



Università
Ca' Foscari
Venezia

**Corso di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali
curriculum “Monitoraggio e risanamento dell’ambiente”**

Tesi di Laurea Magistrale

**CARATTERIZZAZIONE DI MIELI
PRODOTTI IN UN’AREA LAGUNARE
PER IL CONTENUTO DI COMPONENTI
DI INTERESSE NUTRACEUTICO**

Relatore

*Prof. Gabriele
Capodaglio*

Correlatori

Elisa Scalabrin

Raffaello Tedesco

Laureanda

Giorgia Breda

Matricola 862595

Anno Accademico

2021-2022

SOMMARIO

INTRODUZIONE

1. OBIETTIVI DELLA TESI.....	1
2. IL MIELE	2
3. COMPOSTI PRINCIPALI DEL MIELE.....	3
3.1. ZUCCHERI.....	3
3.2. ACQUA.....	3
3.3. ACIDI ORGANICI.....	4
3.4. SOSTANZE AZOTATE.....	4
3.5. ELEMENTI.....	4
4. FLAVONOIDI.....	5
4.1. ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE	6
4.2. ATTIVITA' ANTINFIAMMATORIA	7
4.3. ATTIVITA' ANTIMICROBICA	7
4.4.1. APIGENIN	8
4.4.2. NARINGENIN	9
4.4.3. KAEMPFEROL.....	10
4.4.4. RUTIN	10
4.4.5. QUERCETIN	11
5. L'ISOLA DI SANT'ERASMO E I SUOI MIELI	13
6. L'APPROCCIO METABOLOMICO	15

MATERIALI E METODI

7. APPROCCIO METABOLOMICO: ASPETTI RILEVANTI PER LA PROCEDURA ANALITICA	16
8. MATERIALI USATI.....	17
8.1. SOLUZIONI STANDARD	18
8.2. ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA	19
8.3. CAMPIONI DI MIELE.....	21
9. STRUMENTAZIONE (LC/MS).....	21
9.1. HPLC	21
9.2. SPETTROMETRIA DI MASSA	23
9.3. SPETTRO DI MASSA	29

10.	VALUTAZIONE DEL METODO	33
10.1.	PROCEDURA OTTIMIZZATA DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.....	35
10.2.	METODO STRUMENTALE PER L'ANALISI DEL MIELE.....	36
10.3.	IDENTIFICAZIONE DEI COMPOSTI.....	38
11.	RISULTATI.....	39
11.1.	MESSA A PUNTO DEL METODO PER L'ESTRAZIONE DEI FLAVONOIDI.....	39
11.1.1.	Esclusione delle SPE stirene-divinilbenzene (Strata X).....	39
11.1.2.	Valutazione dei recuperi di flavonoidi con i diversi metodi testati.....	40
11.2.	RISULTATI DEI FLAVONOIDI NEI CAMPIONI DI MIELE.....	44
11.3.	RISULTATI ALTRI COMPOSTI DI INTERESSE.....	47
12.	CONCLUSIONI.....	60
13.	RINGRAZIAMENTI.....	61
14.	BIBLIOGRAFIA.....	62
15.	SITOGRAFIA	71
16.	APPENDICE I.....	72
17.	APPENDICE II.....	73
18.	APPENDICE III.....	74
19.	APPENDICE IV.....	80
20.	APPENDICE V	85

INTRODUZIONE

1. OBIETTIVI DELLA TESI

Lo sviluppo di metodi analitici per la caratterizzazione degli alimenti, al fine di verificarne la qualità e garantirne l'origine è un ambito emergente, anche a causa delle sempre maggiori richieste dei consumatori. Il miele è un alimento di largo consumo a livello globale, e ad esso sono legati numerosi effetti benefici ed un uso tradizionale come medicinale (Koulis et al., 2021). La maggiore consapevolezza dei consumatori ha portato alla necessità di identificare le sostanze alle quali questi effetti benefici sono associati, al fine di valorizzare i prodotti e le loro specificità e garantendo la qualità del prodotto e le sue caratteristiche organolettiche.

In questo contesto, nel presente lavoro di tesi è stata ottimizzata una metodica che permetta la caratterizzazione del miele dal punto di vista nutraceutico, individuando la presenza di sostanze con effetti benefici (in particolare flavonoidi), per valutare la presenza di componenti che possono essere messe in relazione all'origine florale, al fine di differenziare diversi tipi di miele dal punto di vista biochimico. Sono stati presi in considerazione 4 mieli di diversa origine botanica, provenienti da un'azienda apistica dell'isola di Sant'Erasmo (VE).

Dal punto di vista analitico, è stato necessario ottimizzare la metodica preanalitica per eliminare le componenti della matrice, costituita dagli zuccheri semplici, che costituiscono circa l'80% del miele, e che sono in grado di interferire nella determinazione dei principi attivi. La fase di preparazione del campione è stata ottimizzata attraverso il confronto di diverse fasi stazionarie per l'estrazione in fase solida (SPE), con l'obiettivo di massimizzare il recupero di flavonoidi. L'analisi è stata condotta utilizzando la cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC/MS), seguendo l'approccio metabolomico.

Il metodo è stato quindi applicato a 4 tipologie di miele, diverse per composizione florale e stagionalità: miele di barena, miele di acacia, miele millefiori primaverile e miele millefiori autunnale. L'analisi ha permesso di valutarne il contenuto di flavonoidi e identificare la presenza di altre sostanze di interesse nutraceutico o legate all'origine botanica del miele.

2. IL MIELE

“Il miele è il prodotto alimentare che le api producono dal nettare dei fiori o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o che si trovano sulle stesse, che esse bottinano, trasformano, combinano con sostanze specifiche proprie e lasciano maturare nei favi dell'alveare.”

(74/409/CEE, 1974; FAO & WHO, 1981; Legge 753/1982, 1982)¹

In questa definizione di miele si trova la sua duplice origine, vegetale e animale.

Il miele è, infatti, la sostanza zuccherina elaborata dalle api a partire dal nettare dei fiori o dalla melata. Si distinguono perciò due tipi fondamentali di miele: il primo è prodotto dal nettare dei fiori, il secondo dalle secrezioni zuccherine presenti sulle piante in seguito allo sviluppo di alcuni insetti fitomizi (melata).

Il nettare è un liquido zuccherino derivato dalla linfa dei vegetali superiori e secreto da particolari organi ghiandolari chiamati nettari, situati generalmente nel fiore alla base dei petali.

Esso è costituito essenzialmente da acqua e da tre zuccheri, saccarosio, glucosio e fruttosio, in concentrazione e proporzioni relative diverse, in rapporto anche all'origine botanica.

Sono inoltre presenti piccole quantità di altri zuccheri e sostanze aromatiche, sali minerali, acidi organici, amminoacidi, enzimi (Cabras & Martelli, 2015).

Come si è detto, la composizione del nettare, relativamente costante per ogni specie botanica, condiziona direttamente la composizione del miele che ne deriva.

La melata è originata anch'essa dalla linfa delle piante, ma a differenza del nettare, che è secreto tramite un processo attivo, la sua produzione è mediata dall'azione di alcuni insetti, appartenenti all'ordine dei Rincoti, che succhiando la linfa a fini nutritivi, ne trattengono le sostanze azotate ed espellono il liquido in eccesso, in cui sono disciolti gli zuccheri.

Questa soluzione, denominata melata, rimane sulla superficie delle foglie e dei rami delle piante che ospitano gli insetti parassiti e viene raccolta dalle api e da altri insetti (Cabras & Martelli, 2015).

Il miele è composto principalmente da acqua (17% w/w) e da due zuccheri semplici, glucosio e fruttosio, la cui concentrazione media è del 38% e 31% in peso rispettivamente (J. Alvarez-Suarez et al., 2013). I carboidrati costituiscono, approssimativamente, circa il 75-80% del miele. Sono presenti inoltre vari nutrienti, come sostanze organiche azotate (0.2-2%), elementi (0.1-1.5%), acidi organici (0.1-0.5%), polifenoli, vitamine, per un totale di circa 180 sostanze. Le sostanze chimiche minoritarie del miele, pur essendo presenti in quantità esigue, possono essere utilizzate per definire le proprietà

¹ Legge italiana del 12 Ottobre 1982, n.753 che ha recepito la Direttiva Comunitaria del 1974 e Norma internazionale sul miele emanata dalla Commissione del Codex Alimentarius FAO/OMS nel 1969

organolettiche e la qualità del miele (Schievano et al., 2013) e sono direttamente influenzate dall'origine botanica del miele (Balkanska et al., 2020) o dalla qualità della melata. Tuttavia la presenza e concentrazione di tali sostanze, oltre che dall'origine botanica, è anche influenzata dall'origine geografica, dalle tecniche di apicoltura, dalle condizioni ambientali (J. M. Alvarez-Suarez et al., 2018).

3. COMPOSTI PRINCIPALI DEL MIELE

La composizione chimica del miele, essendo correlata alle sue proprietà organolettiche e alla qualità del prodotto, condiziona il suo valore nutraceutico ed economico. Il miele, infatti, viene consumato per il suo elevato valore nutritivo e per scopi medici fin dall'antichità (Al-Qassemi et al., 2003).

Le principali caratteristiche che hanno reso il miele un elemento così prezioso, oltre all'alto valore nutritivo, sono l'elevata osmolarità che fornisce una barriera protettiva, l'effetto levigante sulla pelle sia per interesse medico che cosmetico, le proprietà antinfiammatorie, antibatteriche e antiossidanti derivanti dalle sostanze presenti nel miele, in particolare dai composti fenolici (Makawi et al., 2009).

3.1. ZUCCHERI

Gli zuccheri, vista la loro elevata concentrazione nel miele, sono le sostanze che in massima parte determinano le sue proprietà fisiche quali viscosità, igroscopicità e stato fisico (liquido o cristallizzato). Il glucosio e il fruttosio costituiscono circa il 90% degli zuccheri totali ed hanno una duplice origine: in parte derivano dal nettare ed in parte dall'idrolisi del saccarosio del nettare operata dall'enzima invertasi, secreto dalle ghiandole salivari dell'ape.

Il rapporto glucosio/fruttosio è importante, in quanto, essendo il primo meno solubile in acqua una sua elevata concentrazione favorisce la tendenza alla cristallizzazione; per contro l'elevata solubilità del fruttosio, unita alla sua spiccata igroscopicità, contribuisce alla conservazione del miele allo stato liquido (Cabras & Martelli, 2015).

3.2. ACQUA

Il contenuto in acqua è una delle caratteristiche più importanti del miele, poichè ne condiziona la conservabilità, contribuendo di conseguenza a definirne anche la qualità. È legato a numerosi fattori: l'origine botanica, le condizioni atmosferiche e ambientali precedenti e successive all'estrazione, l'intensità del flusso nettario, la stagione di produzione, le modalità di intervento dell'apicoltore, le condizioni di conservazione. Il valore ottimale può essere definito intorno al 17%. Valori elevati provocano con facilità fenomeni fermentativi (Cabras & Martelli, 2015).

3.3. ACIDI ORGANICI

Il pH dei mieli è in genere acido, con valori compresi tra 3,5 e 5,5, a causa della presenza di acidi organici. L'acido maggiormente rappresentato è l'acido gluconico, derivato dalla ossidazione del glucosio per azione della gluco-ossidasi.

L'acidità del miele contribuisce, insieme all'elevata pressione osmotica dovuta all'altissima concentrazione zuccherina, ad assicurarne la stabilità microbica (Cabras & Martelli, 2015).

Nella classe degli acidi organici vi sono gli acidi fenolici, composti di interesse per la loro struttura fenolica e polifenolica, oggetto di questa tesi e le cui caratteristiche e proprietà verranno discusse nel paragrafo 4.

Gli acidi fenolici, insieme ai flavonoidi, rientrano nella categoria dei composti fenolici, trasferiti dalle piante al miele. Possono essere derivati dell'acido benzoico o cinnamico.

I derivati dell'acido benzoico sono detti acidi idrossibenzoici, e comprendono ad esempio l'acido gallico, salicilico e vanillico.

I derivati dell'acido cinnamico, invece, sono detti acidi idrossicinnamici, tra i quali troviamo l'acido p-cumarico, ferulico, sinapico e caffeico (Kumar & Goel, 2019).

3.4. SOSTANZE AZOTATE

Le sostanze azotate sono costituite da amminoacidi liberi e da proteine che derivano dal nettare, o dalla melata, o che in parte sono associate ai granuli di polline.

Sono, quindi, sostanze in qualche misura associabili all'origine botanica dei mieli anche se alcuni amminoacidi e proteine derivano dalle secrezioni delle api.

Tra le sostanze azotate vanno inclusi gli enzimi, che, pur essendo presenti in limitate concentrazioni, svolgono tuttavia ruoli di estrema importanza essendo la loro azione alla base delle numerose trasformazioni che portano da nettare o melata a miele. Gli enzimi, inoltre, essendo soggetti a inattivazione nel tempo, vengono utilizzati per valutare la freschezza del prodotto, misurandone l'attività che viene attenuata oltre che dal tempo, da eventuali trattamenti termici (Cabras & Martelli, 2015).

3.5. ELEMENTI

La concentrazione delle sostanze inorganiche del miele può oscillare da 0,02 a 1% circa, in relazione all'origine botanica dello stesso; il potassio costituisce in genere il 75% di questa frazione, accompagnato da zolfo, fosforo, calcio, magnesio, silicio, ferro, rame e manganese. In genere i mieli di colore più chiaro sono più poveri di componenti inorganiche (Cabras & Martelli, 2015).

4. FLAVONOIDI

I composti fenolici sono metaboliti secondari delle piante e la loro presenza nel miele dipende principalmente dall'origine botanica e geografica.

Quando le api raccolgono il nettare o la melata dalle piante questi componenti bioattivi vengono trasferiti nel miele e negli altri prodotti dell'apicoltura. Tra questi composti naturali gli acidi fenolici e i flavonoidi sono le due classi più importanti. (Koulis et al., 2021)

I flavonoidi svolgono numerose funzioni biologiche nelle piante, negli animali e nei batteri. Nelle piante sono responsabili del colore e dell'aroma dei fiori che attraggono gli impollinatori. I flavonoidi proteggono le piante da diversi stress biotici e abiotici, agiscono come filtri UV, si comportano come molecole segnale, composti allopatici, fitoalessine, agenti detossificanti e antimicrobici. Hanno un'attività nella resistenza al gelo e alla siccità, possono svolgere un ruolo funzionale nell'acclimatamento delle piante al calore e nella tolleranza al congelamento (Panche et al., 2016; Pandey & Rizvi, 2009).

Chimicamente, i flavonoidi hanno una struttura a 15 atomi di carbonio che consiste di due anelli fenilici (A e B) ed un anello eterociclico contenente un ossigeno (C) (J. Alvarez-Suarez et al., 2013)

Possono essere suddivisi in diverse sottoclassi a seconda del carbonio dell'anello C a cui è legato l'anello B e in base al grado di insaturazione dell'anello C (Figura 1).

I flavonoidi in cui l'anello B è legato in posizione 3 all'anello C sono detti isoflavoni, i quali fanno parte della categoria dei fitoestrogeni. Se l'anello B, invece, è legato in posizione 4 si parla di neoflavoni, mentre quelli in cui l'anello B è legato in posizione 2 vengono suddivisi a loro volta in sottogruppi a seconda delle caratteristiche strutturali dell'anello C.

Questi sottogruppi sono: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli o catechine, antocianine e calconi (Panche et al., 2016).

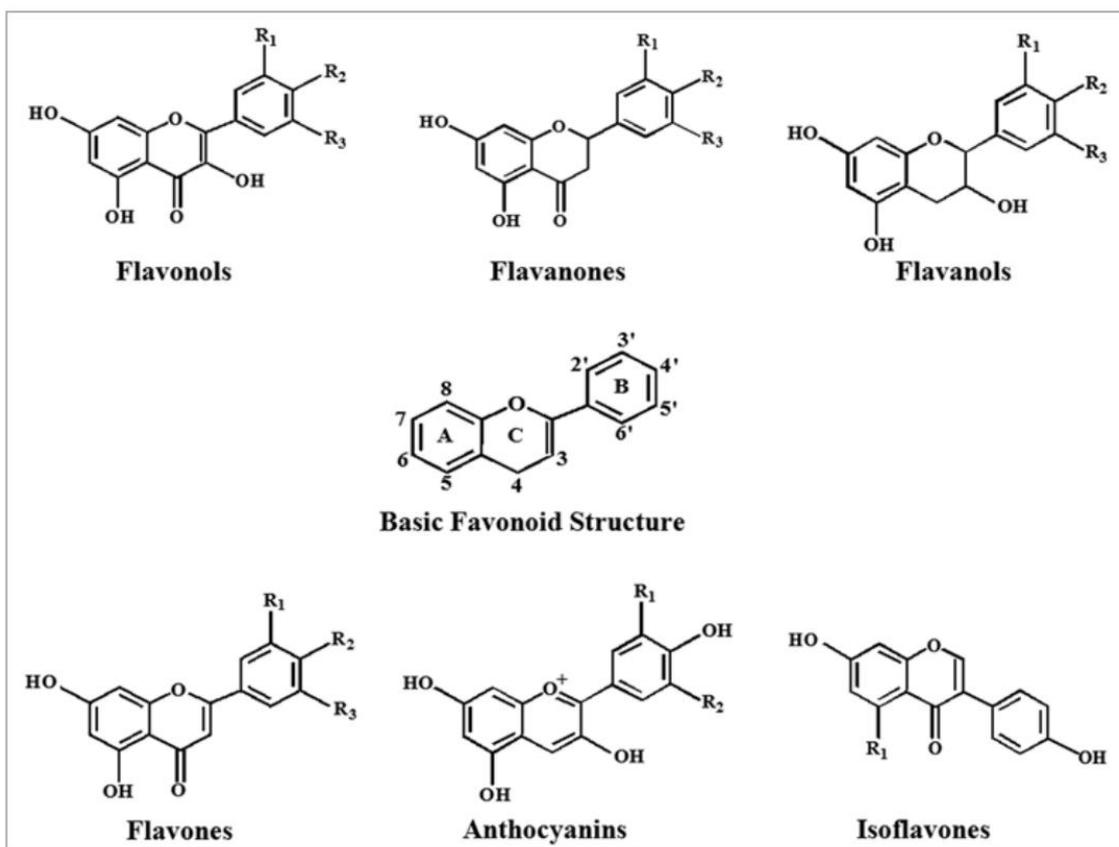


Figura 1: Struttura base di un flavonoide e sottogruppi (Pandey & Rizvi, 2009)

4.1. ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

Quasi tutti i gruppi di flavonoidi hanno la capacità di agire come antiossidanti, in particolare i flavoni e le catechine sembrano essere i flavonoidi più potenti nella protezione del corpo contro le specie reattive dell'ossigeno.

Le cellule e i tessuti sono continuamente esposti ai radicali liberi, prodotti durante il normale metabolismo dell'ossigeno o indotti da danni esogeni.

Uno dei processi più importanti, mediante cui i radicali liberi interferiscono con le funzioni cellulari, è la perossidazione lipidica che provoca danni alla membrana cellulare modificando la pressione osmotica, portando al gonfiore e infine alla morte cellulare.

Per proteggersi dalle specie reattive dell'ossigeno, gli organismi viventi hanno sviluppato diversi meccanismi efficaci, come gli enzimi superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi, ma anche componenti non enzimatiche come il glutatione e l'acido ascorbico.

L'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno provoca il consumo e l'esaurimento di questi composti endogeni. L'attività importante dei flavonoidi si inserisce in questa fase attraverso il cosiddetto scavenging diretto dei radicali liberi.

Mediante questo processo i radicali liberi ossidano i flavonoidi, grazie all'elevata reattività del loro gruppo ossidrilico, ottenendo quindi l'inattivazione dei radicali e la protezione delle membrane cellulari (Panche et al., 2016).

4.2. ATTIVITA' ANTINFIAMMATORIA

COX è un enzima endogeno che catalizza la conversione dell'acido arachidonico in prostaglandine e trombossani. L'enzima esiste in due isoforme, COX-1 e COX-2.

COX-1 è un enzima costitutivo ed è responsabile dell'apporto di prostaglandine che mantengono l'integrità della mucosa gastrica e forniscono un'adeguata omeostasi vascolare.

COX-2, invece, è un enzima inducibile e si esprime solo dopo uno stimolo infiammatorio.

La funzione dell'enzima COX-2 è quella di sintetizzare le prostaglandine per l'induzione dell'infiammazione e del dolore.

Alcuni flavonoidi, in particolare flavonoli e flavoni, si legano con l'enzima COX-2 come inibitori preferenziali, questo legame è responsabile dell'attività antinfiammatoria dei flavonoidi (Panche et al., 2016).

4.3. ATTIVITA' ANTIMICROBICA

Molti flavonoidi si sono evoluti come composti bioattivi che interferiscono con gli acidi nucleici e le proteine, mostrando proprietà antimicrobiche e insetticide. Questi composti, quindi, sono di interesse per applicazioni in agricoltura o come additivi e conservanti nell'industria alimentare (Panche et al., 2016).

L'effetto antimicrobico dei flavonoidi sembra essere legato ad una perturbazione metabolica collegata ai canali ionici, punti particolarmente sensibili per l'inibizione, considerati target per i flavonoidi; essi sono inoltre in grado di inibire alcuni enzimi responsabili dell'idrolisi proteica, rendendo più difficoltosa la diffusione dell'infezione attraverso i tessuti (J. Alvarez-Suarez et al., 2013).

4.4.1. APIGENIN

Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) appartiene formalmente alla sottoclasse dei flavoni e la sua formula chimica è C₁₅H₁₀O₅.

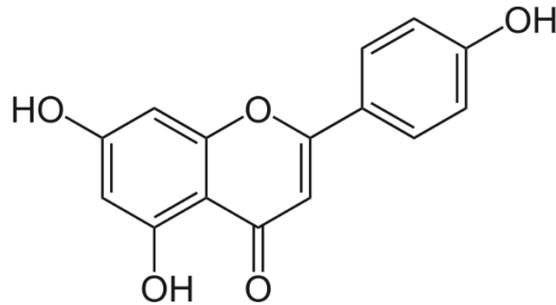


Figura 2: Struttura chimica di Apigenin
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Apigenin>)

Apigenin è presente principalmente in forma glicosilata in quantità significative nelle verdure (es. prezzemolo, sedano, cipolle), nella frutta (es. arance), nelle erbe aromatiche (es. camomilla, timo, origano, basilico) e nei prodotti a base vegetale (es. tè, vino, miele).

