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 116, 99–106. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.03.007
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571–577.
- Meo, S.A., Al-Asiri, S.A., Mahesar, A.L., & Ansari, M.J. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi J Biol Sci.*, 24(5):975-978. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.12.010
- Miccadei, S., Venere, D. D., Cardinali, A., Romano, F., Durazzo, A., Foddai, M. S., ... Maiani, G. (2008). Antioxidative and Apoptotic Properties of Polyphenolic Extracts from Edible Part of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) on Cultured Rat Hepatocytes and on Human Hepatoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 60(2), 276–283. doi:10.1080/01635580801891583
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, 1187(1-2), 18–24. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.001

- Mileo, A. M., Di Venere, D., Linsalata, V., Fraioli, R., & Miccadei, S. (2012). Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231. *Journal of Cellular Physiology*, 227(9), 3301–3309. doi:10.1002/jcp.24029
- Min, D.B. (1998). Lipid oxidation of edible oil. In: Akoh K, Min DB, editors. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New York: Marcel Dekkar. pp. 283–296.
- Mitmesser, S., & Combs, M. (2017). Prebiotics: Inulin and Other Oligosaccharides. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 201–208. doi:10.1016/b978-0-12-804024-9.00023-9
- Molan, P.C., & Betts, J.A. (2004). Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *J. Wound Care*, 13, 353-356.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhyrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
- Ochoa, M. J., & Fandos, A. (2004). Evaluation of vegetable cardoon (*Cynara cardunculus* L.) populations for biomass production under rainfed conditions. *Acta Hort.* (660), 235–239. <http://dx.doi:10.17660/actahortic.2004.660.31>.
- Pandino, G., Courts, F. L., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2010). Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in the Immature Inflorescence of Globe Artichoke, Wild Cardoon, and Cultivated Cardoon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1026–1031. doi:10.1021/jf903311j
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2011). Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, 126(2), 417–422. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.001
- Pappalardo, H., Leonardi, C., Genovese, C., Toscano, V., Melilli, M. G., & Raccuia, S. A. (2016). Effects of heavy metals on seedlings germination and growth in different cardoon genotypes. *Acta Horticulturae*, (1147), 281–288. doi:10.17660/actahortic.2016.1147.39
- Pereira, C., Calhelha, R. C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. *Industrial Crops and Products*, 49, 61-65.
- Pérez-García, F., Adzet, T., & Cañigueral, S. (2000). Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radical Research*, 33(5), 661–665.
- Pérez, R. A., Iglesias, M. T., Pueyo, E., González, M., & de Lorenzo, C. (2007). Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 360–365. doi:10.1021/jf062055b
- Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R. M., & Tadeo, J. L. (2002). Analysis of Volatiles from Spanish Honeys by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2633–2637. doi:10.1021/jf011551r