Le piante appartenenti alle *Asteraceae*, come quelle dei generi *Artemisia*, *Achillea*, *Matricaria* e *Tanacetum*, sono le principali fonti di questo composto. Tuttavia, specie appartenenti ad altre famiglie come le *Lamiaceae*, ad esempio *Sideritis* e *Teucrium*, o specie delle *Fabaceae*, come *Genista*, hanno mostrato la presenza di apigenin come aglicone e altri suoi derivati. Un aglicone è la parte non zuccherina di una molecola di glicoside e generalmente è costituito da un fenolo.

I flavonoidi, in generale, sono ampiamente conosciuti per le loro proprietà antiossidanti e un gran numero di report in letteratura ha evidenziato le proprietà antiossidanti di apigenin.

Inoltre, sono stati riportati effetti anti-iperglicemici e antinfiammatori.

Una recente review ha riassunto molti dei suoi effetti biologici, come attività citostatiche e citotossiche verso varie cellule tumorali, effetti anti-aterogeni e protettivi nell'ipertensione, (Kashyap et al., 2018).

Apigenin è uno dei composti fenolici più studiati, con innumerevoli caratteristiche nutrizionali e organolettiche. (Salehi et al., 2019)

4.4.2. NARINGENIN

Naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) appartiene alla sottoclasse dei flavanoni e la sua formula chimica è $C_{15}H_{12}O_5$.

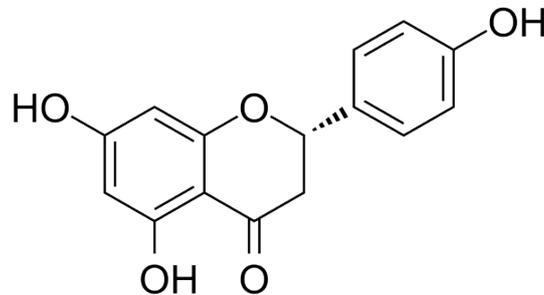


Figura 3: Struttura chimica di Naringenin
(<https://www.medchemexpress.com/Naringenin.html>)

Naringenin è uno dei più importanti flavonoidi presenti in natura; prevalentemente si trova in alcuni frutti, come quelli del genere *Citrus*, nei pomodori e nei fichi (*Ficus carica*).

Prove crescenti da studi su animali sia in vitro che in vivo hanno confermato vari effetti farmacologici che vedono naringenin come agente epatoprotettivo, anti-aterogeno, antinfiammatorio (Pinho-Ribeiro et al., 2016), anti-mutageno, antitumorale (Ke et al., 2017), antimicrobico (Karim et al., 2018).

Naringenin è dotato di ampi effetti biologici sulla salute umana, che includono una diminuzione dei biomarcatori della perossidazione lipidica e della carbonilazione proteica, promuove il metabolismo dei carboidrati, aumenta le difese antiossidanti, elimina le specie reattive dell'ossigeno, modula l'attività del sistema immunitario ed esercita anche effetti antiaterogenici e antinfiammatori (Wang et al., 2015).

Inoltre, sono stati segnalati effetti antivirali, mostra un effetto inibitorio dose-dipendente contro il virus della dengue (Frabasile et al., 2017), previene la replicazione intracellulare del virus chikungunya (Ahmadi et al., 2016) e inibisce l'assemblaggio e produzione a lungo termine di particelle di virus dell'epatite C infettiva in maniera dose-dipendente (Wang et al., 2015).

4.4.3. KAEMPFEROL

Kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) appartiene alla sottoclasse dei flavonoli e la sua formula chimica è $C_{15}H_{10}O_6$.

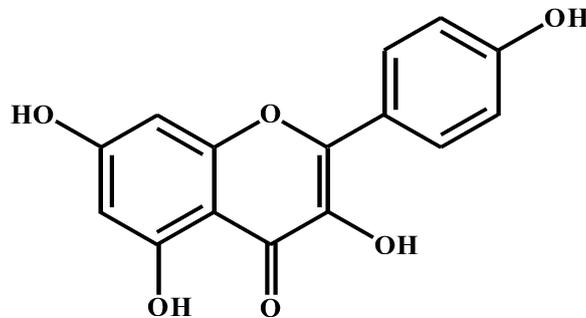


Figura 4: Struttura chimica di Kaempferol
(Lee et al., 2014)

Nelle piante, kaempferol è presente principalmente nella forma glicosidica, ossia è legato a diversi zuccheri quali rutosio, ramnosio, glucosio e galattosio (es. Kaempferol-3-O-glucoside).

Il kaempferol è ampiamente distribuito in diversi generi vegetali come *Delphinium*, *Camellia*, *Berberis*, *Citrus*, *Brassica*, *Allium*, *Malus*, ecc.

È stato anche identificato in diverse piante medicinali come *Acacia nilotica*, *Aloe vera*, *Crocus sativus*, *Euphorbia pekinensis*, *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum*, *Phyllanthus emblica*, *Ribes nigrum* e *Rosmarinus officinalis* (Devi et al., 2015).

Erben-Russ et al. hanno riportato l'attività di scavenging radicale del kaempferol (Erben-Russ et al., 1987).

È noto, inoltre, per essere uno dei più importanti e attivi composti antinfiammatori naturali (Devi et al., 2015).

4.4.4. RUTIN

Rutin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone 3-rhamnoglucoside) appartiene alla sottoclasse dei flavonoli e la sua formula chimica è $C_{27}H_{30}O_{16}$.

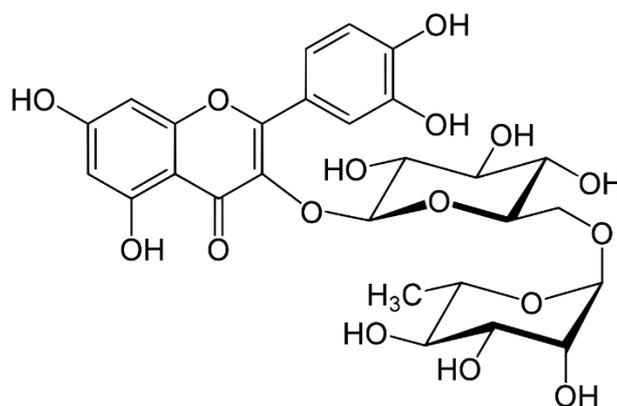


Figura 5: Struttura chimica di Rutin
 (<https://en.wikipedia.org/wiki/Rutin>)

Rutin, chiamato anche rutoside, quercetin-3-rutinoside o sophorin, è chimicamente un glicoside composto dal disaccaride rutinosio legato all'aglicone quercetin.

Il nome “rutin” deriva dalla pianta *Ruta graveolens*, che contiene questo flavonoide ma è presente in molte famiglie vegetali.

Rutin ha dimostrato diverse attività farmacologiche, tra cui attività antiossidante, citoprotettiva, vasoprotettiva, anticarcinogenica, neuroprotettiva e cardioprotettiva.

Negli animali trattati con rutin è stato osservato un significativo decremento dell'artrite reumatoide, per inibizione della sovrapproduzione di radicali di ossigeno (Ostrakhovitch & Afanas'ev, 2001).

Rutin è ampiamente studiato per l'attività antimicrobica contro vari ceppi di batteri. Ha dimostrato un'importante inibizione della crescita del batterio *Escherichia coli* (Araruna et al., 2012), in quanto agisce sulla DNA isomerasi IV inibendola (Bernard et al., 1997).

Nello studio riportato in Pimentel et al., il quantitativo di rutin rilevato nel miele, ha mostrato effetti inibitori nella crescita di *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* e *Klebsiella sp.* (Pimentel et al., 2013). È stata anche documentata l'attività antimicrobica contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (Dubey et al., 2013; Ganeshpurkar & Saluja, 2017).

4.4.5. QUERCETIN

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) appartiene alla sottoclasse dei flavonoli e la sua formula chimica è $C_{15}H_{10}O_7$.

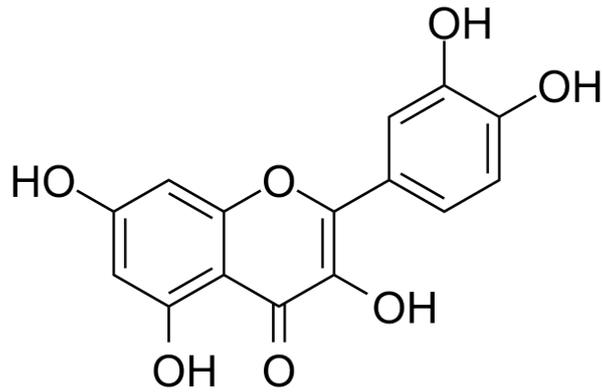


Figura 6: Struttura chimica di Quercetin
 (<https://www.medchemexpress.com/Quercetin.html>)

Il nome “quercetin” deriva da quercetum (bosco di querce), dal genere *Quercus*.

Si trova in una grande varietà di piante, tra cui mele, bacche, verdure del genere *Brassica*, capperi, uva, cipolle, pomodori, oltre a molti semi, noci, fiori, cortecce e foglie. Quercetin si trova anche in alcune piante utilizzate a scopo medico, tra cui *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* e *Sambucus canadensis*.

Tra le proprietà di quercetin sono note le attività anticancerogene, antinfiammatorie, antivirali, antiossidanti e psicostimolanti (Aguirre et al., 2011).

Quercetin sembra essere il flavonoide più potente nella protezione del corpo contro le specie reattive dell’ossigeno, mediante lo scavenging diretto dei radicali liberi. Chela anche gli ioni dei metalli di transizione, come il ferro, che possono avviare la formazione di radicali liberi dell’ossigeno (Afanas’ev et al., 1989; Ferrali et al., 1997).

Inoltre, inibisce gli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi che catalizzano la conversione dell’acido arachidonico nei suoi metaboliti (E & G., 1985). Ridurre i livelli di questi metaboliti così come i livelli di istamina, è benefico per mantenere il normale livello di comfort dei tessuti e delle strutture corporee (Lakhanpal & Rai, 2007).

5. L'ISOLA DI SANT'ERASMO E I SUOI MIELI

I mieli considerati in questa tesi provengono dall'azienda apistica "Miele del Doge" situata nell'Isola di Sant'Erasmo, soprannominata da secoli l'Orto di Venezia.

L'Isola di Sant'Erasmo si trova nella laguna veneta settentrionale e, dopo Venezia, è la seconda isola per estensione. Rappresenta da sempre un punto di grandissima importanza sia storica che economica per Venezia, in quanto già nel XV secolo il Doge Tommaso Mocenigo riforniva la sua tavola con frutta, verdura, miele e vino prodotti a Sant'Erasmo. La fornitura di queste primizie ai Dogi e alla nobiltà veneziana continuò per tutta la durata della Repubblica Serenissima e ancor oggi Sant'Erasmo costituisce un'importantissima fonte di approvvigionamento orto-frutticolo per i veneziani. Il nome dell'azienda rievoca e vuole riproporre queste antiche tradizioni, proponendo un miele non solo unico per le condizioni geografiche e climatiche in cui viene prodotto ma anche ricco di storia. Proprio per la caratteristica dell'Isola di avere diverse coltivazioni di nicchia, come le colture di carciofo, e di essere immersa in un ambiente con fioriture stagionali tipiche ed esclusive della laguna, come la fioritura del *Limonium vulgare* e della *Salicornia*, questo miele è un prodotto unico.

Un'altra caratteristica importante di questo miele è la gestione degli apiari, in quanto le api non vengono nutrite con soluzioni zuccherine o candito, come si usa fare oggi per sfruttare tutto il miele possibile, ma si nutrono del loro stesso miele e questo, oltre a rendere le api più forti e in grado di resistere meglio alle difficoltà climatiche invernali e alle malattie garantisce un allevamento delle api sostenibile e che segue il loro ciclo di vita naturale.

Inoltre, non vengono utilizzati prodotti chimici di sintesi o farmaci, bensì tecniche d'avanguardia nel campo della conduzione biologica. La produzione di questo miele si basa sulla qualità a discapito della quantità per mantenere saldi i principi di rispetto della natura e delle sue leggi e garantire al consumatore l'unicità e la qualità del prodotto.

In questo lavoro sono state analizzate 4 tipologie di miele, con l'obiettivo di identificare dei composti di interesse nutraceutico di origine vegetale che riconducono alla flora dell'isola e della laguna. In particolare, i campioni analizzati sono: miele di barena, miele di acacia, miele millefiori primaverile e miele millefiori autunnale.

In figura 7 è rappresentata una mappa dell'Isola di Sant'Erasmo, in cui è indicata la posizione degli apiari. Una parte delle arnie è situata nei pressi della fermata del vaporetto "Sant'Erasmo Chiesa" in un frutteto, l'altra parte si trova nei pressi della fermata del vaporetto "Sant'Erasmo Punta Vela" a ridosso della laguna, quindi più vicina alle barene, per la produzione del miele di barena.



Figura 7: Mappa dell'Isola di Sant'Erasmus e posizione degli apiari (www.googleearth.com)

6. L'APPROCCIO METABOLOMICO

La metabolomica è lo studio sistematico di tutte le molecole organiche presenti in un certo sistema biologico: i metaboliti. Essi sono infatti il risultato dei processi cellulari in atto in un organismo e possono quindi essere considerati come delle impronte digitali in grado di caratterizzare un certo sistema. La metabolomica offre un nuovo modo di studiare problemi molecolari complessi, attraverso conoscenze interdisciplinari, e risulta particolarmente applicabile per lo studio dei prodotti naturali (Trenerry & Rochfort, 2010).

La metabolomica è stata impiegata con successo in diversi ambiti di ricerca, dal controllo di qualità di prodotti alimentari, alla caratterizzazione strutturale di nuove molecole, all'identificazione di molecole bioattive di interesse farmaceutico, allo studio delle interazioni tra i diversi livelli funzionali di un organismo biologico (genomico, trascrizionale, metabolico) (Moco et al., 2007).

Le analisi metabolomiche vengono classificate come "targeted" e "untargeted".

L'approccio "targeted", più classicamente utilizzato, può essere definito come hypothesis-driven, si basa cioè su una conoscenza a priori del sistema in oggetto e sulla formulazione di un'ipotesi che viene verificata attraverso strumenti analitici. Ad esempio, viene preso in considerazione uno specifico gruppo di metaboliti scelti preventivamente, dei quali si conosce la presenza nel sistema oggetto di studio, i quali vengono opportunamente identificati e quantificati. Questo approccio è utile per valutare la presenza e la quantità di uno specifico gruppo di composti, la cui importanza è nota, nei campioni. Dal punto di vista analitico quindi, è necessario sviluppare e validare una procedura specifica che permetta di estrarre selettivamente gli analiti di interesse e quantificarli in maniera accurata (Shyur & Yang, 2008).

L'approccio metabolomico "untargeted", invece, può essere definito come question-driven, ovvero si basa su un problema scientifico al quale si risponde attraverso strumenti analitici, senza formulare ipotesi pre-confezionate (Thissen et al., 2011). Ad esempio, l'analisi si concentra sulla caratterizzazione della matrice oggetto di studio, attraverso la misurazione e l'identificazione di quante più molecole possibile, al fine di fornire una descrizione esaustiva del sistema. Questo tipo di approccio non si basa sulla quantificazione delle molecole ma sul confronto tra le intensità relative dei segnali analitici ottenuti nei diversi campioni. Dal punto di vista analitico, in questo caso, è necessario applicare metodiche che massimizzino l'estrazione e la determinazione del maggior numero possibile di molecole; inoltre, è importante mantenere la confrontabilità tra i campioni, massimizzando la precisione. È necessario quindi semplificare la metodica analitica al fine di non introdurre passaggi che possano essere fonte di eventuali errori casuali (Fiehn, 2002; Moco et al., 2007).

Gli approcci targeted e untargeted sono complementari e la scelta della strategia da utilizzare dipende dall'obiettivo dello studio e dal tipo di informazione necessaria. La metabolomica untargeted, tuttavia, permette di ottenere un maggior numero di informazioni rispetto al classico approccio targeted, riuscendo a descrivere in maniera più completa la matrice studiata senza necessitare di informazioni pregresse (De Vos et al., 2007). In molti casi risulta pertanto vantaggiosa, soprattutto nel campo della nutraceutica, permettendo di identificare metaboliti non precedentemente riportati.

MATERIALI E METODI

7. APPROCCIO METABOLOMICO: ASPETTI RILEVANTI PER LA PROCEDURA ANALITICA

Vista la varietà delle matrici esistenti, di strumenti analitici che è possibile utilizzare e la numerosità delle tecniche preparative dei campioni che è possibile impiegare, non esiste a tutt'oggi un metodo univoco di analisi metabolomica, valido per ogni matrice; è stato però necessario negli anni elaborare un protocollo analitico standardizzato per l'analisi metabolomica, che tenesse conto delle varie applicazioni di questa disciplina. La nascita del gruppo "Chemical Analysis Working Group" (CAWG), come parte della metabolomic standard initiative (MSI), permise la stesura di dati standard minimi riguardanti gli aspetti chimici di un'analisi metabolomica tra cui la preparazione del campione, l'analisi sperimentale, il controllo qualità, l'identificazione dei metaboliti e l'elaborazione dei dati in modo tale da garantire la riproducibilità delle analisi e confrontabilità del dato ottenuto (Sumner et al., 2007). Sulla base di prove sperimentali e presupposti teorici, il CAWG ha proposto le condizioni operative ritenute migliori per l'analisi metabolomica "untargeted" di campioni biologici (De Vos et al., 2007). In esso vengono descritti tutti gli aspetti più importanti da considerare per il corretto sviluppo di un'analisi metabolomica (Sumner et al., 2007).

Le tecniche analitiche più utilizzate in metabolomica sono la spettrometria di massa e la risonanza magnetica nucleare (NMR), che permettono di effettuare misure ad elevata risoluzione, identificando spesso in maniera univoca le molecole, a partire da spettri di frammentazione di massa e in relazione alle sue caratteristiche strutturali. Ad oggi si utilizzano tecniche via via sempre più sofisticate come la separazione cromatografica con uno strumento UHPLC, accoppiato ad uno spettrometro ad alta risoluzione e accuratezza, l'uso di tecniche accoppiate MS-NMR o ancora lo sviluppo di sistemi automatizzati per l'analisi dei dati con il supporto di banche dati sempre

aggiornate (Moco et al., 2007). La cromatografia permette di definire proprietà come la polarità e l'idrofobicità delle molecole sulla base del tempo di ritenzione che ne indica le caratteristiche (Moco et al., 2007). La spettrometria di massa, invece, per l'identificazione e la caratterizzazione dei metaboliti, sfrutta la misura accurata del rapporto massa/carica degli ioni molecolari e dei frammenti, la determinazione dell'abbondanza isotopica relativa degli ioni e infine la frammentazione di alcuni ioni genitori (Dunn et al., 2013).

Dopo la fase di analisi si procede con l'elaborazione dei dati e la quantificazione (es. mediante integrazione del picco) e/o identificazione dei metaboliti.

L'identificazione dei metaboliti richiede un approfondimento poiché è uno step fondamentale dell'analisi metabolomica e spesso è la parte che richiede il maggior impegno in termini di tempo.

Sumner et al., 2007 propongono una definizione dell'identificazione dei metaboliti a 4 livelli:

1. Composti identificati: il livello 1 può essere assegnato a composti di cui si hanno almeno due dati indipendenti e ortogonali relativi a composti noti, ad esempio standard di riferimento aggiunti e analizzati nelle stesse condizioni sperimentali del campione. I dati possono essere il tempo di ritenzione, la massa esatta, lo spettro di massa, ecc.
2. Composti ipotetici: senza standard di riferimento, sulla base delle proprietà fisico-chimiche (come frammenti e massa) di una classe chimica di composti o per similarità spettrale con librerie spettrali pubbliche
3. Classi di composti caratterizzate ipoteticamente: sulla base delle proprietà chimico-fisiche caratteristiche di una classe chimica di composti o mediante similarità spettrale di composti noti di una classe
4. Composti sconosciuti: sebbene non identificati o non classificati questi metaboliti possono essere differenziati e quantificati sulla base dei dati spettrali

(Sumner et al., 2007)

8. MATERIALI USATI

Solventi e reagenti: Metanolo UPS (VWR, Avantor Performance Materials, Poland), acetonitrile UPS (VWR, Avantor Performance Materials, Poland), acido formico (98-100% LiChropur, Merck, Germany), acqua ultrapura (18 M Ω cm, 0.01 TOC) prodotta mediante un sistema PurelabUltra (Elga, HighWycombe, UK). Detergente per vetreria Contrad® 2000 conc. (VWR International s.r.l. Milano, Italia).

Standard di riferimento: Apigenin, Naringenin, Kaempferol, Quercetin e Rutin, (primary reference standard, certified absolute purity, phyproof, PhytoLab GmbH & Co. KG, Germany).

Materiale da laboratorio: Cartucce per estrazione in fase solida (SPE): Strata X (6 mL, 33 μm Phenomenex, California USA), Oasis HLB (6 mL, 30 μm , Waters Corporation, Massachusetts USA,) e Sep-Pak C18 (3 mL, 55-105 μm , Waters Corporation, Massachusetts USA,). Micropipette da 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 μL , con puntali sterili in polietilene (Eppendorf AG, Hamburg, Germania), filtri a siringa Phenex™-PTFE 25mm Syringe Filters 0.2 μ , Non-Sterile, Luer/Slip (Phenomenex, California, USA), siringhe monouso in polipropilene, senza ago, (5 mL, Merck, Germany), Vial in vetro da 2 mL, per autocampionatore (Agilent, Waldbronn, Germania), Vial ambrate in vetro da 15 mL da stoccaggio (Supelco, Bellefonte, USA), Eppendorf Safe-Lock Tubes, vial da 2,0 mL in polipropilene (Eppendorf Quality™. Germany).

Strumentazione: Bagno ultrasuoni (Elmasonic S30, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany); bilancia analitica a 5 cifre KERN ALT 220-4NM (KERN & Sohn GmbH, Belling, Germania), SPE Vacuum Manifold Systems (Fisher Scientific, Waltham Massachusetts), Turbovap® II (Caliper Lifescience, Symark, Patterson, California, USA).

Colonna cromatografica: SB-Aq Narrow Bore RR 2.1 x 150 mm, 3.5 μm (Agilent Technologies, Wilmington, USA).

8.1. SOLUZIONI STANDARD

Sono stati pesati 10 mg di ciascuno standard solido direttamente in matracci da 10 mL e la soluzione è stata portata a volume con acqua ultrapura. Per apigenin è stato utilizzato un matraccio da 25 mL ed è stato disciolto in una miscela di metanolo, acetonitrile, acido formico e isopropanolo perché la soluzione a concentrazione più alta risultava torbida a causa della difficoltà nella dissoluzione. Sono quindi state ottenute delle soluzioni a concentrazione di circa 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ per naringenin, kaempferol, quercetin e rutin mentre per apigenin è stata ottenuta una soluzione a concentrazione di circa 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Queste soluzioni, dette soluzioni MADRE, sono state diluite a 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ prelevando 20 μL (50 μL per Apigenin) e portando a volume in un matraccio da 10 mL con acqua. Quercetin, Kaempferol e Rutin vengono aggiunti nella stessa vial (indicati come mix 1 in tabella 1), mentre Apigenin e Naringenin vengono messi insieme in una vial diversa (indicati come mix 2 in tabella 1): si ottengono quindi due vial contenenti un mix dei flavonoidi standard a una concentrazione di circa 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$. I livelli di concentrazione dei flavonoidi sono stati scelti sulla base dei livelli di concentrazione riscontrati in letteratura (Michalkiewicz et al., 2008; Pascual-Maté et

al., 2018; Zhou et al., 2014), al fine di ottenere una concentrazione finale dei campioni sintetici paragonabile alle concentrazioni reali.

Tabella 1: mg pesati e concentrazioni delle soluzioni madre e mix utilizzate per lo sviluppo del metodo

Analita	mg pesati	Soluzione madre ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Soluzione Mix 1 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	Soluzione Mix 2 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
Quercetin	10.3	1.03	2.06	
Kaempferol	10.3	1.03	2.06	
Rutin	9.9	0.99	1.98	
Apigenin	10.1	0.404		2.02
Naringenin	10.1	1.01		2.02

8.2. ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA

L' estrazione in fase solida è una tecnologia di preparazione del campione che viene abitualmente utilizzata nei laboratori analitici per eseguire l'estrazione di analiti da una matrice complessa.

Questo processo consente l'estrazione, la purificazione e la concentrazione degli analiti prima della loro quantificazione e/o identificazione. Il principio di base della SPE è la ripartizione dei composti tra una fase solida e una fase liquida, dove si deve avere che gli analiti hanno una maggiore affinità per la fase solida rispetto alla matrice del campione

(<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat106202-oasis-hlb-6-cc-vac-cartridge-200-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-.html>).

Per lo sviluppo del metodo di estrazione in fase solida sono stati impiegati tre tipi di colonne, facendo riferimento all'articolo "Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, separation and quantification procedures" (Pascual-Maté et al., 2018): Strata X (Phenomenex, California USA, 6 mL, 33 μm) Oasis HLB (Waters Corporation, Massachusetts USA, 6 mL, 30 μm) e C18 (Waters Corporation, Massachusetts USA, 3 mL, 55-105 μm).

Le caratteristiche principali che distinguono queste colonne riguardano la capacità di estrarre efficacemente e selettivamente i composti d'interesse, trattenendoli sulla base della loro polarità,

mentre non vengono trattenuti i componenti della componente zuccherina che costituisce un problema durante la fase analitica.

Le colonne sono a fase inversa, quindi hanno una fase stazionaria apolare che viene eluita con una fase mobile polare, quindi, i composti polari escono più rapidamente perché non vengono trattenuti dalla fase stazionaria e presentano una elevata solubilità nel solvente polare, mentre le molecole non polari vengono rallentate nel loro percorso attraverso la colonna, per maggiore affinità con la fase stazionaria.

Questo consente di eliminare la maggior parte degli zuccheri, composti polari idrosolubili che vengono eluiti mediante lavaggio con acqua acidificata (AF 1%), i composti che costituiscono i nostri analiti vengono successivamente eluiti con metanolo, infatti, essendo meno solubili in acqua restano adsorbiti alla fase stazionaria durante la fase di eluizione degli zuccheri.

La colonna **C18** presenta una fase stazionaria a base di silice, modificata attaccando lunghe catene di idrocarburi (8-18 atomi di carbonio) per renderla non polare, conferendo forte idrofobicità alla fase sorbente. Il meccanismo di ritenzione delle colonne C18 si basa su forze di Van der Waals, legami idrogeno o interazioni dipolo-dipolo. Viene utilizzata per adsorbire anche analiti di bassa idrofobicità da soluzioni acquose. Questa fase sorbente offre una selettività unica, un eccellente recupero degli analiti ed è consigliata come fase SPE generica per analiti polari e non polari, la migliore efficienza di estrazione, però, è ottenuta per composti non polari e idrofobici, come glicosidi flavonoidici (Pascual-Maté et al., 2018).

Strata X e **HLB** sono sorbenti polimerici, caratterizzati da una maggiore resistenza al pH e una maggiore superficie specifica rispetto alle C18.

Per analiti contenenti anelli aromatici, il meccanismo di ritenzione si basa su interazioni π - π (Pascual-Maté et al., 2018).

La fase stazionaria della colonna **Strata X** è costituita dal copolimero stirene-divinilbenzene, che fornisce una forte ritenzione di composti neutri, acidi o basici in condizioni di lavaggio con solventi organici aggressivi (<https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X%2C%20Polymeric%20Reversed%20Phase?returnURL=/Products/Search/SPE>).

Queste caratteristiche consentono l'estrazione di composti sia polari che non polari (Phenomenex, 2017).

La cartuccia **HLB** è caratterizzata dal copolimero N-vinilpirrolidone-divinilbenzene, sviluppato per l'estrazione di un'ampia gamma di composti acidi, basici e neutri da varie matrici utilizzando un protocollo semplice e generico (<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat106202-oasis-hlb-6-cc-vac-cartridge-200-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-.html>).

I due monomeri, che costituiscono la fase sorbente, conferiscono alla cartuccia HLB capacità di ritenzione lipofila e idrofila superiori; ciò determina un'estrazione più efficiente di alcuni analiti e metaboliti polari, come gli acidi fenolici (Pascual-Maté et al., 2018).

8.3. CAMPIONI DI MIELE

Per l'analisi sono state scelte 4 tipologie di miele: miele di acacia (MA), miele millefiori primaverile (MP), miele millefiori autunnale (MM) e miele di barena (MB). Questi mieli si differenziano per composizione florale e stagionalità, come riassunto in tabella 2.

Tabella 2: Tipologia mieli analizzati

Campioni	Tipo di miele	Periodo di raccolta
MA	Miele di acacia	Primaverile
MB	Miele di barena	Tardo estivo
MM	Miele millefiori "autunnale"	Tardo estivo/autunnale
MP	Miele millefiori "primaverile"	Primaverile

9. STRUMENTAZIONE (LC/MS)

L'analisi è stata effettuata con la tecnica LC/MS, in particolare lo strumento utilizzato è l'HPLC UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) accoppiato ad uno spettrometro di massa dotato di sorgente elettrospray ESI-LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific).

9.1. HPLC

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è una tecnica analitica avanzata che ha lo scopo di separare i componenti di una miscela.

In questa tecnologia una pompa forza un solvente attraverso una colonna ad alte pressioni fino a 400 atmosfere.

Il materiale di riempimento della colonna o la fase adsorbente o stazionaria è tipicamente un materiale granulare costituito da particelle solide come silice o polimeri.

Per ottenere una elevata efficienza della colonna cromatografica (elevata risoluzione), occorre che la fase stazionaria sia costituita da particelle di diametro molto piccolo, quindi che abbiano una superficie specifica molto elevata che aumenti le interazioni tra la fase stazionaria e le molecole. Il

flusso della fase mobile in queste colonne richiede di operare ad elevate pressioni e, quindi, pompe in grado di operare a pressioni fino a 400 Atm.

In questo modo si ottiene una separazione migliore dei componenti della miscela in tempi relativamente brevi.

Il liquido pressurizzato, ossia la fase mobile, è tipicamente una miscela di solventi come acqua, acetonitrile e/o metanolo.

La separazione dei componenti di una miscela avviene a causa dei loro diversi gradi di interazione con le particelle adsorbenti. Questo determina velocità di eluizione diverse per i diversi componenti, la fuoriuscita dei vari componenti dalla colonna cromatografica avverrà, quindi, in tempi diversi (tempo di ritenzione), se si opera in condizioni controllate, il tempo di ritenzione è caratteristico di ogni analita.

Rispetto alla cromatografia su colonna semplice, l'HPLC è una tecnica altamente automatizzata ed estremamente sensibile. Infatti, una quantità misurata di campione viene introdotta in colonna mediante un autocampionatore, insieme al flusso di solvente (Thermo Fisher Scientific, 2011).

In Figura 8 una rappresentazione schematica del sistema di cromatografia liquida ad alte prestazioni.

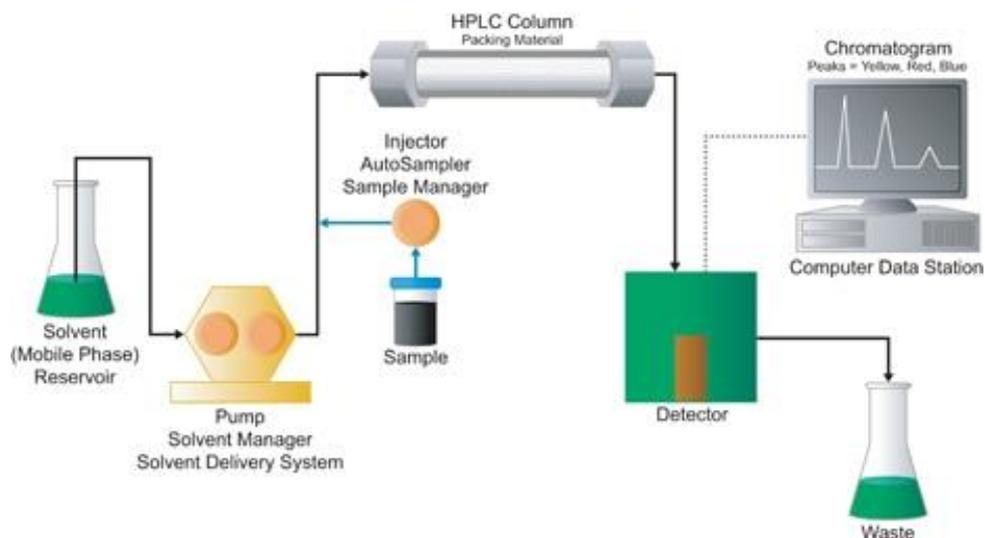


Figura 8: Schema a blocchi di un HPLC

(https://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055)

La colonna da HPLC può essere di due tipi:

a fase normale: la fase stazionaria è generalmente silice, la fase mobile è un solvente non polare (es. esano). I composti non polari escono più velocemente dalla colonna poiché i composti polari si legano più fortemente alla fase stazionaria polare.

a fase inversa: la fase stazionaria è sempre silice, la quale è stata modificata per renderla non polare, legando chimicamente alla sua superficie lunghe catene di idrocarburi (8-18 atomi di carbonio).

La fase mobile è un solvente polare (es. miscela di acqua e metanolo/acetonitrile) o molto spesso miscele che cambiano la composizione durante la corsa cromatografica (eluizione a gradiente) per ottenere la massima risoluzione cromatografica in tempi più brevi.

In questo tipo di colonna sono i composti polari ad uscire più rapidamente perché le molecole polari sono più affini alla fase mobile, il solvente polare. Le molecole non polari vengono rallentate nel loro percorso attraverso la colonna, poiché formano legami con le catene alifatiche della fase stazionaria, principalmente attraverso le forze di dispersione di van der Waals e le interazioni idrofobiche. Inoltre, sono anche meno solubili nella fase mobile e ciò facilita le loro interazioni con i gruppi idrocarburici.

9.2. SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente la separazione di ioni in una miscela complessa sulla base del diverso rapporto massa su carica (m/z).

Il campione, in fase liquida, viene nebulizzato e ionizzato nella sorgente dello strumento e le specie cariche risultanti vengono focalizzate e accelerate, attraverso una serie di lenti ioniche, per incrementare la loro energia cinetica.

Gli ioni vengono sottoposti, in uno spazio chiuso mantenuto sotto alto vuoto (analizzatore di massa), all'azione di un campo elettrico e/o magnetico che permette la separazione degli ioni secondo il loro rapporto m/z . Gli ioni separati giungono al rivelatore, dove colpiscono il sensore del detector generando una corrente di elettroni, proporzionale alla quantità di ioni e, quindi, di analita. L'emissione degli elettroni genera un segnale elettrico amplificato dal quale si produce lo spettro di massa.

Lo strumento utilizzato per l'analisi (ESI-LTQ Orbitrap XL linear ion trap MS) sfrutta, come modalità di ionizzazione del campione proveniente dall'HPLC, la ionizzazione elettro-spray (ESI). Gli ioni prodotti vengono focalizzati e trasferiti da una serie di lenti elettrostatiche in una trappola ionica (LTQ), ottimizzata per l'espulsione assiale degli ioni (grazie alla presenza di un ottapolo) nella trappola lineare curvata (C-Trap). Infine, gli ioni selezionati vengono convogliati

all'analizzatore di massa Orbitrap (Donna, 2012) . In Figura 9 sono rappresentate le diverse parti dello strumento.

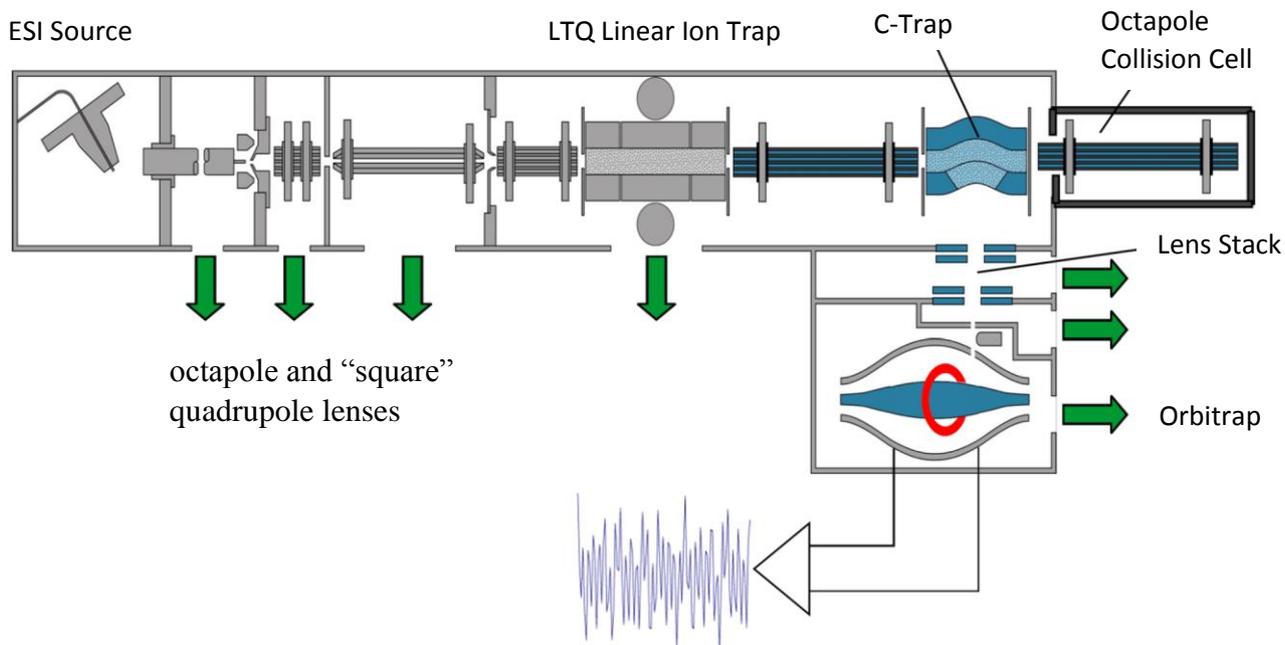


Figura 9: Schema della struttura dello strumento LTQ Orbitrap XL (Donna, 2012)

Vengono di seguito discusse in dettaglio le parti principali dello strumento utilizzato per l'analisi:

➤ **Sorgente di ionizzazione (ESI)**

La ionizzazione elettrospray consente di produrre delle goccioline molto piccole di solvente contenenti l'analita grazie ad un capillare di silice molto fine, la cui superficie è stata metallizzata e a cui è applicato un alto potenziale elettrico (positivo o negativo in base alla modalità selezionata). Il campo elettrico applicato conferisce alle goccioline una densità di carica elevata. Il solvente presente nelle goccioline viene fatto evaporare mediante un riscaldamento e/o collisioni energetiche con un gas secco.

Quando il solvente evapora, la densità di carica sulla superficie aumenta provocando un'esplosione coulombica che porta alla formazione di goccioline più piccole; ciò avviene quando la densità di carica superficiale supera il limite di Rayleigh, la tensione superficiale della goccia non è più in grado di sopportare la repulsione coulombiana generata tra le cariche.

Il processo si ripete fino a che non si ottengono ioni non frammentati, protonati o cationici dell'analita, come rappresentato in Figura 10. Nel caso in cui al capillare è applicata una tensione negativa, il processo è analogo ma gli ioni saranno carichi negativamente.

La tecnica ESI è un metodo soft di ionizzazione perché provoca una scarsa frammentazione del campione, per cui si ottiene uno spettro di massa formato dai picchi cromatografici di ioni molecolari protonati $[M + H]^+$, deprotonati $[M - H]^-$, o al massimo di qualche semplice addotto.

La ionizzazione ESI avviene a temperatura e pressione atmosferiche ed è adatta a molecole ad alto peso molecolare, composti ionici quali acidi o basi organiche, proteine.

La modalità di ionizzazione può essere sia positiva che negativa, a seconda degli analiti da analizzare: per ioni positivi si usa la polarità positiva, viceversa per ioni negativi si usa la polarità negativa. (Donna, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2011)

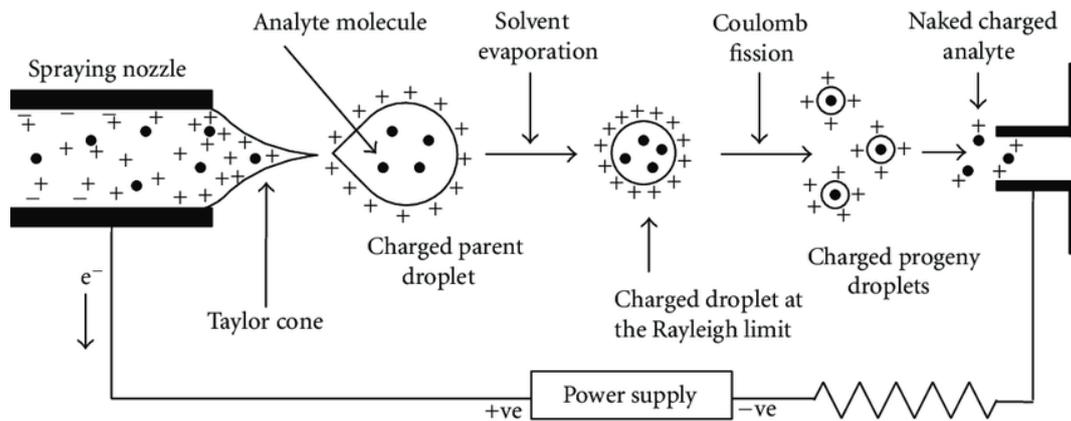


Figura 10: Rappresentazione schematica del processo di ionizzazione elettro-spray (https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process_fig31_225050758)

➤ Analizzatore di massa

L'analizzatore di massa utilizzato, come accennato poco sopra, è costituito da una trappola ionica lineare (LTQ) accoppiata con la tecnologia Orbitrap.

La trappola ionica è uno strumento in cui l'analizzatore è formato da una camera dotata di due calotte (elettrodi a calotta o end caps) e un anello centrale (elettrodo centrale toroidale o ad anello) a forma generalmente iperbolica e ai quali vengono applicati opportuni potenziali elettrici, ossia tensione a corrente continua (DC) o alternata a radiofrequenza (RF), del tutto simili a quelli utilizzati per i quadrupoli.

Le due calotte sono dotate di un foro centrale per consentire il passaggio degli ioni, i quali si trovano ad oscillare tra le due calotte e all'interno dell'anello rimanendo quindi per un certo periodo di tempo all'interno di questo spazio.

Aumentando la componente RF l'oscillazione aumenta fino a far uscire gli ioni attraverso il foro verso il detector. Applicando invece solo la componente DC si possono definire i limiti (inferiore e superiore) delle masse da analizzare.

La presenza dei due potenziali (RF e DC) provoca una serie di collisioni che portano alla frammentazione, fornendo informazioni sulla struttura delle molecole.

La trappola ionica lineare, detta anche trappola ionica quadrupolare bidimensionale, ha la funzione di intrappolare, isolare e frammentare gli ioni indirizzati dal sistema di lenti.

La trappola ionica divide gli ioni in base al rapporto m/z , ma costituisce anche il sistema di preparazione e iniezione degli ioni nell'analizzatore di massa finale, l'Orbitrap.

La sua capacità di manipolare, selezionare ed eccitare gli ioni, infatti, viene impiegata come preparazione degli ioni da analizzare. Grazie a questo accoppiamento gli ioni possono essere frammentati per esperimenti MS/MS o MS^n , tecnica nota come CID (Collision-Induced Dissociation). La trappola ionica lineare, infatti, è interessante in quanto consente di selezionare lo ione di interesse e frammentarlo, attraverso la collisione con l'elio contenuto al suo interno, ottenendo una serie di frammenti dello ione caratteristici. La presenza dell'elio all'interno della trappola ionica serve a rallentare gli ioni che hanno velocità maggiore e ad accelerare quelli con bassa velocità attraverso collisione, ottenendo così un insieme di ioni con pari energie cinetiche. Il dispositivo LTQ XL è costituito da 3 sezioni: una lente anteriore, la trappola ionica lineare e una lente posteriore. Le lenti anteriore e posteriore sono dei piatti metallici con un foro circolare centrale attraverso il quale passa il fascio di ioni.

L'espulsione degli ioni dalla trappola ionica avviene in direzione assiale, grazie alla presenza di un ottapolo che li indirizza alla C-Trap. La Curved Linear Trap è un quadrupolo, a cui è applicato un potenziale a radio-frequenza, in cui il movimento degli ioni è rallentato da un flusso di azoto che li fa arrestare nel mezzo della trappola. In essa si creano pacchetti di ioni che vengono accelerati, con un rapido incremento del campo elettrico applicato, e inviati, mediante un'apertura sull'elettrodo esterno, all'analizzatore di massa Orbitrap (Makarov & Scigelova, 2010).