- Persano Oddo, L., Piazza, M. G., Sabatini, A. G., & Accorti, M. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26(6), 453–465.
- Persano-Oddo, L., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35,38-81.
- Pichichero, E., Canuti, L., & Canini, A. (2009) *J. Sci. Food Agric.* 89, 609–616. doi:10.1002/jsfa.3484
- Pinelli, P., Agostini, F., Comino, C., Lanteri, S., Portis, E., & Romani, A. (2007). Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. *Food Chemistry*, 105(4), 1695–1701. doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.014
- Pisani, A., Protano, G., & Riccobono, F. (2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chem.* 107, 1553–1560.
- Piscioneri, I., Sharma, N., Baviello, G., & Orlandini, S. (2000). Promising industrial energy crop, *Cynara cardunculus*: a potential source for biomass production and alternative energy. *Energ. Convers. Manage.* 41(10), 1091–1105. [http://dx.doi:10.1016/s0196-8904\(99\)00135-1](http://dx.doi:10.1016/s0196-8904(99)00135-1).
- Poiana, M., Fuda, S., Manziu, E., Postorino, S., & Mincione, B. (1996). Research on commercial honeys in Italy - mineral fraction. *Industrie Alimentari*, 35, 522-530.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
- Pulito, C., Mori, F., Sacconi, A., Casadei, L., Ferraiuolo, M., Valerio, M. C., & Strano, S. (2015). *Cynara scolymus* affects malignant pleural mesothelioma by promoting apoptosis and restraining invasion. *Oncotarget*, 6(20).
- Raccuia S.A. (1995). Caratteristiche di qualità del capolino e della biomassa di colture del genere *Cynara* in rapporto alle possibili utilizzazioni. Tesi di Dottorato di Ricerca, Facoltà di Agraria dell'Università di Catania.
- Raccuia S.A., Cavallaro V., & Melilli M.G. (2004a). Intraspecific variability in *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* Lam. Sicilian populations: seed germination under salt and moisture stresses. *Journal of arid environments* 56 (1), 107-116. [http://dx.doi:10.1016/s0140-1963\(03\)00006-5](http://dx.doi:10.1016/s0140-1963(03)00006-5)
- Raccuia, S. A., & Melilli, M. G. (2004b). *Cynara cardunculus* L., a potential source of inulin in the Mediterranean environment: screening of genetic variability. *Aust. J. Agr. Res.* 55(6), 693. <http://dox.doi:10.1071/ar03038>.
- Raccuia, S. A., & Melilli, M. G. (2007). Biomass and grain oil yields in *Cynara cardunculus* L. genotypes grown in a Mediterranean environment. *Field Crop Res.* 101(2), 187–197. <http://dx.doi:10.1016/j.fcr.2006.11.006>
- Raccuia, S. A., & Melilli, M. G. (2010). Seasonal dynamics of biomass, inulin, and water-soluble sugars in roots of *Cynara cardunculus* L. *Field Crops Res.*, 116(1-2), 147–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2009.12.005>.

- Raccuia, S. A., Piscioneri, I., Sharma, N., & Melilli, M. G. (2011). Genetic variability in *Cynara cardunculus* L. domestic and wild types for grain oil production and fatty acids composition. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3167–3173. <http://dx.doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.047>.
- Raccuia, S.A., Melilli, M., Scandurra, S., & Calderaro, P. (2013). Chemical characterization of *Cynara cardunculus* var. *altilis* biomass with low ashes content to obtain solid biofuel. *Acta Hort.*, 983, 123-127 [10.17660/ActaHortic.2013.983.15](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.983.15)
- Raccuia, S. A., Genovese, C., Leonardi, C., Bognanni, R., Platania, C., Calderaro, P., & Melilli, M. G. (2016). Fructose production by *Cynara cardunculus* inulin hydrolysis. *Acta Horticulturae*, (1147), 309–314. [doi:10.17660/actahortic.2016.1147.43](https://doi.org/10.17660/actahortic.2016.1147.43)
- Ramos, P. A. B., Santos, S. A. O., Guerra, Â. R., Guerreiro, O., Freire, C. S. R., Rocha, S. M., Silvestre, A. J. D. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of different morphological parts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC). *Industrial Crops and Products*, 61, 460–471. [doi:10.1016/j.indcrop.2014.07.042](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.042)
- Ramos, P., Guerra, Â., Guerreiro, O., Santos, S., Oliveira, H., Freire, C., ... Duarte, M. (2016). Antiproliferative Effects of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC) Lipophilic Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 63. [doi:10.3390/ijms18010063](https://doi.org/10.3390/ijms18010063)
- Rapporto annuale 2015 dell'Osservatorio nazionale della produzione e del mercato del miele.
- Rashed, M. N., & Soltan, M. E. (2004). Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *J. of Food Composition and Analysis*, 17, 725–735.
- Ristivojević, P., Trifković, J., Gašić, U., Andrić, F., Nedić, N., Tešić, Ž., & Milojković-Opsenica, D. (2014). Ultrahigh-performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap/MS/MS) Study of Phenolic Profile of Serbian Poplar Type Propolis. *Phytochemical Analysis*, 26(2), 127–136. [doi:10.1002/pca.2544](https://doi.org/10.1002/pca.2544)
- Rodriguez de Sotillo, D. V., & Hadley, M. (2002). Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 717-726.
- Rottenberg, A., & Zohary, D. (1996). The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43(1), 53–58. [doi:10.1007/bf00126940](https://doi.org/10.1007/bf00126940)
- Saànchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., & Saura-Calixto, F. (1998). New parameter for evaluation of free radical scavenging capacity of polyphenols, 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ESCOC-2)
- Salvaggio, A., Pecoraro, R., Scalisi, E. M., Tibullo, D., Lombardo, B. M., Messina, G., ... Brundo, M. V. (2017). Morphostructural and immunohistochemical study on the role of metallothionein in the detoxification of heavy metals in *Apis mellifera* L., 1758. *Microscopy Research and Technique*, 80(11), 1215–1220. [doi:10.1002/jemt.22919](https://doi.org/10.1002/jemt.22919)
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Res.* 9(2):121-127. [doi: 10.4103/0974-8490.204647](https://doi.org/10.4103/0974-8490.204647)
- Seisonen, S., Kivima, E., & Vene, K. (2015). Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas

- chromatography–mass spectrometry/olfactometry. *Food Chemistry*, 169, 34–40. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.125
- Simsek, E. N., & Uysal, T. (2013). In vitro Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of *Cynara L.* Species in Colorectal Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6791–6795.
- Sinacori, A., Rinderer, T. E., Lancaster, V., & Sheppard, W. S. (1998). A morphological and mitochondrial assessment of *Apis mellifera* from Palermo, Italy. *Apidologie*, 29(6), 481–490. doi:10.1051/apido:19980601
- Smirnova, L. P., & Pervykh, L. N. (1998). Quantitative determination of the total content of flavonoids in the flowers of immortal *Helichrysum arenarium*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 32(6), 321–324. doi:10.1007/bf02580519
- Soria, A. C., González, M., de Lorenzo, C., Martínez-Castro, I., & Sanz, J. (2004). Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry*, 85(1), 121–130. doi:10.1016/j.foodchem.2003.06.012
- Spayd, S. E., Tarara, J. M., Mee, D. L., & Ferguson, J. C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis Vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(3), 171–182
- Tenore, G. C., Ritieni, A., Campiglia, P., & Novellino, E. (2012). Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian black honeybees (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 1955–1961. doi:10.1016/j.fct.2012.03.067
- Terrab, A., González, A. G., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2003). Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(7), 637–643. doi:10.1002/jsfa.1341
- Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., & Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 485–496. doi:10.1002/jsfa.836
- Toscano, V., Sollima, L., Genovese, C., Melilli, M. G., & Raccuia, S. A. (2016). Pilot plant system for biodiesel and pellet production from cardoon: technical and economic feasibility. *Acta Horticulturae*, (1147), 429–442. doi:10.17660/actahortic.2016.1147.60
- Truchado, P., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7241–7248. doi:10.1016/j.chroma.2009.07.057
- Tuberoso, C. I. G., Bifulco, E., Caboni, P., Sarais, G., Cottiglia, F., & Floris, I. (2011). Lumichrome and Phenyllactic Acid as Chemical Markers of Thistle (*Galactites tomentosa* Moench) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 364–369. doi:10.1021/jf1039074

- Vázquez, M. D., Barceló, J., Poschenrieder, C., Mádico, J., Hatton, P., Baker, A. J. M., & Cope, G. H. (1992). Localization of Zinc and Cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a Metallophyte that can Hyperaccumulate both Metals. *Journal of Plant Physiology*, 140(3), 350–355. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(11\)81091-6](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(11)81091-6)
- Vela, L., de Lorenzo, C., & Pérez, R. A. (2007). Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 1069–1075. doi:10.1002/jsfa.2813
- Vicente, G., Martínez, M., & Aracil, J. (2006). A Comparative Study of Vegetable Oils for Biodiesel Production in Spain. *Energy & Fuels*, 20(1), 394–398. doi:10.1021/ef0502148
- Wan, C. W., Wong, C. N. Y., Pin, W. K., & Wong, M. H. Y. (2013). Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- α in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy research*, 27, 545-551.
- Weston, R. J., & Brocklebank, L. K. (1999). The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*, 64(1), 33–37. doi:10.1016/s0308-8146(98)00099-5
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., & Raymont, K. (2005). Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 38(6), 651–658. doi:10.1016/j.foodres.2005.01.002
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., Martos, I., & Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81(2), 159–168. doi:10.1016/s0308-8146(02)00388-6
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., & Raymont, K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86(2), 169–177. doi:10.1016/j.foodchem.2003.08.013
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. doi:10.1016/s0308-8146(98)00102-2