La C-Trap consente diverse modalità di funzionamento:

- Un'iniezione di un numero fisso di ioni di un composto di riferimento noto, quindi può essere seguita dall'iniezione di ioni dell'analita. Entrambi i set di ioni vengono quindi rilevati simultaneamente nell'Orbitrap. Questa procedura consente una robusta calibrazione

interna di ogni spettro di massa, con errori quadratici medi nella misura della massa inferiori a 1 ppm (Olsen et al., 2010).

- Iniezioni multiple di ioni frammentati o selezionati in condizioni diverse possono essere immagazzinate insieme e acquisite in un unico spettro di massa Orbitrap.
- Gli ioni possono essere frammentati, iniettandoli nella C-trap a energie più elevate, per produrre schemi di frammentazione simili a quelli degli spettrometri di massa a quadrupolo a triplo stadio (Olsen et al., 2007).
- La C-trap ha una forma che consente di interfacciarla a dispositivi aggiuntivi, come celle di collisione, celle di reazione ioni/molecole o ETD (Electron Transfer Dissociation) (McAlister et al., 2008).

(Makarov & Scigelova, 2010)

L'Orbitrap è una trappola orbitale costituita da un elettrodo centrale a forma di fuso, circondato da una coppia di elettrodi esterni a campana. Impiega campi elettrici per catturare e confinare gli ioni. In figura 11 una rappresentazione di una traiettoria ionica stabile nell'Orbitrap.

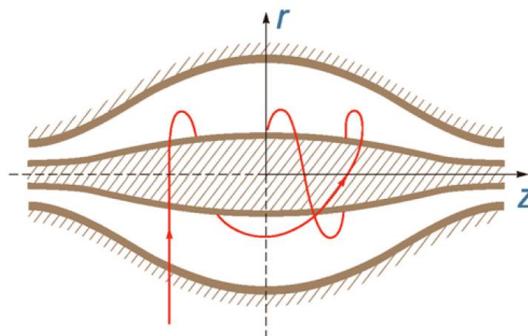


Figura 11: Immagine schematica di una cella Orbitrap ed esempio di una traiettoria ionica stabile (Donna, 2012)

Nell'Orbitrap, le traiettorie ioniche stabili ruotano attorno ad un elettrodo centrale assiale con oscillazioni armoniche. La frequenza ω di queste oscillazioni armoniche lungo l'asse z dipende solamente dal rapporto massa/carica ionica m/q e dal rapporto strumentale costante k , secondo la seguente equazione:

$$\omega = \sqrt{\frac{q}{m} \times k}$$

L'elettrodo esterno dell'Orbitrap rileva, per induzione, una corrente elettrica prodotta dall'oscillazione degli ioni, detta corrente immagine o transiente, che rappresenta la frequenza di oscillazione ionica nella dimensione assiale, unica e caratteristica per ogni rapporto m/z .

La corrente immagine costituita dal segnale in funzione del tempo viene elaborata mediante trasformata Fourier veloce (FFT), questo consente di ottenere il segnale funzione delle frequenze di oscillazione, le frequenze individuate consentono di calcolare i rapporti m/z degli ioni attraverso l'equazione riportata sopra, consentendo di ottenere lo spettro di massa (Figura 12). (Donna, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2011)

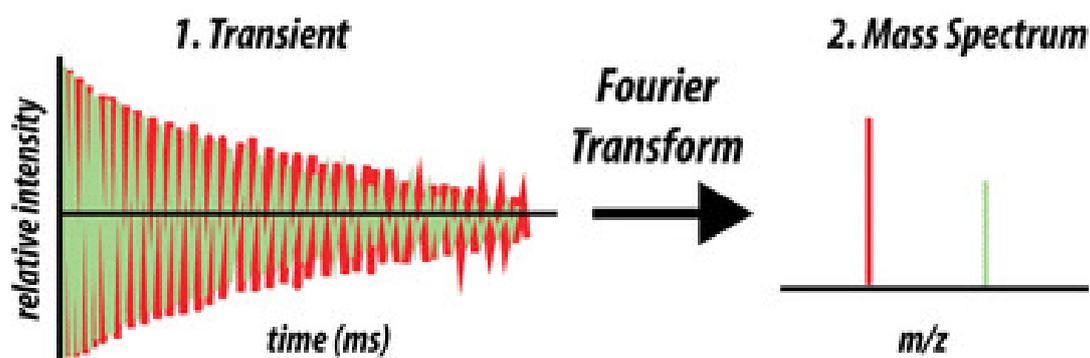


Figura 12: Conversione da corrente immagine a spettro di massa
(https://www.researchgate.net/figure/The-Orbitrap-FT-mass-analyzer-In-the-Orbitrap-ions-oscillate-around-a-central_fig9_306542804)

➤ Rivelatore di massa

Il rivelatore più comune è un moltiplicatore di elettroni.

Quando il raggio ionico esce dall'analizzatore di massa colpisce una piastra di conversione, che converte gli ioni in elettroni.

Gli ioni sono attratti verso la piastra da una forte tensione applicata alla piastra di conversione. Colpendo quest'ultima gli ioni stimolano l'espulsione di elettroni, che vengono accelerati dalla tensione applicata alla piastra.

Il rivelatore impiegato nello strumento utilizzato in questo lavoro è costituito dagli elettrodi che misurano la corrente indotta dal movimento degli ioni nell'analizzatore orbitrap, come spiegato

sopra, la corrente viene elaborata applicando una trasformata di Fourier, il quale, trasforma il segnale elettrico in spettro di massa (Donna, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2011).

9.3. SPETTRO DI MASSA

Lo spettro di massa è un grafico, avente sulle ascisse il rapporto massa su carica e sulle ordinate l'intensità relativa del segnale o l'abbondanza degli ioni.

Lo spettro di un campione è rappresentativo degli ioni presenti in esso, normalmente viene riportato come istogramma che presenta le abbondanze relative rispetto al picco base, le cui barre sono posizionate al valore m/z in cui si ha il valore massimo del segnale.

Il picco base è il picco più intenso dello spettro e ad esso si assegna l'abbondanza relativa 100% (vedi figura 13).

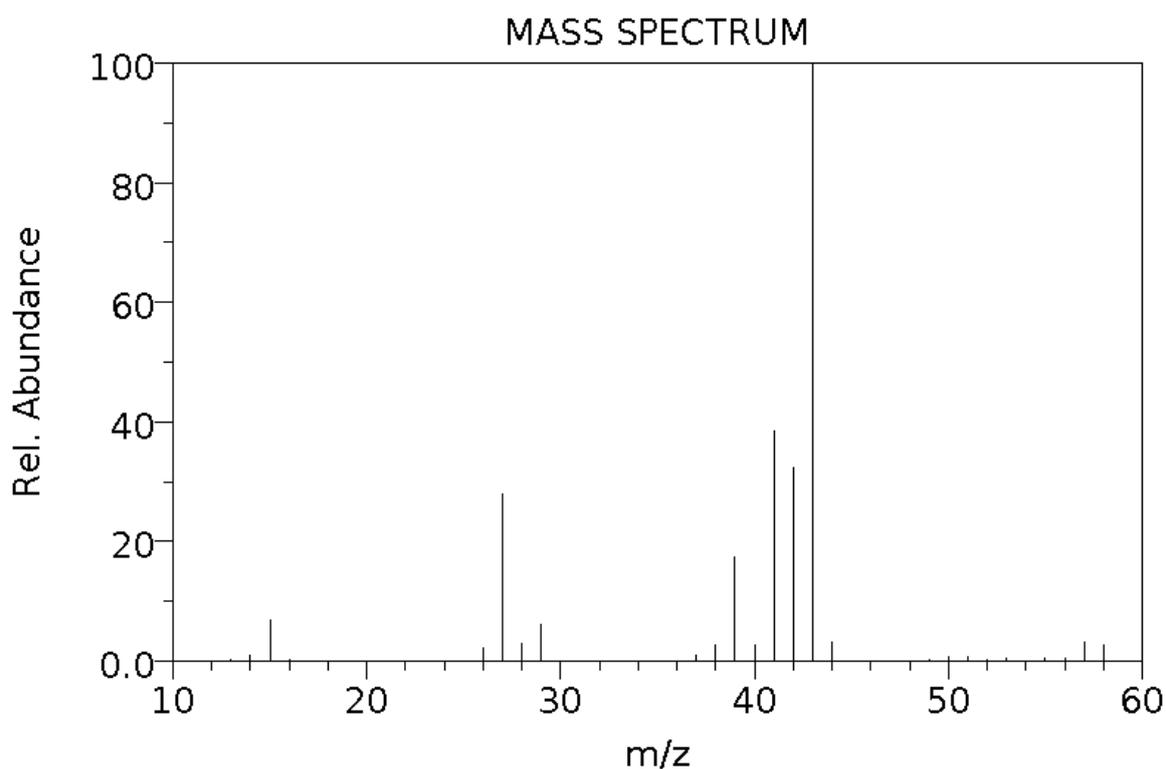


Figura 13: Spettro di massa
(<https://www.freeforumzone.com/mobile/d/9164430/spettri-di-massa/discussione.aspx>)

Lo ione molecolare, invece, è il primo che si forma nella ionizzazione delle molecole presenti nel campione. Si forma per perdita o aggiunta di un elettrone sulla molecola, ottenendo così un radicale cationico (M^+) o anionico (M^-), a seconda della modalità di ionizzazione applicata.

Lo ione molecolare può seguire due percorsi di frammentazione, ossia (considerando lo ione molecolare positivo):



Nel primo caso si ha la frammentazione con formazione di un catione con numero pari di elettroni ed una specie radicalica neutra con un numero dispari di elettroni che è reattiva.

Nel secondo caso si ha frammentazione di uno ione radicalico con numero dispari di elettroni ed una specie neutra con numero pari di elettroni. In questo caso la specie neutra può essere una molecola stabile.

Gli ioni frammento possono a loro volta frammentarsi, subendo anch'essi perdita di specie neutre con numero pari o dispari di elettroni.

Il cammino di frammentazione dipende da quattro fattori principali:

- la forza dei legami che si devono rompere,
- la stabilità dei prodotti di frammentazione, sia ioni che specie neutre,
- le energie interne degli ioni che si frammentano,
- l'intervallo di tempo tra la formazione degli ioni e la loro rivelazione.

La frammentazione è tanto più facile quanto più stabile è il catione che si forma.

Le principali frammentazioni che possono avvenire nelle molecole organiche si distinguono in:

- ❖ Scissioni primarie → avvengono sullo ione molecolare
- ❖ Scissioni secondarie → avvengono sui frammenti
- ❖ Scissioni semplici → avvengono per rottura di un legame semplice fra due atomi
- ❖ Scissioni multiple o riarrangiamenti → implicano reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti

Riassumendo, ogni ione molecolare segue un andamento di frammentazione (fragmentation pattern) caratteristico, che porta alla formazione di ioni frammento, i quali a loro volta possono frammentarsi ulteriormente (analisi MSⁿ).

Tutte queste scissioni formano un insieme di ioni che danno luogo allo spettro di massa del composto analizzato.

Considerando un campione complesso come il miele, costituito da molte molecole diverse, lo spettro di massa prodotto mostra tutti gli ioni presenti al tempo di ritenzione selezionato (Figura 14).

La figura mostra tutti gli ioni eluiti al tempo 23.56 min, presenti nel campione, in un range di massa (m/z) tra 90.00 e 1500.00.

Il picco più intenso è rappresentato dalla massa 271.06 la quale, secondo il pattern di frammentazione (Figura 15 e 16), si ipotizza essere il flavonoide pinobanksin.

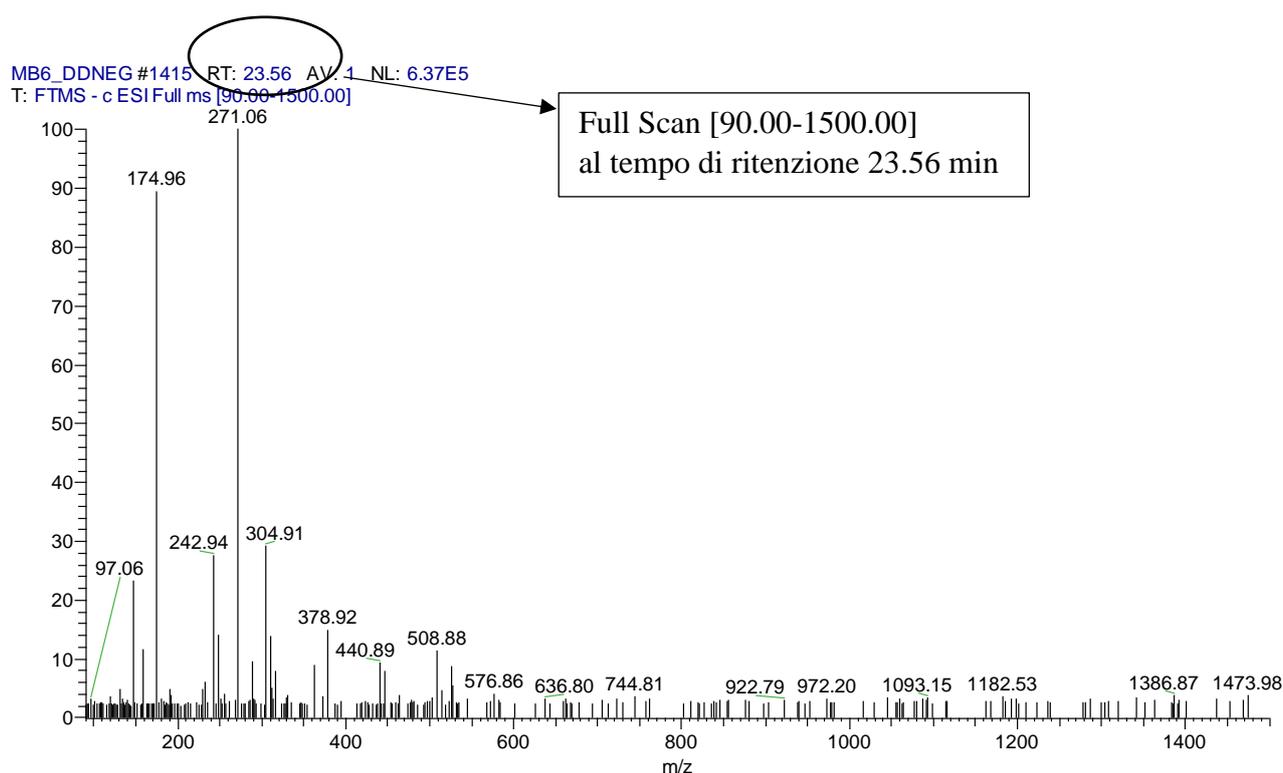


Figura 14: Spettro di massa full scan prodotto con Thermo Xcalibur Qual Browser

La figura 15 mostra la prima frammentazione (MS^2) dello ione più intenso avente $m/z = 271.06$.

MB6_DDNEG #1416 RT: 23.58 AV: 1 NL: 1.36E5
T: FTMS - c ESI d Full ms2 271.06@cid35.00 [60.0

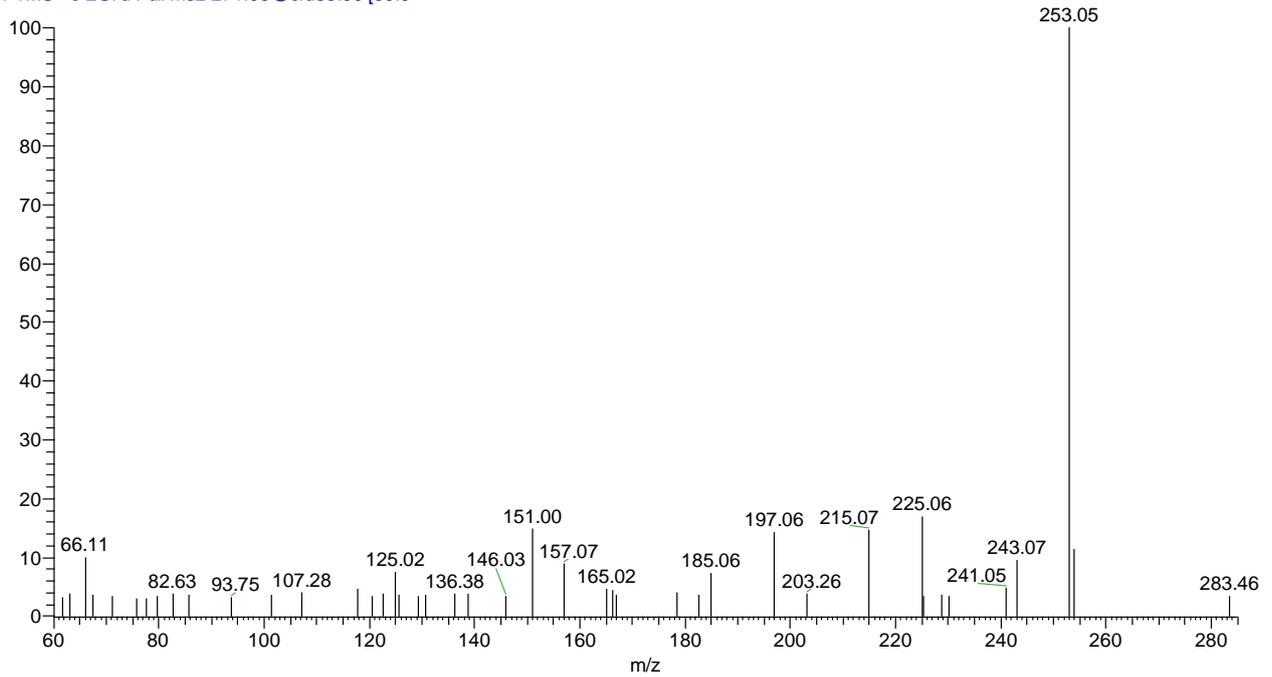


Figura 15: Spettro di massa relativo ad una frammentazione MS²

La figura 16 mostra la frammentazione dello ione con m/z = 253.05, ovvero la seconda frammentazione (MS³).

MB6_DDNEG #1417 RT: 23.59 AV: 1 NL: 2.15E4
T: FTMS - c ESI d Full ms3 271.06@cid35.00 253.0

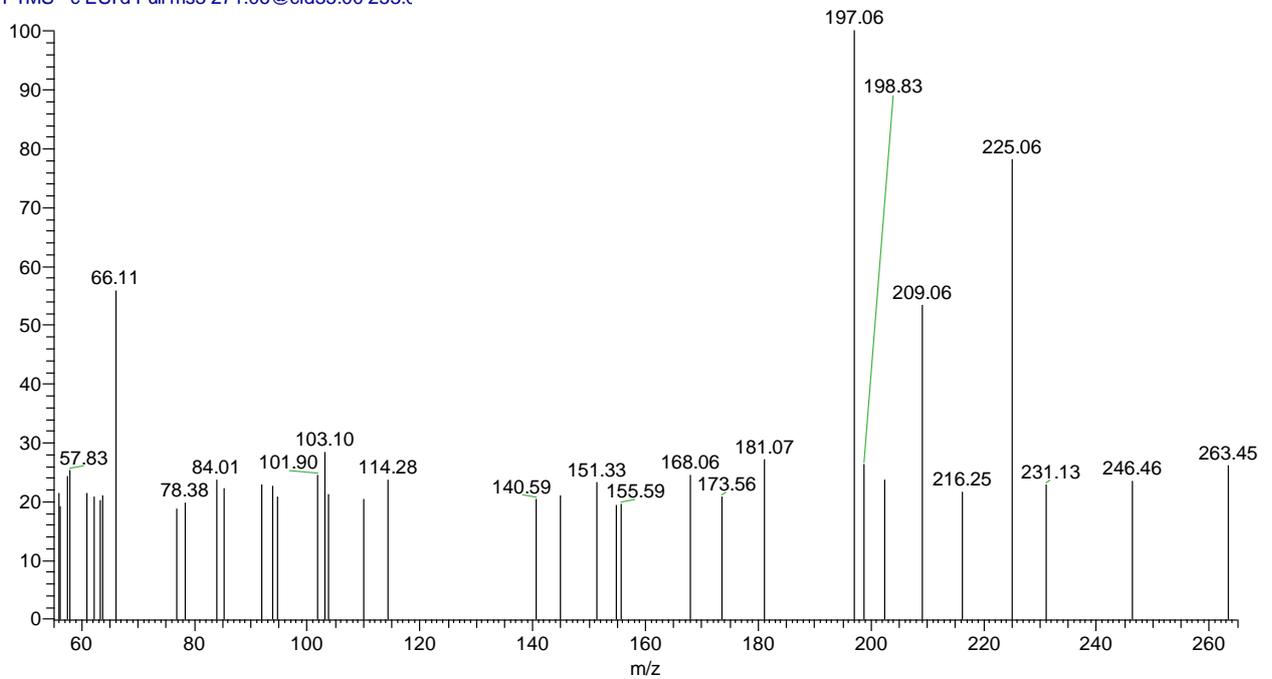


Figura 16: Spettro di massa relativo ad una frammentazione MS³

10. VALUTAZIONE DEL METODO

Il metodo impiegato per l'analisi dei flavonoidi nei campioni di miele ha previsto una fase di messa a punto, realizzata utilizzando, come matrice rappresentativa del miele, sciroppo di glucosio e fruttosio commerciale. Tale matrice è stata selezionata perché già utilizzata in letteratura e poiché risultava simile, in termini di contenuto di zuccheri, alla matrice miele ma non conteneva gli analiti oggetto di studio. Allo sciroppo di glucosio e fruttosio sono stati aggiunti gli standard dei flavonoidi descritti precedentemente (Mix 1 e Mix 2, Tabella 1), per valutare il tempo di ritenzione e per stimare i fattori di recupero degli analiti.

È stato elaborato un metodo di riferimento, detto “metodo base”, sulla base della letteratura disponibile (Michalkiewicz et al., 2008; Pascual-Maté et al., 2018; Zhou et al., 2014), e la valutazione del metodo si è basata sull'ottimizzazione di 3 parametri principali:

- la fase stazionaria da utilizzare per l'estrazione in fase solida
- la massa pesata da sottoporre ad estrazione
- il volume di eluizione delle cartucce.

Tali parametri sono stati variati uno alla volta, per valutare la miglior combinazione da utilizzare per l'estrazione dei flavonoidi, ottenendo così tre metodi utilizzati con ciascuna delle tre tipologie di SPE, per un totale di 9 diverse prove (Tabella 3).

Nel metodo 1 è stata variata la massa da pesare (400 mg) rispetto al “metodo base”, mentre nel metodo 2 è stato variato il volume di eluizione degli analiti con metanolo nella fase di estrazione SPE (3 mL).

Tabella 3: Parametri variati nella messa a punto del metodo

Metodo	Prove	Massa pesata (mg)	Volume di eluizione con metanolo (mL)	SPE
Metodo base	1	300	5	Strata X
	2			HLB
	3			C18
Metodo 1	1	400	5	Strata X
	2			HLB
	3			C18
Metodo 2	1	300	3	Strata X
	2			HLB
	3			C18

Sulla base di studi presenti in letteratura, nel miele le concentrazioni di Quercetin, Kaempferol e Rutin sono più elevate rispetto a Naringenin e Apigenin.

In particolare, la concentrazione attesa è di circa 1 ng/mg per i flavonoidi più concentrati e 0,1 ng/mg per quelli meno concentrati (Michalkiewicz et al., 2008; Pascual-Maté et al., 2018; Zhou et al., 2014).

Alla luce di questo, a 300 mg dei campioni di sciroppo di glucosio e fruttosio sono stati aggiunti 100 μ L del mix Quercetin-Kaempferol-Rutin (indicato come mix 1 in tabella 4) e 20 μ L del mix Apigenin-Naringenin (indicato come mix 2 in tabella 4), mentre nei campioni con 400 mg di sciroppo le aliquote aggiunte erano di 150 μ L per il mix 1 e 25 μ L per il mix 2.

Tabella 4: Aggiunta standard ai campioni di sciroppo di glucosio e fruttosio e concentrazione degli analiti

Campioni	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Massa pesata (mg)	300	300	300	300	300	300	400	400	400
Mix 1 (μ L)	100	100	100	100	100	100	150	150	150
Mix 2 (μ L)	20	20	20	20	20	20	25	25	25
Quercetin (ng/mg)	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,77	0,77	0,77
Kaempferol (ng/mg)	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,77	0,77	0,77
Rutin (ng/mg)	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,74	0,74	0,74
Apigenin (ng/mg)	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
Naringenin (ng/mg)	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13

I risultati relativi alle diverse procedure di estrazione sono riportati nel capitolo 11.1.2.

10.1. PROCEDURA OTTIMIZZATA DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Sulla base dei risultati il metodo scelto per l'analisi dei campioni di miele è il seguente: sono stati pesati 400 mg di campione sulla bilancia analitica direttamente in una provetta eppendorf da 2 mL, sono stati aggiunti 1,5 mL della soluzione estraente (H₂O acidificata con acido formico 1%); il campione è stato agitato fino a completa dissoluzione e successivamente estratto in bagno a ultrasuoni per 15 minuti a 25°C. I campioni sono stati poi centrifugati per 15 min a 14680 rpm. Il surnatante è stato purificato dagli interferenti mediante le cartucce SPE C18. Le colonne SPE sono state preliminarmente condizionate con 2 mL di metanolo e 2 mL di acqua ultrapura acidificata (AF 1%), poste nell'apposito collettore da vuoto Manifold collegato ad una pompa da vuoto. Il campione è stato quindi caricato in testa alle colonnine SPE, facendo attenzione che le colonnine non andassero a secco; le SPE sono state lavate, per la rimozione degli zuccheri, utilizzando 6 mL di acqua acidificata. Il recupero degli analiti dalla cartuccia è stato effettuato mediante eluizione con 5 mL di metanolo, l'eluato è stato raccolto in vessel da 5 mL. Il campione è stato quindi ridotto di volume per aumentare la concentrazione degli analiti presenti, con conseguente miglioramento del limite di rilevabilità del metodo, utilizzando un bagno termostato al turbovap a 30°C con flusso di azoto, raggiungendo per evaporazione il volume finale di 0.5 mL. L'estratto concentrato è stato infine filtrato con filtri a siringa in PTFE (Ø 25 mm, 0.45 µm), preventivamente attivati con 2 mL di metanolo e 2 mL di acqua ultrapura. Il filtrato è stato raccolto in vial da autocampionatore da 2 mL e conservate in frigo fino al momento dell'analisi.

Di seguito si propone una rappresentazione schematica della procedura di preparazione del campione con il metodo ottimizzato (figura 17).

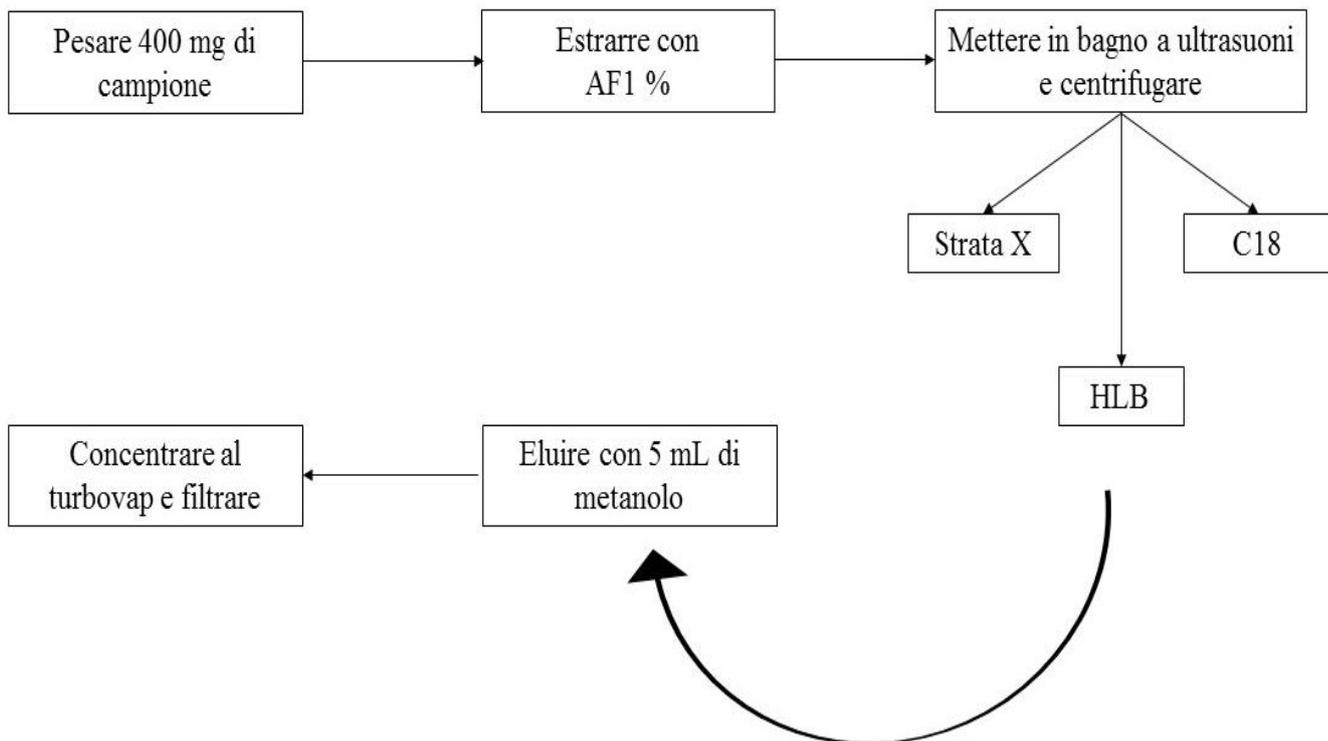


Figura 17: Rappresentazione schematica della procedura di preparazione del campione con il metodo ottimizzato

I campioni, così preparati, sono poi sottoposti ad analisi allo strumento HPLC-MS.

10.2. METODO STRUMENTALE PER L'ANALISI DEL MIELE

Il metodo strumentale utilizzato per l'analisi del miele è stato precedentemente sviluppato e pubblicato ed è utilizzato per l'analisi metabolomica di varie matrici vegetali (Rizzato et al., 2017; Scalabrin et al., 2015, 2020). Dato l'elevato numero di classi di metaboliti di interesse, i parametri strumentali scelti per il metodo analitico rappresentano un compromesso tra le esigenze dei diversi analiti, al fine di determinare il maggior numero possibile di molecole.

La colonna HPLC utilizzata era una C₁₈ SB-Aq Narrow Bore RR 2.1 x 150 mm, 3.5 µm (Agilent Technologies, Wilmington, USA). La fase stazionaria C₁₈ consente una buona separazione dei composti apolari e mediamente polari; la lunghezza della colonna ha consentito la separazione di un notevole numero di metaboliti.

È stata effettuata una separazione cromatografica usando una fase mobile a gradiente costituita da acqua acidificata con acido formico allo 0.01% (eluente A) e ACN acidificato con acido formico allo 0.01% (eluente B). L'acetonitrile è un eluente favorito nelle separazioni cromatografiche metabolomiche perché, rispetto al metanolo, incrementa la ritenzione dei metaboliti a bassa polarità e risulta vantaggioso nel caso di analisi di matrici complesse.

La corsa cromatografica includeva una fase isocratica iniziale di 5 minuti al 100% dell'eluente A, seguita da un gradiente di 40 minuti fino al 100% di composizione dell'eluente B; continuava poi con 15 minuti isocratica in fase organica e uno step finale di 15 minuti di condizionamento della colonna alle proporzioni iniziali dell'eluente.

Per quanto riguarda l'analisi in HRMS, i dati sono stati acquisiti operando la sorgente ESI sia in modalità positiva che negativa. La temperatura del capillare della sorgente è stata impostata a 275 °C mentre la temperatura di vaporizzazione era 300 °C. I flussi di azoto, sheat gas, auxiliary e sweep sono stati impostati rispettivamente a 35, 5 e 11 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Le analisi allo spettrometro di massa sono state effettuate in modalità full scan in un range di massa compreso tra 90 e 1500 Da. Il potere risolvente è stato impostato a 60 000.

Al fine di tracciare un profilo completo di frammentazione degli ioni analizzati, sono state inoltre effettuate delle analisi in modalità data dependent, che consente di acquisire i cammini di frammentazione degli ioni di interesse presenti in un determinato momento nel corso dell'analisi.

Per assicurare una elevata accuratezza di massa (errore < 5 ppm) lo strumento è stato calibrato con il metodo della calibrazione esterna, prima dell'analisi, e durante l'analisi stessa l'accuratezza della misura è stata garantita con il metodo della lock mass, che permette una correzione automatica della misura della massa durante l'analisi.

I dati ottenuti sono stati elaborati mediante il software Qual Browser, Thermo Xcalibur 4.0.27.10, il quale permette di gestire i cromatogrammi e gli spettri di massa dei campioni analizzati.

Il software permette inoltre di interagire con i dati prodotti selezionando, per esempio, specifici metaboliti di interesse, proponendo una serie di formule brute associabili a quel metabolita, facilitando così l'identificazione delle molecole e l'integrazione dell'area del picco.

10.3. IDENTIFICAZIONE DEI COMPOSTI

La procedura di identificazione di una molecola ritenuta interessante può essere suddivisa idealmente nei seguenti passaggi:

- calcolo e assegnazione della formula bruta più probabile attraverso il confronto dello spettro di massa teorico con quello misurato e la ricerca su database e letteratura;
- confronto delle frammentazioni ottenute in modalità data-dependent con quelle presenti in letteratura o database online;
- assegnazione di uno o più probabili nomi alla molecola oggetto di studio.

A seconda del numero di informazioni che è possibile ricavare dai dati sperimentali e per confronto con la letteratura, viene assegnato un livello di identificazione della molecola, come precedentemente descritto (Sumner et al., 2007).

Per questo lavoro di tesi, per l'identificazione delle molecole, sono state utilizzate le seguenti banche dati e articoli di letteratura:

- www.knapsackfamily.com
- www.pubchem.com
- www.dnp.chemnetbase.com
- Alipieva et al., 2007;
- Aničić et al., 2021;
- Bujor et al., 2019;
- Dias et al., 2013;
- Dickson et al., 2020;
- Emad et al., 2022;
- Ferracane et al., 2010;
- Gašić et al., 2015;
- Koulis et al., 2021;
- Montoro et al., 2021;
- Nešović et al., 2020;
- Qi et al., 2014;
- Seraglio et al., 2016;
- Silva et al., 2018;
- Taamalli et al., 2015;
- Xu et al., 2019

11. RISULTATI

11.1. MESSA A PUNTO DEL METODO PER L'ESTRAZIONE DEI FLAVONOIDI

11.1.1. Esclusione delle SPE stirene-divinilbenzene (Strata X)

Durante la fase preanalitica sono stati riscontrati dei problemi nei campioni trattati con le Strata X: nella fase di concentrazione al turbovap, l'evaporazione del solvente si bloccava ben prima di raggiungere il volume prefissato di 0.5 mL.

È stata, dunque, formulata l'ipotesi che, in questo caso, le cartucce Strata X non abbiano rimosso adeguatamente la componente zuccherina; secondo la legge di Raoult, la tensione di vapore del solvente di una soluzione ricca di un soluto poco volatile (carboidrati), è più bassa rispetto al solvente puro e dipende dalla sua frazione molare, poiché, con il procedere della evaporazione del solvente la sua frazione molare diminuisce, la tensione di vapore del solvente diminuisce proporzionalmente, fino a diventare molto bassa e la fase di concentrazione non può procedere ulteriormente in tempi ragionevoli; pertanto, la riduzione di volume si interrompe molto prima rispetto ai campioni in cui gli zuccheri sono stati rimossi o, comunque, significativamente ridotti. Per confermare questa ipotesi sono stati preparati dei campioni di miele, effettuando l'estrazione con le colonne SPE Strata X, sui quali è stato eseguito il saggio di Fehling sul campione tal quale e dopo idrolisi dei carboidrati per via acida. L'idrolisi acida viene fatta per decomporre il saccarosio in glucosio e fruttosio; infatti, il saccarosio non dà luogo alla reazione di Fehling.

Il saggio di Fehling è un saggio qualitativo che determina la presenza di zuccheri riducenti in un campione. In Appendice I è riportata la procedura utilizzata per l'esecuzione del saggio di Fehling. Se sono presenti zuccheri riducenti, questi riducono l'agente ossidante (reattivo di Fehling) producendo un precipitato rosso mattone costituito da ossido rameoso. Il saggio è positivo quando si ha produzione del precipitato.

I risultati dei saggi qualitativi sulla presenza degli zuccheri riducenti nei campioni sono tutti positivi (Tabella 5), ciò significa che le colonne Strata X non hanno rimosso gli zuccheri, principalmente glucosio e fruttosio, impedendo la concentrazione dei campioni.

Alla luce di questi risultati le colonne Strata X sono state escluse dalla preparazione e dall'analisi dei campioni.

Tabella 5: Risultati dei saggi qualitativi sulla presenza degli zuccheri riducenti nei campioni di miele dopo estrazione con SPE Strata X.

Campione	Saggio Fehling	Saggio Fehling dopo idrolisi acida
MM	+	+
MP	+	+
MM	+	+
MB	+	+
MP	+	+
MB	+	+

11.1.2. Valutazione dei recuperi di flavonoidi con i diversi metodi testati

Al fine di identificare la metodica più idonea per l'analisi qualitativa di miele, volendo ottimizzare il metodo principalmente per l'analisi di flavonoidi, quantità note di standard di alcuni flavonoidi (vedi materiali e metodi, paragrafo 10) sono state aggiunte ad una matrice di sciroppo di fruttosio-glucosio permettendo il confronto dei recuperi ottenuti.

In tabella 6 è riportata la sintesi delle condizioni sperimentali utilizzate per la valutazione del metodo, dopo esclusione dei campioni analizzati con le SPE Strata X.

Tabella 6: Campioni e parametri utilizzati per la valutazione del metodo

Campioni	Massa pesata (mg)	Volume di eluizione con metanolo (mL)	SPE
S2	300	3	HLB
S3	300	3	C18
S4	300	5	HLB
S5	300	5	C18
S7	400	5	HLB
S8	400	5	C18

Nei campioni S2, S3, S4 e S5 sono stati pesati 300 mg di sciroppo e le SPE utilizzate erano rispettivamente HLB, C18, HLB, C18. S2 e S3 sono stati eluiti con 3 mL di metanolo, mentre S4 e S5 con 5 mL. Nei campioni S7 e S8, invece, sono stati pesati 400 mg di sciroppo e le SPE erano rispettivamente HLB e C18, con volume di eluizione 5 mL.

In tabella 7 sono riportate le masse molecolari dei flavonoidi aggiunti ai campioni di sciroppo e i loro tempi di ritenzione.

Tabella 7: Massa molecolare e tempi di ritenzione dei flavonoidi standard

Nome composto	Formula chimica	Massa molecolare	Tempo di ritenzione (min)
Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,04526	24.31
Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,06076	23.39
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1452	17.68
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,03995	24.20
Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,03482	19.00

Nelle Figure 18 e 19 sono riportati, a titolo di esempio, i cromatogrammi con rivelatore di massa (TIC e ione molecolare) di Naringenin e Rutin, rispettivamente, con i tempi di ritenzione e le aree dei picchi nel campione S8. I dati relativi a tutti i campioni sono riportati in Appendice II e III.

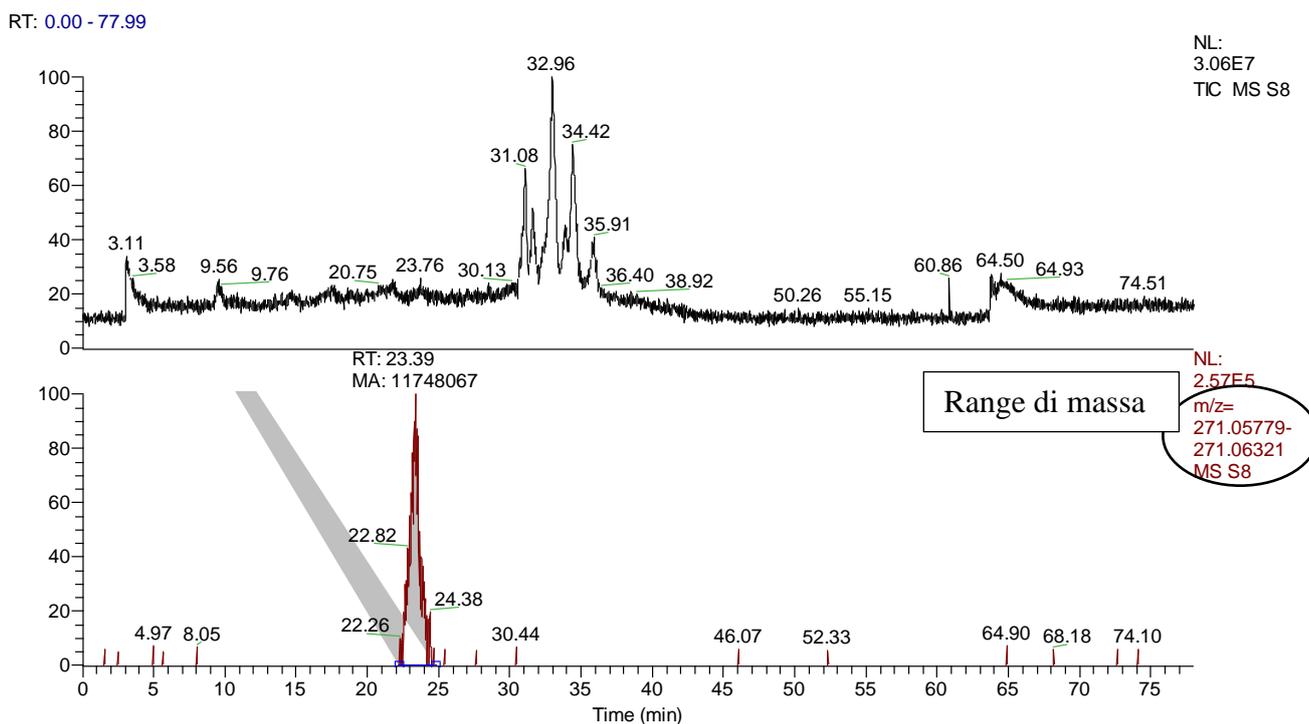


Figura 18: Area del picco e RT di Naringenin nel campione S8

RT: 0.00 - 77.99

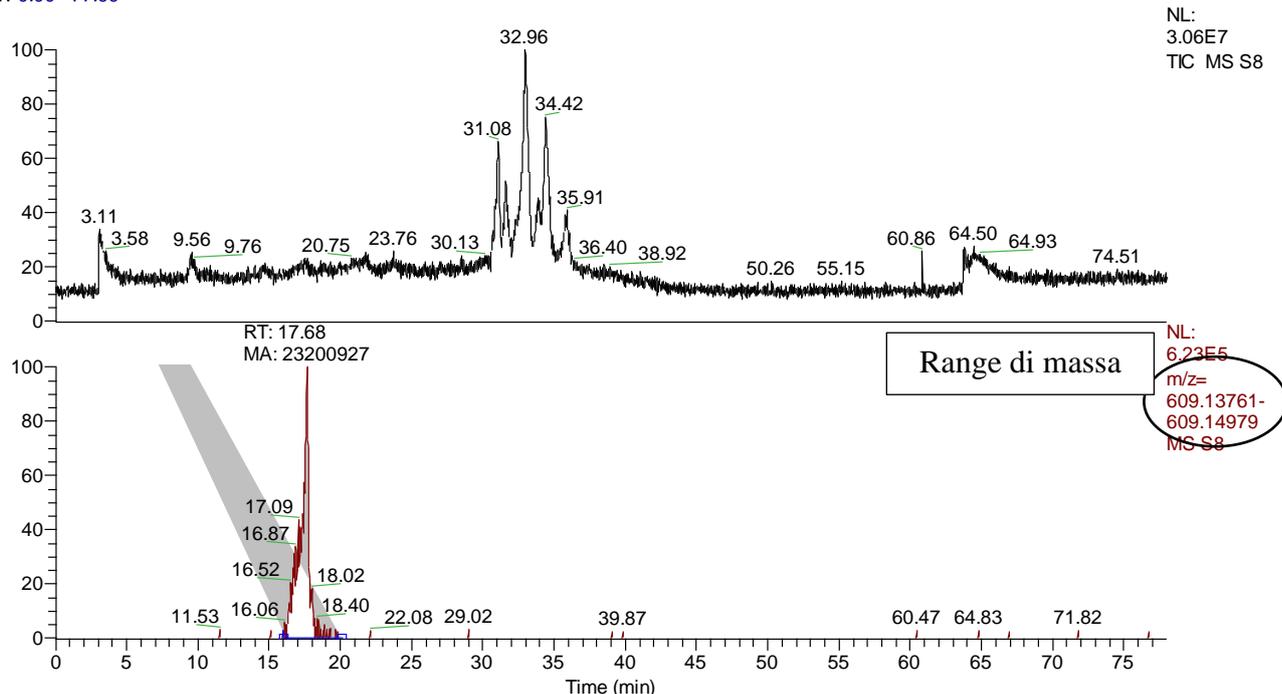


Figura 19: Area del picco e RT di Rutin nel campione S8

In Figura 20 sono presentate le aree dei picchi, in un grafico combinato, dei flavonoidi standard aggiunti ai campioni di sciroppo S2, S3, S4, S5, S7, S8. Il grafico mostra le aree dei picchi normalizzate rispetto alla quantità di standard aggiunto ai campioni.

Come si può notare, il campione S8 è l'unico che recupera, seppur con resa modesta, definita dall'area del picco, il flavonoide Quercetin. Tra tutti i campioni, inoltre, S8 risulta essere il campione che presenta un recupero buono anche per gli altri flavonoidi.

Si può notare, infatti, che solo i campioni preparati utilizzando le SPE C18 (S3, S5, S8) recuperano il flavonoide kaempferol, assente invece in quelli preparati con le HLB.

Prendendo in considerazione Rutin, l'area del picco aumenta all'aumentare del volume di eluizione con metanolo (vedi differenza tra S2 e S4 o tra S3 e S5) ed è maggiore nei campioni con 400 mg di sciroppo preparati con la colonna C18 (vedi differenza tra S4 e S7 o tra S5 e S8 per la massa, tra S7 e S8 per la differenza tra HLB e C18).

I risultati sui campioni di sciroppo, quindi, hanno dimostrato che il metodo 1, ossia utilizzando 400 mg di campione e 5 mL di metanolo per il recupero, con estrazione in fase solida su colonna C18, è il metodo migliore per l'estrazione dei flavonoidi, infatti il campione S8, ottenuto con queste condizioni operative, ha mostrato aree dei flavonoidi più grandi rispetto agli altri campioni e ha consentito il recupero di tutti i composti standard aggiunti.

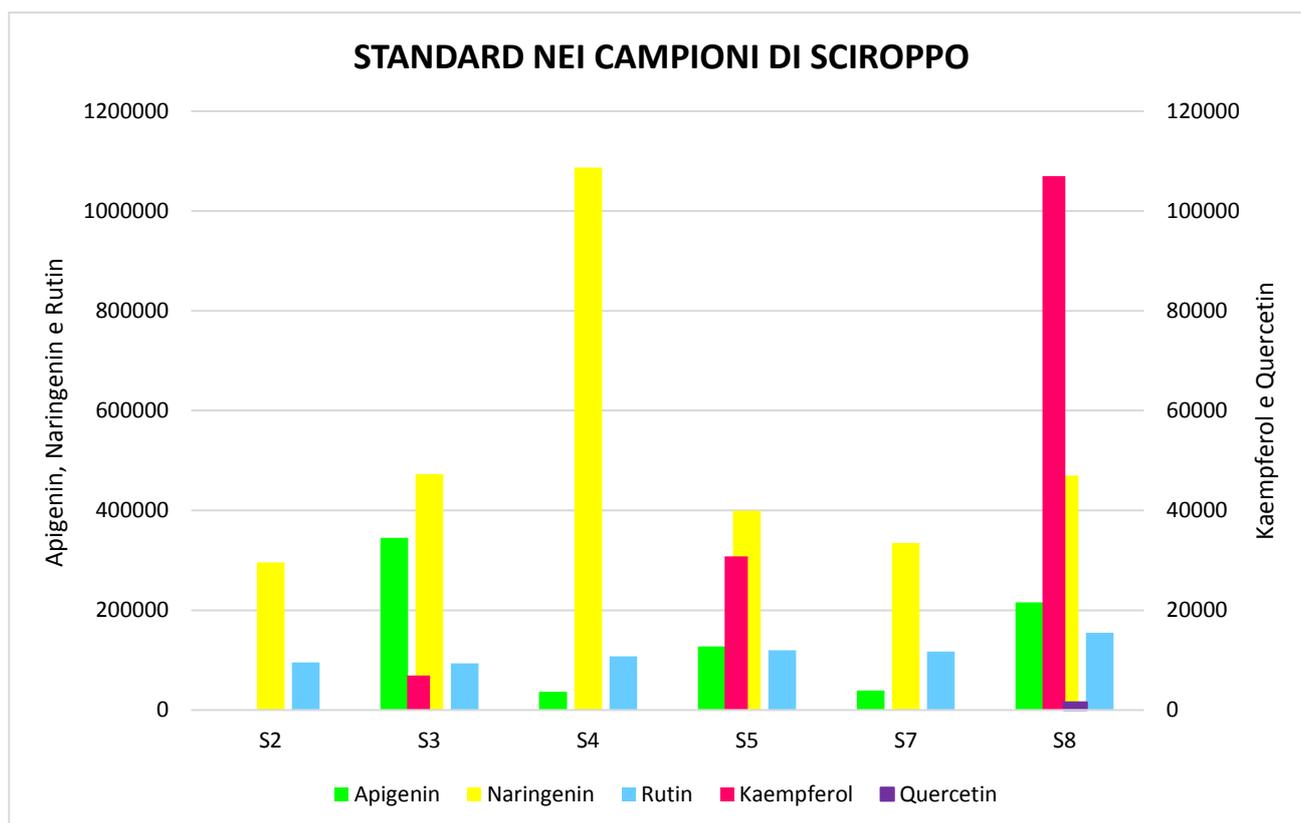


Figura 20: Istogramma delle aree dei picchi normalizzate dei flavonoidi standard aggiunti nei campioni di sciroppo

La ripetibilità della procedura è stata verificata attraverso l'analisi di tre repliche indipendenti di campioni della soluzione di glucosio-fruttosio ai quali sono stati aggiunti gli standard dei flavonoidi utilizzati per la valutazione del metodo (vedi tabella 4) e stimando la concentrazione nell'estratto utilizzando l'intensità del segnale (in polarità negativa). I risultati sono riportati in Tabella 8.

Tabella 8: Valori di CV% relativi alla ripetibilità della procedura utilizzata per l'analisi del miele

	Apigenin	Naringenin	Rutin	Kaempferol	Quercetin
CV%	14%	21%	14%	21%	24%

11.2. RISULTATI DEI FLAVONOIDI NEI CAMPIONI DI MIELE

I campioni di miele considerati in questo studio (miele di acacia (MA), miele di barena (MB), miele millefiori autunnale (MM), miele millefiori primaverile (MP)) sono stati analizzati con il metodo che ha mostrato migliori performance in termini di fattori di recupero dei flavonoidi, descritto in materiali e metodi al paragrafo 10.1.

Il livello di identificazione di questi flavonoidi è il livello 1, ossia quello che si assegna quando si hanno almeno due dati indipendenti e ortogonali relativi a composti noti, come standard di riferimento aggiunti e analizzati nelle stesse condizioni sperimentali del campione.

I dati, in questo caso, sono il tempo di ritenzione, la massa esatta e lo spettro di massa.

Nell'istogramma in figura 21 sono messe a confronto le aree di Naringenin nei campioni di miele.

In figura 22 si riportano le aree degli altri flavonoidi analizzati nei campioni di miele.

Nel campione MA sono stati identificati tutti i flavonoidi presi in considerazione, ad eccezione di Quercetin.

In MB e MM sono stati rilevati tutti i 5 flavonoidi, sono gli unici campioni in cui è presente Quercetin.

MP ha mostrato la presenza solamente di Apigenin e Naringenin.

In Appendice III sono riportate le informazioni relative ai composti identificati: massa, formula, composto ipotetico e frammenti, mentre in Appendice IV sono riportate le aree dei picchi degli stessi composti.

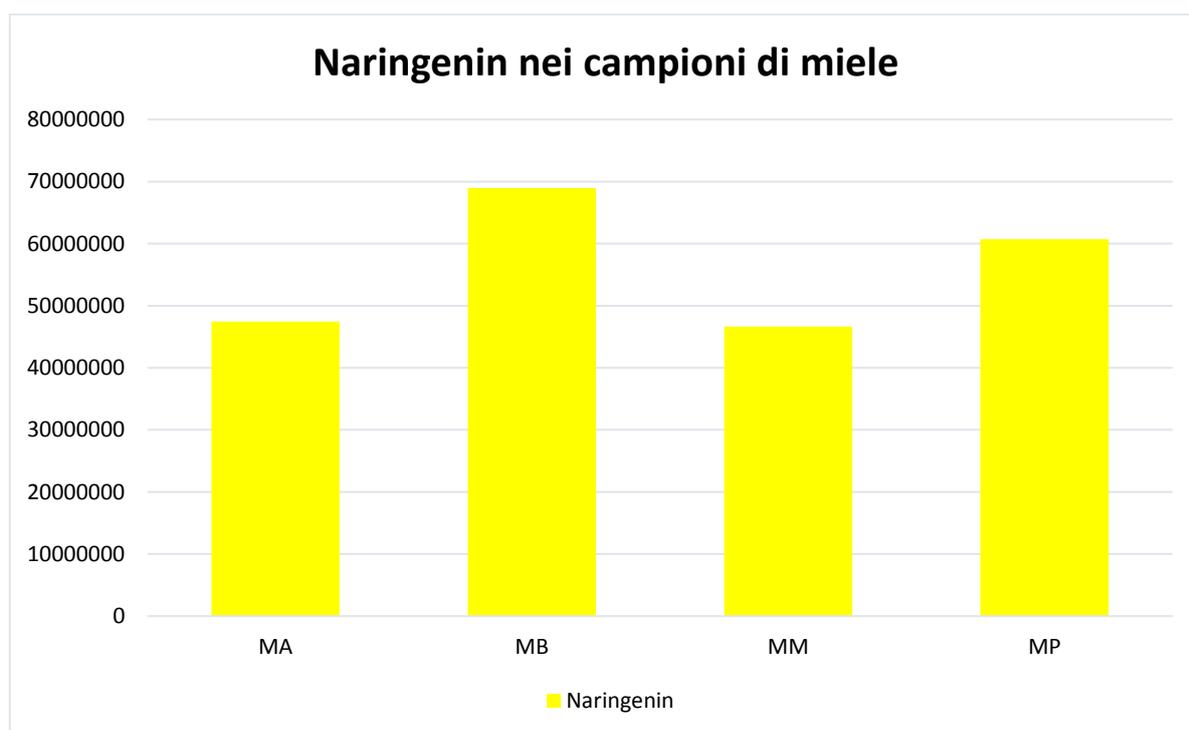


Figura 21: Istogramma con aree di Naringenin nei campioni di miele

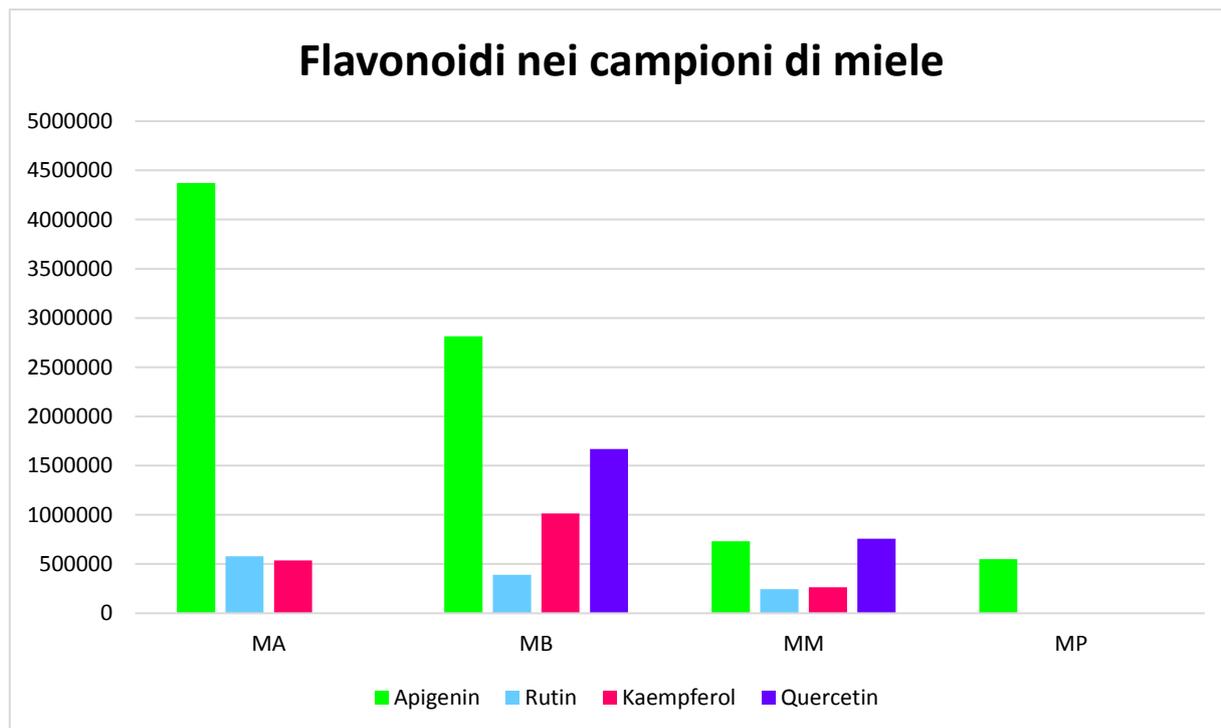


Figura 22: Istogramma con aree dei flavonoidi nei campioni di miele

Apigenin si può trovare in piante come *Allium sativum*, *Aloe spp.*, *Apium graveolens*, *Asparagus officinalis*, *Bellis perennis*, *Brassica oleracea*, *Chamomilla recutita*, *Daucus carota*, *Medicago sativa*, *Mentha aquatica*, *Mentha pulegium*, *Mentha piperita*, *Ocimum spp.*, *Punica granatum*, *Raphanus sativus*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia spp.*, *Taraxacum officinalis*, *Thymus*, *Trifolium pratense*, *Vicia faba*.

Apigenin si trova anche nelle specie appartenenti al genere *Limonium* (Asen & Plimmer, 1972), pianta caratteristica dell'ambiente lagunare. I fiori di *Limonium vulgare* ricoprono le barene nel periodo di fioritura che va da giugno a settembre, ma può prolungarsi anche nel periodo autunnale. Il miele di barena prende questo nome proprio perchè viene prodotto in piena fioritura del *Limonium*, che costituisce la fioritura predominante del periodo tardo estivo in laguna.

In figura 22 sono riportate le aree del picco di Apigenin nei campioni di miele: si nota che i mieli di barena e il miele di acacia sono caratterizzati da una presenza più elevata di questo flavonoide.

Naringenin si trova in diverse piante come *Acacia dealbata* (mimosa), *Allium Sativum*, *Aloe spp.*, *Arabidopsis thaliana*, *Artemisia campestris ssp.maritima*, *Artemisia spp.*, *Asparagus officinalis*, *Brassica oleracea*, *Daucus carota*, *Equisetum arvense*, *Medicago arabica*, *Medicago sativa*, *Medicago truncatula*, *Origanum vulgare*, *Origanum majoricum*, *Polygonum minus*, *Prunus avium*

(ciliegio), *Prunus persica* (pesco), *Punica granatum* (melograno), *Raphanus sativus*, *Salix purpurea*, *Trifolium pratense*, *Trigonella foenum-graecum*, *Typha angustifolia*, *Verbena bipinnatifida*, *Vicia faba*.

Naringenin è il flavonoide che ha aree più elevate nei campioni, ed è presente in piante a fioritura principalmente primaverile/estiva, ma anche tardo estiva autunnale come nel caso di *Artemisia spp.*, *Daucus carota* e *Arabidopsis thaliana*.

In MB e MP è presente in maggior quantità, vedi figura 21.

Kaempferol è presente in quasi tutte le piante in cui si trova anche naringenin.

Si differenzia, principalmente, per la presenza in *Apocynum venetum*, *Euphorbia geniculata*, *Euphorbia prostrata*, *Humulus lupulus*, *Urtica dioica*. Anche kaempferol è presente maggiormente in MB.

Quercetin è stato identificato nel miele millefiori “autunnale” e nel miele di barena (tardo estivo).

Piante presenti nel territorio che contengono Quercetin e fioriscono nel periodo estivo/tardo estivo sono: *Allium cepa*(cipolla), *Allium Sativum*, *Ceratonia siliqua* (carrubo), *Houttuynia cordata*, *Humulus lupulus*, *Matricaria recutita*, *Nerium oleander*, *Pelargonium reniforme*, *Polygonum amphibium*, *Polygonum hydropiper*, *Polygonum lapathifolium*, *Polygonum mite*, *Punica granatum*, *Raphanus sativus*, *Rosa luciae*, *Verbena bipinnatifida*, *Verbena officinalis*.

Rutin si trova nelle stesse piante di Quercetin e, inoltre, in *Bellis perennis*, *Ficus carica*, *Morus alba*, *Olea europaea*, *Stachys palustris*, *Tordylium apulum*, *Styphnolobium japonicum* (detto albero del miele o sophora) e *Ziziphus jujuba* (giuggiolo).

Rutin è presente in maggior quantità nel campione MA (periodo primaverile).

11.3. RISULTATI ALTRI COMPOSTI DI INTERESSE

Sono stati identificati, oltre ai flavonoidi già visti, circa ottanta composti di interesse nutraceutico per le loro proprietà benefiche e legati all'origine botanica del miele appartenenti principalmente alle classi di metaboliti secondari delle piante: flavonoidi, acidi organici, acidi fenolici, terpeni, iridoidi, acidi grassi, glicosidi fenolici, fitoalessine, zuccheri.

I terpeni sono caratterizzati dalla presenza, nella molecola, di più unità isopreniche (unità a 5 atomi di carbonio C₅). A seconda del numero di atomi di carbonio, multipli di 5, da cui sono costituiti, i terpeni si classificano in monoterpeni (C₁₀), sesquiterpeni (C₁₅), diterpeni (C₂₀), triterpeni (C₃₀) e tetraterpeni o caroteni (C₄₀).

Gli iridoidi chimicamente sono monoterpeni derivati dall'ossidazione e ciclizzazione del geraniolo, un alcol monoterpenico alifatico di natura isoprenica. Nelle piante sono presenti principalmente in forma glicosilata, e sono detti glicosidi iridoidi.

I glicosidi fenolici sono delle molecole contenenti uno zucchero (unità zuccherina) legato a un fenolo aglicone (Boeckler et al., 2011). L'aglicone è la parte non zuccherina di una molecola di glicoside e generalmente è costituito da un alcol o un fenolo.

Le fitoalessine sono composti antimicrobici a basso peso molecolare, prodotti dalle piante in risposta a stress biotici e abiotici (Jeandet, 2015).

Di seguito, sono discussi i composti che davano luogo a un segnale nei campioni di miele e di cui siamo stati in grado di identificare come composti ipotetici.

In Appendice III sono riportati tutti i composti ipotetici identificati con i diversi livelli di identificazione, mentre in Appendice IV si trovano le aree dei picchi.

Chrysin

Chrysin, detto anche 5,7-diidrossiflavone, appartiene alla classe dei flavonoidi e la sua formula chimica è C₁₅H₁₀O₄. Nello specifico, è un flavone che si può trovare in *Artemisia campestris ssp. glutinosa*, *Escallonia spp*, *Origanum spp*, *Populus spp*, *Primula farinosa*, *Spartium junceum*, *Veronica spicata*, *Vicia faba*.

In Figura 23 sono rappresentate le aree dei picchi di Chrysin nei campioni di miele. Si può notare che le aree maggiori si trovano nel miele di barena (MB).

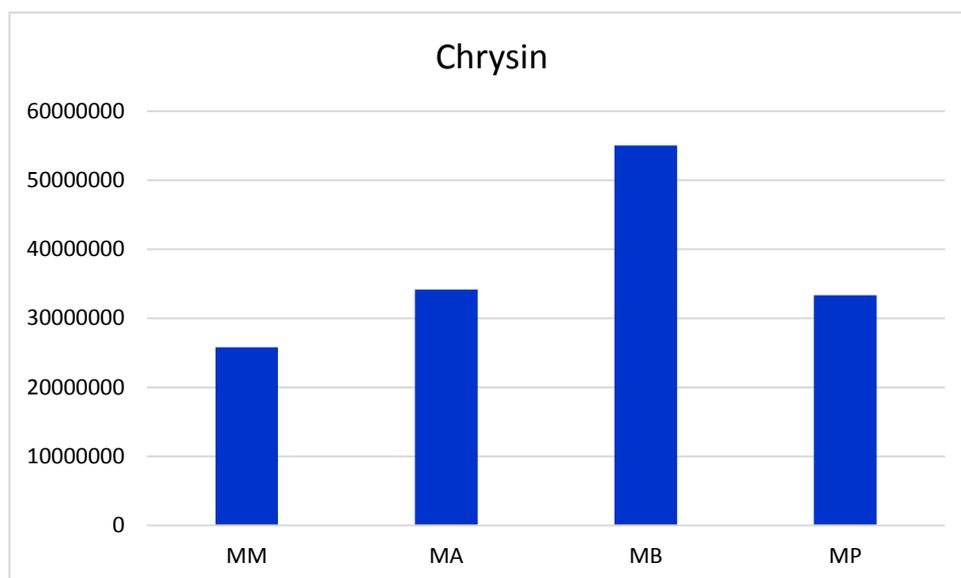


Figura 23: Aree dei picchi di Chrysin nei campioni di miele

Pinobanksin 5-methyl ether e Pinocembrin

Pinobanksin 5-methyl ether è un flavonoide, appartenente al gruppo dei flavanonoli, avente formula chimica $C_{16}H_{14}O_5$.

Pinocembrin, invece, appartiene al gruppo dei flavanoni ed ha formula chimica $C_{15}H_{12}O_4$.

Pinobanksin 5-methyl ether e pinocembrin sono costituenti della resina di pioppo, il cui compito è quello di “curare le ferite” della pianta e di proteggerla dagli attacchi patogeni (Drescher et al., 2019). La resina viene raccolta dalle api per la produzione di propoli e la presenza dei suoi componenti si evidenzia anche nel miele.

Pinocembrin, inoltre, si trova anche nelle piante del genere *Euphorbia* (Rasul et al., 2013).

Osservando il grafico (Figura 24) si nota che le aree nei diversi mieli sono simili: ciò può essere dovuto proprio al fatto che questi flavonoidi derivano dalla resina, la cui presenza, a differenza delle fioriture, è indipendente dalla stagionalità.

Il rapporto tra le aree di pinobanksin 5-methyl ether e pinocembrin si mantiene costante nei diversi mieli, quindi, il rapporto di concentrazione tra i due composti non cambia, questo è in accordo con la loro origine comune.

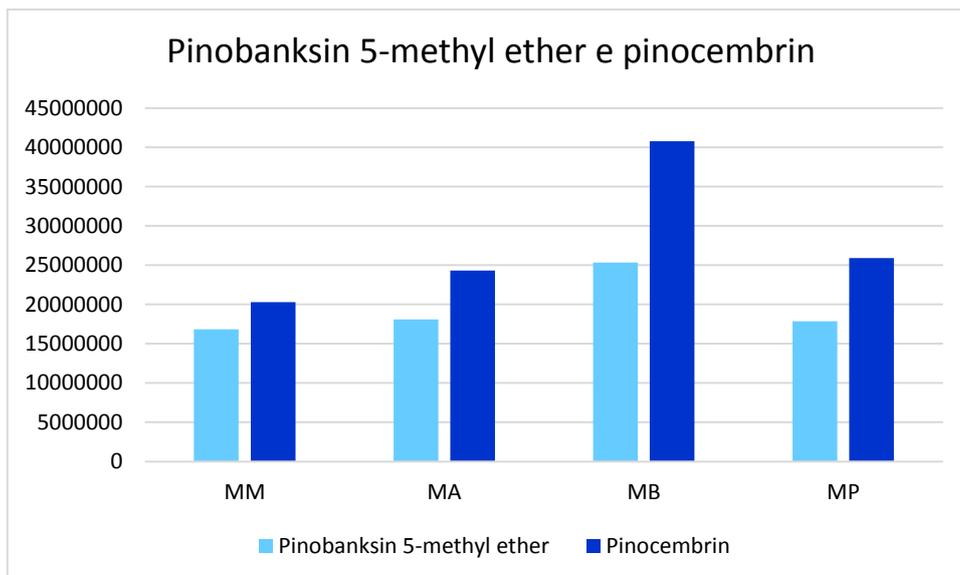


Figura 24: Aree dei picchi di Pinobanksin 5-methyl ether e pinocembrin nei campioni di miele

Elenolic acid e 6-O-Oleuropeoilsucrose

Elenolic acid è un acido organico non fenolico, con formula chimica $C_{11}H_{14}O_6$.

6-O-Oleuropeoilsucrose è un saccarolipide, ovvero un composto organico costituito da acidi grassi legati a uno scheletro zuccherino; la sua formula chimica è $C_{22}H_{36}O_{13}$.

Entrambi i composti si trovano nella pianta di olivo *Olea europaea*,

In Figura 25 si vede che elenolic acid ha aree elevate.

L'acido elenolico, infatti, è uno dei metaboliti secondari più importanti della pianta di olivo (Termentzi et al., 2021).

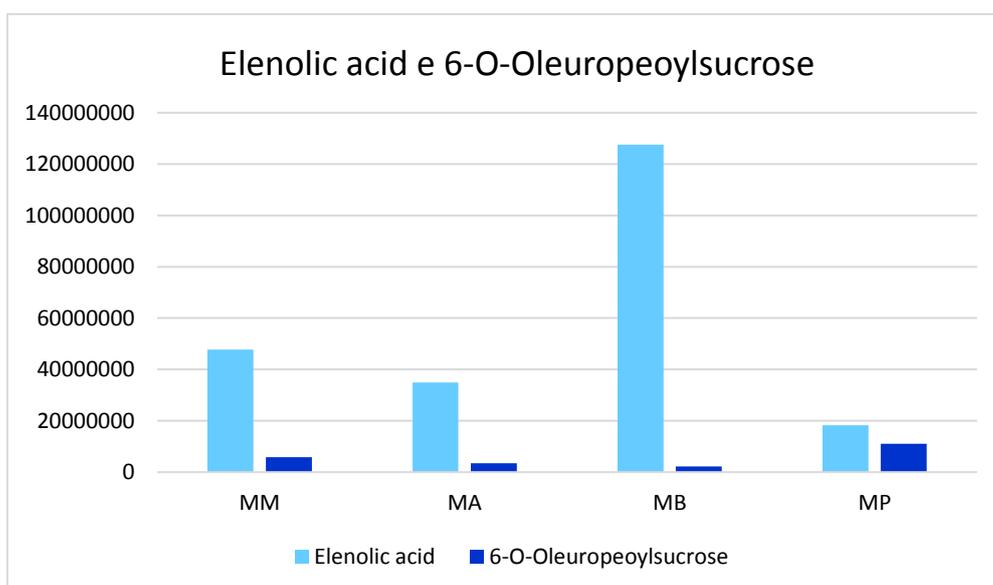


Figura 25: Aree dei picchi di Elenolic acid e 6-O-Oleuropeoilsucrose nei campioni di miele

2-cis,4-trans abscisic acid

Il 2-cis,4-trans abscisic acid è un fitormone con formula chimica $C_{15}H_{20}O_4$. Chimicamente è un sesquiterpene (C_{15}) sintetizzato dai carotenoidi (C_{40}) per scissione ossidativa (Nambara, 2017).

Si può trovare in *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Equisetum arvense*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Robinia pseudoacacia*, *Vicia faba* e *Malus pumila*.

L'acido abscisico, quindi, si trova nelle piante di acacia (*Robinia pseudoacacia*) e in piante a fioritura prevalentemente primaverile.

Osservando il grafico (Figura 26) si vede che questo composto è presente principalmente nel miele di acacia e nel miele millefiori "primaverile".

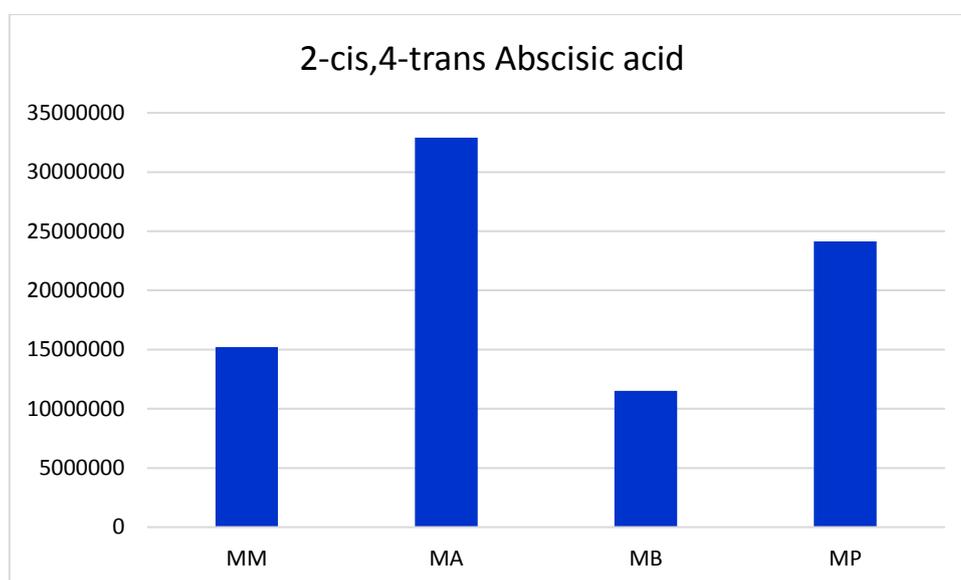


Figura 26: Aree dei picchi di 2-cis,4-trans abscisic acid nei campioni di miele

Dihydroconiferin

Il composto dihydroconiferin appartiene alla classe dei glicosidi fenolici ed ha formula chimica $C_{16}H_{24}O_8$.

Si trova nelle piante di *Taraxacum officinalis* (Kisiel & Barszcz, 2000) e *Taraxacum platycarpum*.

La fioritura del tarassaco avviene principalmente nei mesi primaverili/estivi ma può protrarsi anche fino all'autunno.

Come si vede dalla figura 27, infatti, il miele primaverile è caratterizzato da un contenuto più elevato rispetto agli altri mieli.

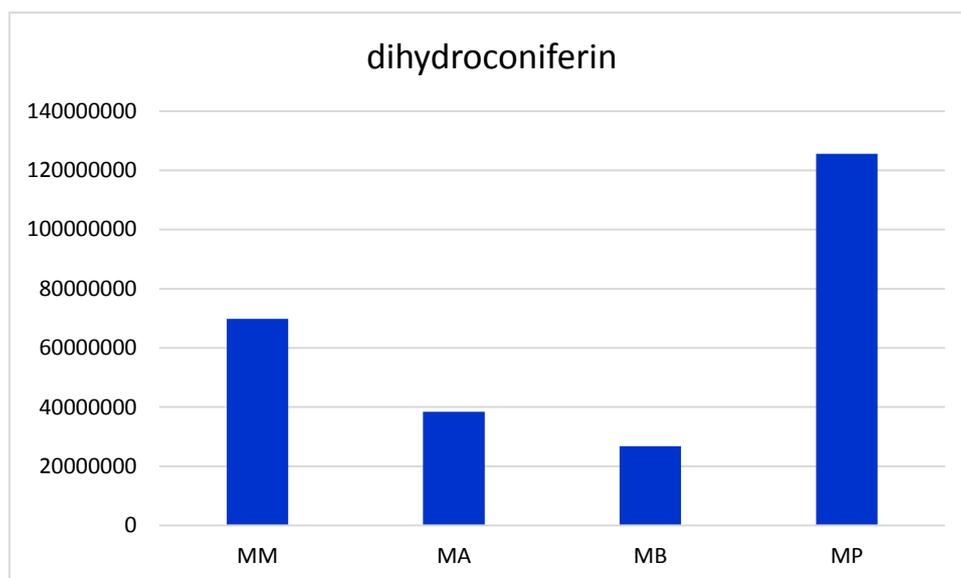


Figura 27: Aree dei picchi di dihydroconiferin nei campioni di miele

6-deoxylamioside e 5-deoxylamiol

6-deoxylamioside e 5-deoxylamiol sono dei composti appartenenti alla classe dei glicosidi iridoidi. Hanno formula chimica $C_{18}H_{28}O_{10}$ e $C_{16}H_{26}O_9$ rispettivamente.

Si trovano nelle specie *Lamium*, in particolare entrambi in *Lamium amplexicaule* (Guiso & Martino, 1981), e 5-deoxylamiol anche in *Lamium purpureum*, *Lamium album* e *Lamium maculatum* (Alipieva et al., 2007). Inoltre, 5-deoxylamiol si può trovare anche in *Clinopodium vulgare*.

La fioritura di *Lamium amplexicaule* si ha durante tutti i mesi dell'anno, tranne i mesi estivi giugno e luglio, mentre per *Lamium purpureum* e *Lamium maculatum* la fioritura va da febbraio a ottobre/dicembre.

Lamium album e *Clinopodium vulgare* fioriscono invece da aprile/maggio fino ad agosto.

5-deoxylamiol è pressochè costante nei vari campioni, probabilmente perché deriva da piante che hanno una fioritura molto lunga e, appunto, costante nei mesi dell'anno.

6-deoxylamiol presenta, invece, aree maggiori nel miele primaverile (vedi Figura 28).

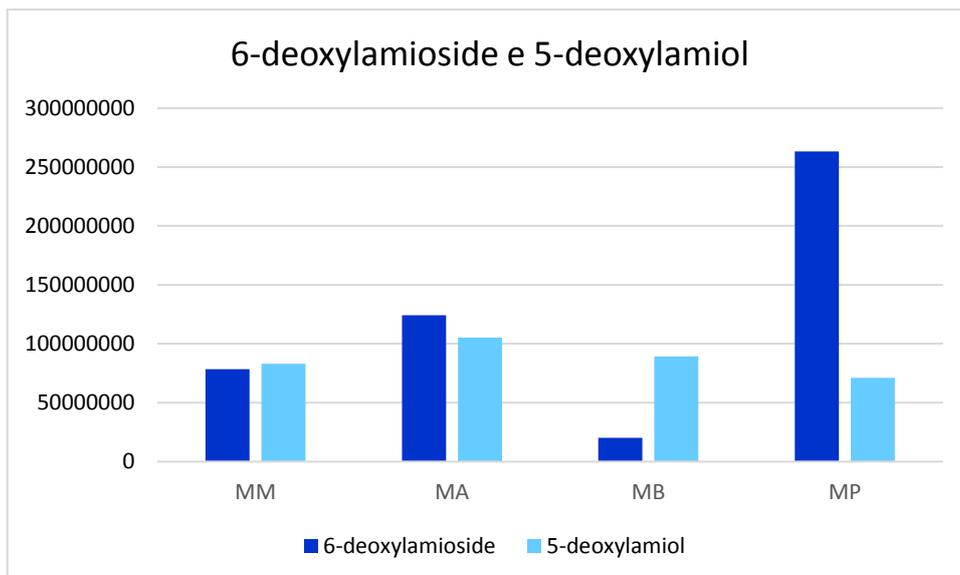


Figura 28: Aree dei picchi di 6-deoxylamioside e 5-deoxylamiol nei campioni di miele

Genipin gentiobioside

Il composto genipin gentiobioside ha formula chimica $C_{23}H_{34}O_{15}$ e fa parte dei glicosidi iridoidi. Si trova nelle piante di *Gardenia jasminoides*, la cui fioritura è continua, dalla primavera fino all'autunno.

I mieli millefiori primaverile e autunnale sono caratterizzati da una presenza più elevata di questo composto (Figura 29).

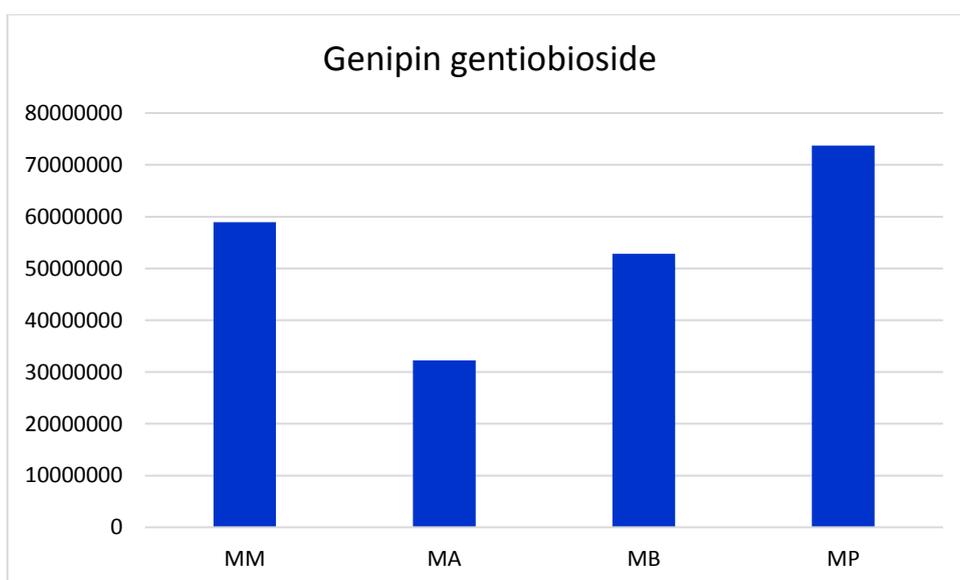


Figura 29: Aree dei picchi di genipin gentiobioside nei campioni di miele

Isosuspensolide E

Isosuspensolide E, formula chimica $C_{23}H_{36}O_{13}$, è un glicoside iridoide che si trova nelle piante di viburno.

In particolare, questo composto è stato identificato in alcuni studi condotti su *Viburnum ayavacense* (Sharifi-Rad et al., 2021).

La fioritura delle specie appartenenti al genere *Viburnum* è prolungata nel tempo ma avviene principalmente in primavera.

I mieli primaverili (MP e MA) hanno mostrato un contenuto più elevato di Isosuspensolide E rispetto agli altri mieli (Figura 30).

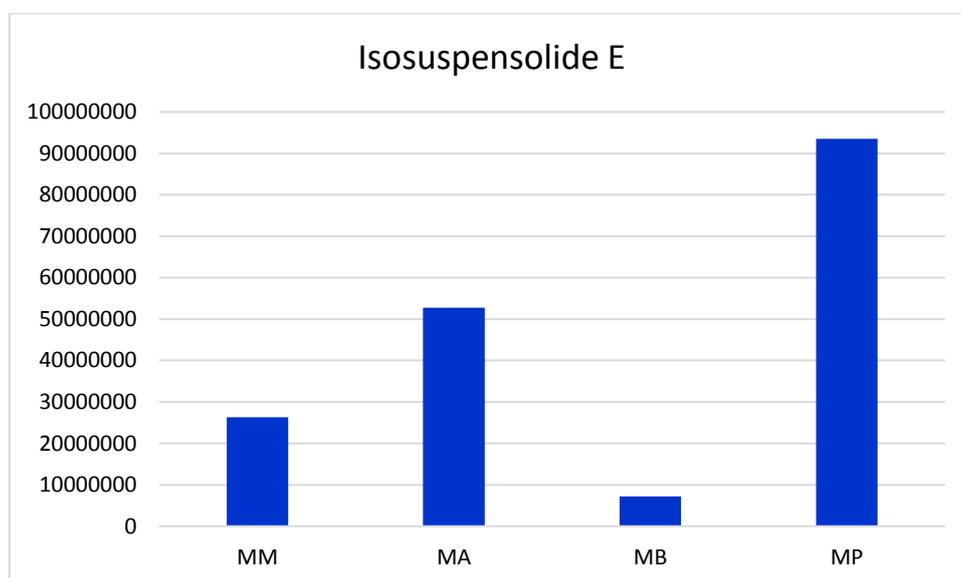


Figura 30: Aree dei picchi di isosuspensolide E nei campioni di miele

Loganin

Loganin è un composto appartenente alla classe dei glicosidi iridoidi, la sua formula chimica è $C_{17}H_{26}O_{10}$.

Si può trovare in diverse piante come *Catharanthus roseus*, *Centaurium erythraea*, *Jasminum grandiflorum*, *Jasminum officinale*, *Menyanthes trifoliata*, *Osmanthus austrocaledonicus*, *Patrinia villosa*. Fioriscono tutte in primavera-inizio estate, tranne *Patrinia villosa* che fiorisce a tarda estate.

Loganin è presente maggiormente nel miele millefiori primaverile e nel miele millefiori autunnale (Figura 31). Inoltre, tra tutti i composti identificati in questo lavoro di tesi, l'area di Loganin in MP è la più elevata, quindi, si può ipotizzare in concentrazione più elevata.

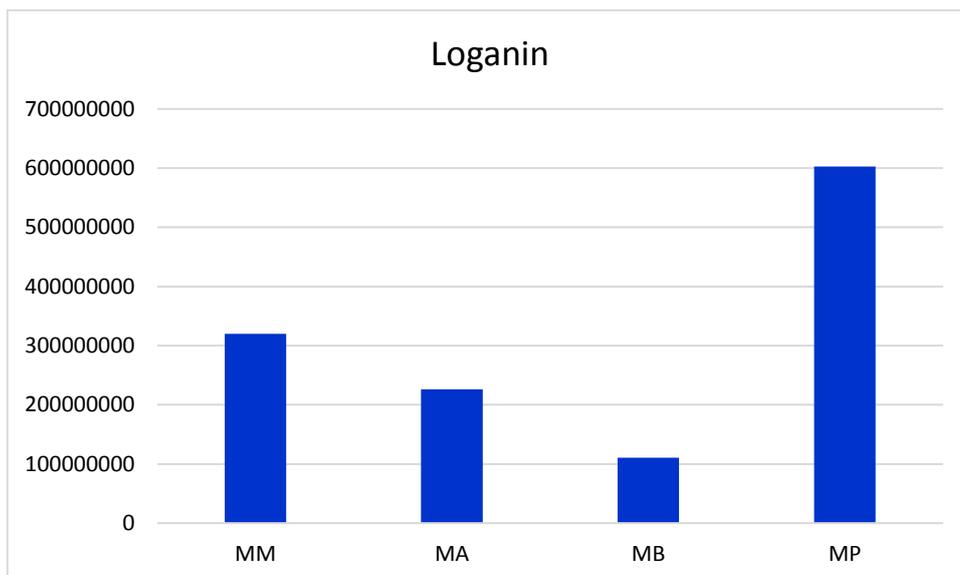


Figura 31: Aree dei picchi di loganin nei campioni di miele

Carthamoside B4

Carthamoside B4 è un glicoside fenolico avente formula chimica $C_{22}H_{34}O_{13}$.

Questo composto si trova nelle piante di *Carthamus tinctorius*, conosciuto comunemente come cartamo o zafferanone.

La fioritura inizia a fine primavera/inizio estate e si protrae fino a settembre circa.

I campioni che mostrano un'area maggiore di carthamoside B4 sono il miele millefiori primaverile (MP), seguito dal millefiori autunnale (MM) e dal miele di barena (MB), vedi Figura 32.

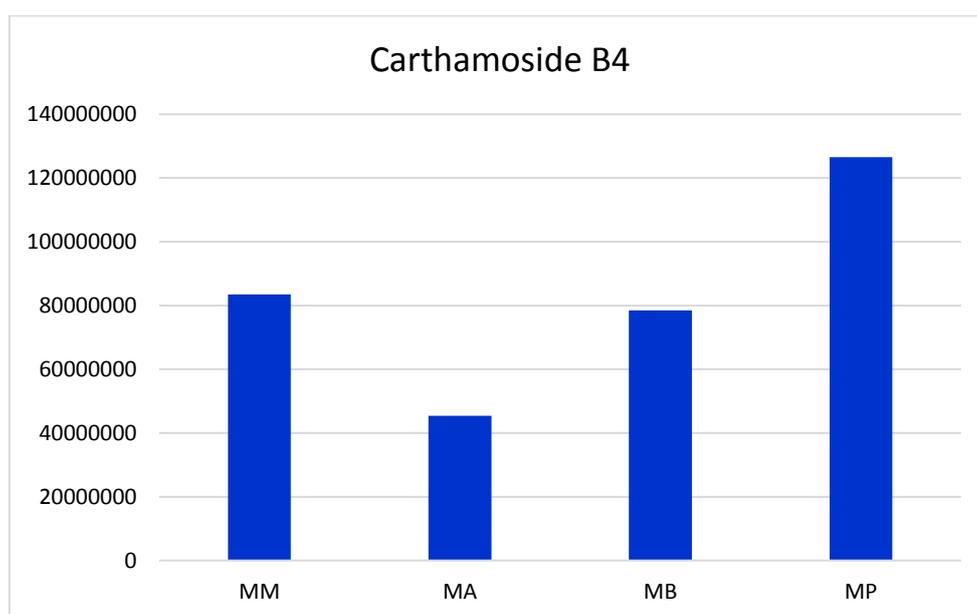


Figura 32: Aree dei picchi di carthamoside B4 nei campioni di miele

Genkwanin, acacetin o 7,2'-dihydroxy-6-methoxyisoflavone

Genkwanin, acacetin e 7,2'-dihydroxy-6-methoxyisoflavone sono flavonoidi aventi la stessa massa e la stessa formula chimica $C_{16}H_{12}O_5$.

Genkwanin e acacetin si possono trovare in diverse piante, quali le specie del genere *Artemisia*, *Medicago polymorpha*, *Ocimum basilicum*, *Origanum spp*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Mentha aquatica*, *Trifolium repens*, *Verbena bipinnatifida*, *Veronica officinalis*, *Veronica teucrium*.

Fioriscono quasi tutte a fine primavera/inizio estate. La fioritura di *Trifolium Repens*, *Chrysanthemum leucanthemum* e *Mentha aquatica* si prolunga fino all'autunno.

Il composto più interessante però, in questo caso, è 7,2'-Dihydroxy-6-methoxyisoflavone perché si trova nella salicornia (*Salicornia europaea*), pianta alofita tipica dell'ambiente lagunare.

La fioritura della salicornia avviene nel periodo tardo estivo/autunnale, come anche quella dell'artemisia.

È interessante notare che il segnale relativo a questo composto è più elevato proprio nel miele di barena (MB).

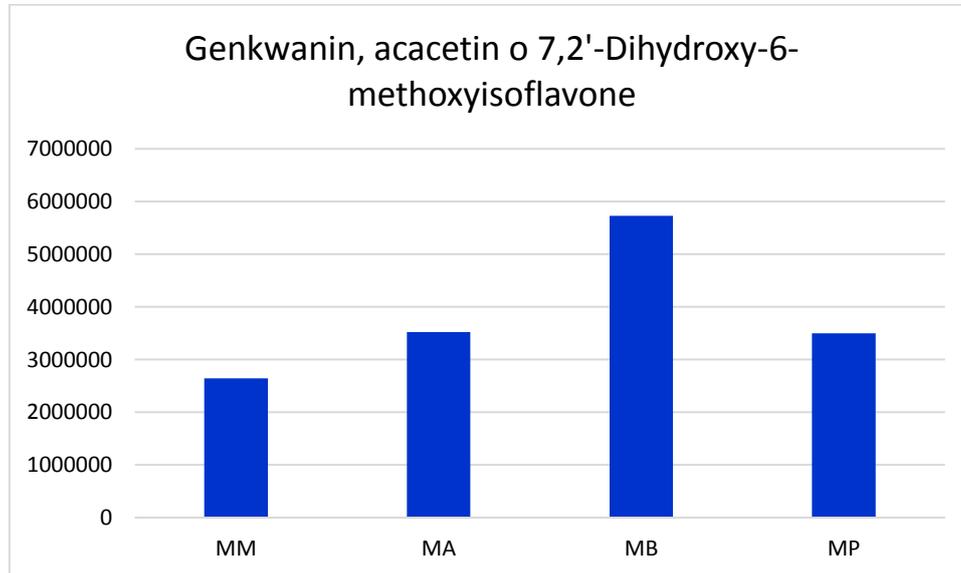


Figura 33: Aree dei picchi di Genkwanin, acacetin o 7,2'-Dihydroxy-6-methoxyisoflavone nei campioni di miele

Liolide

Liolide è un composto appartenente alla classe dei terpeni, con formula chimica $C_{11}H_{16}O_3$.

Le piante in cui è presente sono *Commelina communis*, *Euphorbia helioscopia*, *Fumaria officinalis*, *Helianthus annuus*, *Lythrum salicaria*, *Melia azedarach*, *Menyanthes trifoliata*, *Plantago lanceolata*, *Plantago major*.

I periodi di fioritura di queste piante sono molto variabili e prolungati nel tempo.

Dal grafico (Figura 34) si osserva che la maggior quantità di loliolide nel miele deriva dalle fioriture primaverili (MP), come *Fumaria officinalis*, *Lythrum salicaria*, *Melia azedarach* e *Menyanthes trifoliata*.

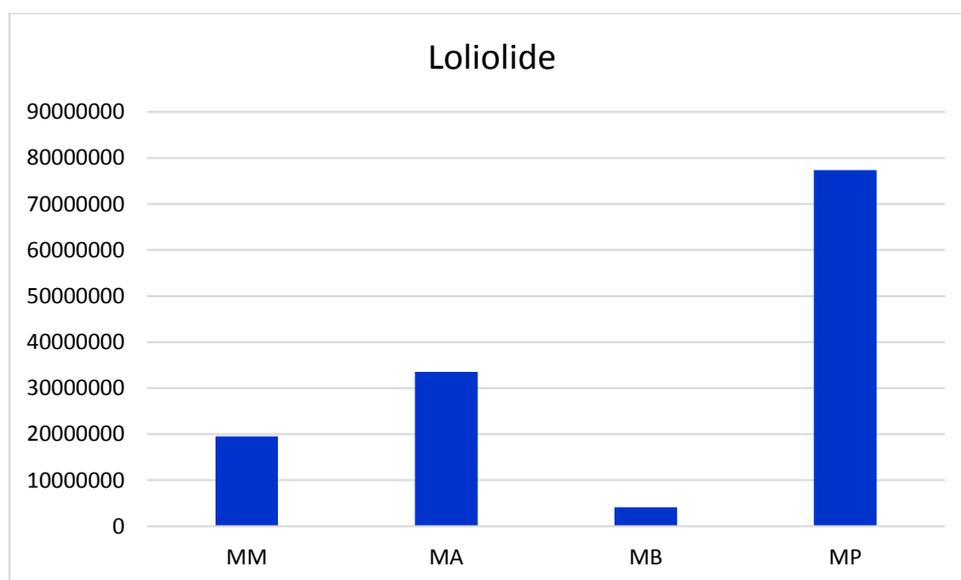


Figura 34: Aree dei picchi di loliolide nei campioni di miele

2-C-methyl-D-erythritol o 2-deoxy-D-ribitol

2-C-methyl-D-erythritol o 2-deoxy-D-ribitol hanno formula chimica $C_5H_{12}O_4$ e sono degli alditoli, ossia alcol che derivano da zuccheri.

2-C-methyl-D-erythritol si trova in *Anethum graveolens* e *Coriandrum sativum*, i quali hanno una fioritura primaverile/estiva, mentre 2-deoxy-D-ribitol si trova in *Foeniculum vulgare*, la cui fioritura va da maggio a ottobre.

Le aree maggiori, in questo studio, sono state evidenziate nei campioni di miele di acacia, quindi primaverile, e di barena, tardo estivo (Figura 35).

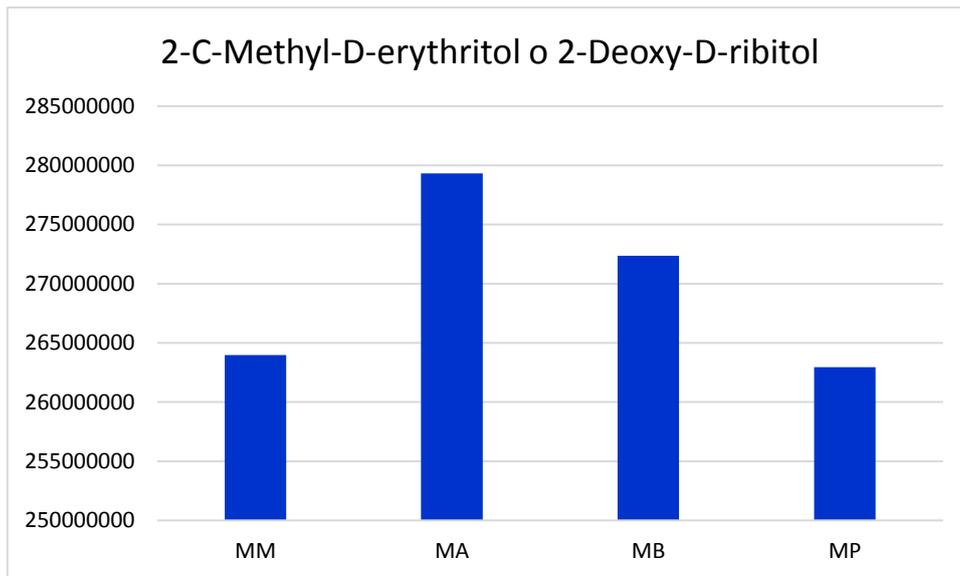


Figura 35: Aree dei picchi di 2-C-methyl-D-erythritol e 2-deoxy-D-ribitol nei campioni di miele

Oleandrose

Oleandrose è uno zucchero con formula molecolare $C_7H_{14}O_4$, contenuto nella pianta di Nerium oleander.

L'oleandro inizia a fiorire in concomitanza con l'acacia, ovvero circa a maggio, e mantiene la fioritura fino a settembre.

Dal grafico si nota che oleandrose è presente maggiormente nel miele di acacia (MA) (Figura 36).

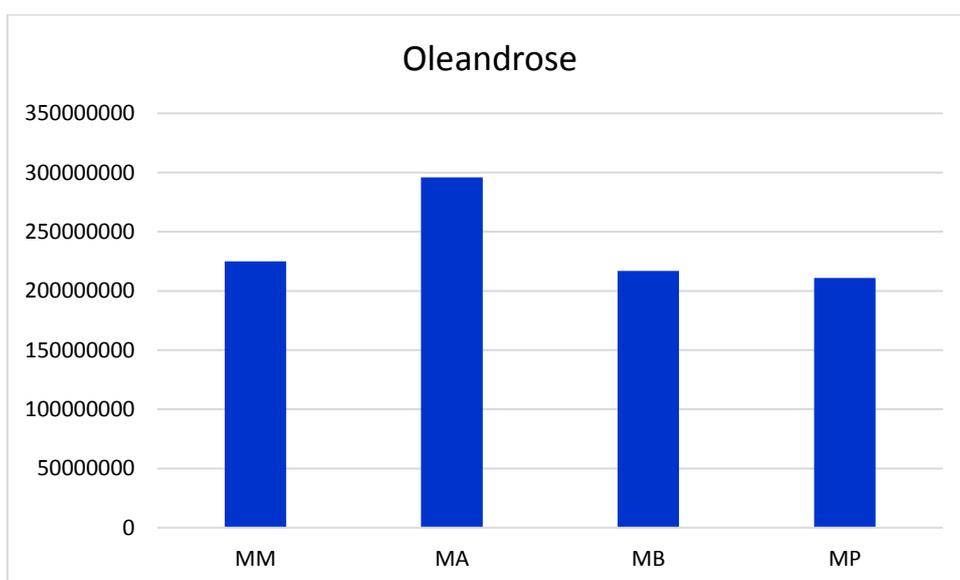


Figura 36: Aree dei picchi di oleandrose nei campioni di miele

Pimelic acid

Pimelic acid è un acido organico, con formula chimica $C_7H_{12}O_4$, appartenente alla classe degli acidi bicarbossilici.

L'acido pimelico, detto anche acido eptandioico, si trova in *Ricinus communis*.

Il ricino fiorisce a fine primavera/inizio estate fino a ottobre.

La presenza di questo composto nel miele rimane pressoché costante nei vari campioni, con l'area maggiore in MA (Figura 37).

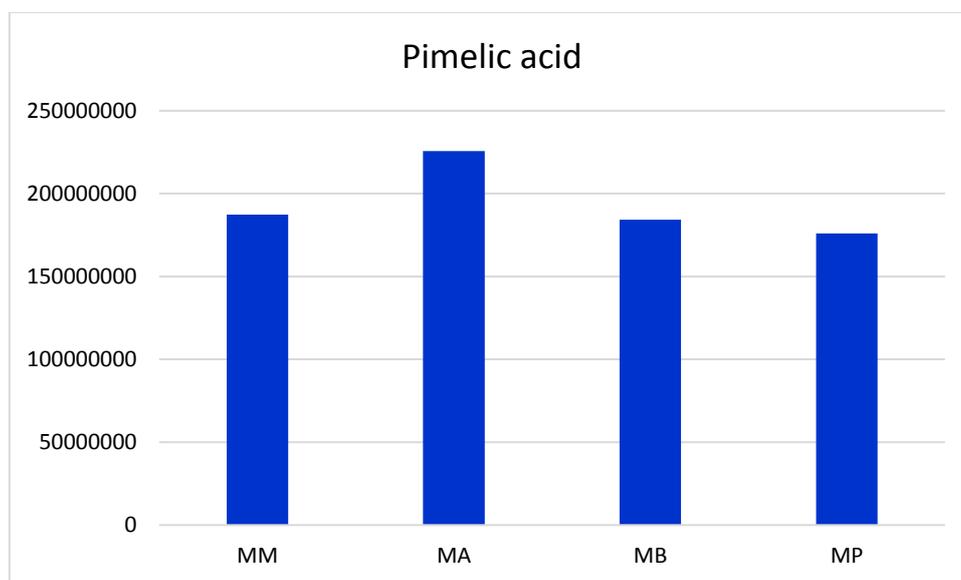


Figura 37: Aree dei picchi di pimelic acid nei campioni di miele

Mevalonic acid

Mevalonic acid, formula chimica $C_6H_{12}O_4$, è un acido organico che rappresenta un importante intermedio del metabolismo vegetale per la sintesi di molti terpeni e carotenoidi.

Le piante in cui è contenuto l'acido mevalonico sono, ad esempio, *Arabidopsis thaliana*, *Asparagus officinalis*, *Matricaria recutita*, *Polygonum minus* e *Rosmarinus officinalis*.

Arabidopsis thaliana e *Polygonum minus* hanno una fioritura tardo estiva/autunnale, mentre *Asparagus officinalis*, *Matricaria recutita* e *Rosmarinus officinalis* fioriscono in primavera/estate.

L'acido mevalonico è presente in tutti i mieli, il contenuto maggiore è nel miele di acacia (MA), vedi figura 38.

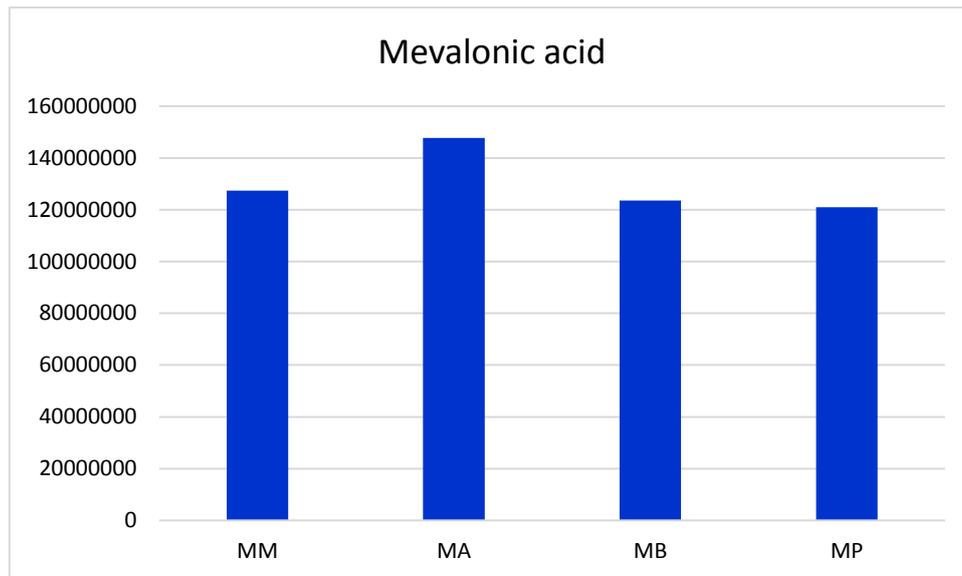


Figura 38: Aree dei picchi di mevalonic acid nei campioni di miele

Luteolin 7-O-rutinoside, luteolin 3'-methyl ether 7-arabinosyl-(1 → 2)-galactoside o luteolin 3'-methyl ether 7-apiosyl-(1 → 2)-glucoside

Luteolin 7-O-rutinoside, luteolin 3'-methyl ether 7-arabinosyl-(1 → 2) -galactoside e luteolin 3'-methyl ether 7-apiosyl-(1 → 2) -glucoside sono dei flavonoidi con formula chimica $C_{27}H_{30}O_{15}$.

Si trovano in *Capsella bursa-pastoris*, *Cynara scolymus* (carciofo), *Daucus carota*, *Mentha aquatica*, *Salix caprea*, *Apium graveolens*, *Petroselinum hortense*.

La fioritura di queste piante avviene principalmente nel periodo primaverile/estivo.

Il carciofo ha una fioritura che va dall'estate fino anche a ottobre e nei pressi del luogo in cui vengono prodotti questi mieli sono presenti importanti colture di carciofo.

I mieli millefiori primaverile MP, di barena MB e di acacia MA sono caratterizzati da aree maggiori di tale composto (Figura 39).

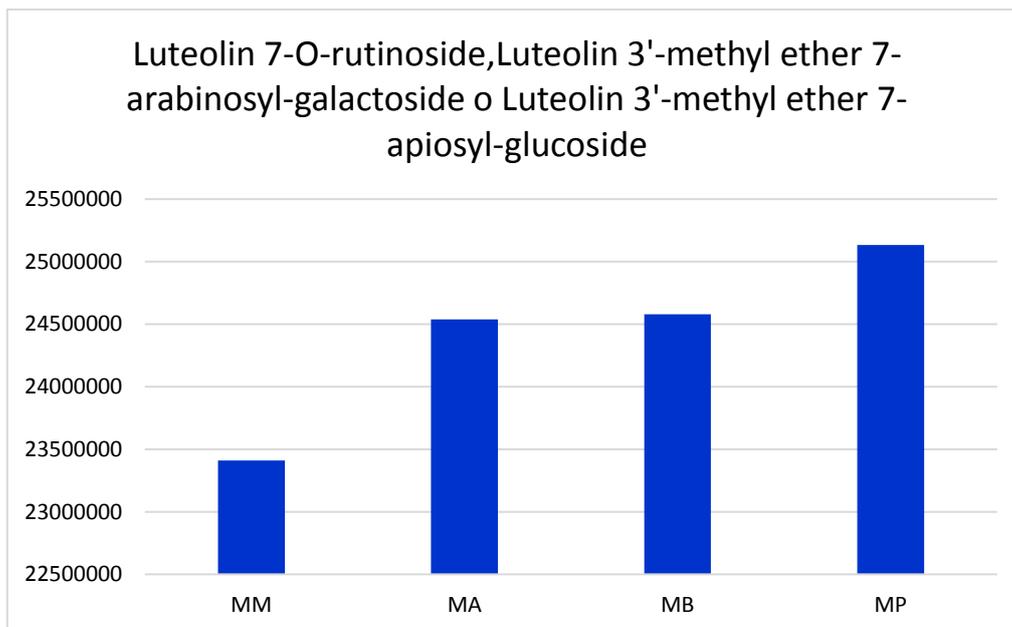


Figura 39: Aree dei picchi di Luteolin 7-O-rutinoside, Luteolin 3'-methyl ether 7-arabinosyl-galactoside o Luteolin 3'-methyl ether 7-apiosyl-glucoside nei campioni di miele

12. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi si proponeva di sviluppare una metodica per la caratterizzazione del miele dal punto di vista nutraceutico, individuando la presenza di sostanze con effetti benefici (in particolare flavonoidi) e per valutare la presenza di componenti che possono essere legate all'origine floreale tipiche della laguna di Venezia.

Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile selezionare il metodo preanalitico migliore ai fini dell'analisi. Il metodo prevede l'eluizione di 400 mg di miele, mediante l'utilizzo di cartucce SPE C18, con 5 mL di metanolo. Il metodo, pur non permettendo la quantificazione dei composti, ne ha permesso l'identificazione e ha consentito di valutare le differenze nella composizione dei mieli presi in considerazione. La quantificazione dei componenti nei vari mieli richiede il completamento della messa a punto del metodo che preveda di valutare i fattori di recupero attraverso materiale certificato o mediante standard marcati, la sua riproducibilità, l'accuratezza nelle misure quantitative per ottenere il confronto dei campioni di miele sulla base delle concentrazioni dei composti identificati.

Dall'analisi dei flavonoidi sui campioni di miele è stato osservato che naringenin e apigenin sono presenti in concentrazione più elevata, i risultati hanno pertanto messo in evidenza che di componenti che derivano da piante caratteristiche dell'ambiente lagunare, come *Limonium vulgare* e le specie del genere *Artemisia*.

Oltre ai flavonoidi, l'analisi metabolomica ha permesso l'identificazione di numerosi altri composti appartenenti a diverse classi di metaboliti secondari delle piante.

Loganin è il composto presente con aree maggiori, quindi si può ipotizzare in concentrazione maggiore, nei campioni di miele, seguito da 6-deoxylamioside, entrambi più abbondanti nel miele millefiori "primaverile". È stato identificato, inoltre, un composto (7,2'-Dihydroxy-6-methoxyisoflavone) che è presente nella *Salicornia europaea*, pianta alofita presente nella laguna veneta.

Il metodo utilizzato, quindi, si è dimostrato adeguato, permettendo di valutare il contenuto di flavonoidi e di identificare la presenza di numerose altre sostanze di interesse nutraceutico e legate all'origine botanica del miele. Pertanto, si può concludere che i mieli esaminati hanno una composizione abbastanza caratteristica che può conferire proprietà nutrizionali particolari. Tali risultati sono comunque da considerare preliminari ed andranno implementati attraverso l'analisi di un maggior numero di campioni di miele, anche provenienti da aree geografiche diverse, per consolidare i risultati qui ottenuti e permettere individuare dei composti marker delle varie tipologie di miele analizzate da utilizzare per garantire la loro origine.

13. RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero ringraziare tutte le persone, che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro di tesi.

Ringrazio il mio relatore prof. Capodaglio, che ha saputo guidarmi, con suggerimenti pratici, nella ricerca di laboratorio e nella stesura dell'elaborato.

Grazie alla mia tutor e correlatrice dott.ssa Elisa Scalabrin e al mio correlatore dott. Raffaello Tedesco per il supporto costante, le dritte indispensabili e la grande disponibilità.

Un ringraziamento particolare va all'azienda "Miele del Doge", alla proprietaria Mara La Rosa, e al dott. Marco Benedetti del Consorzio Interuniversitario Nazionale per le Scienze Ambientali (CINSA) per avermi dato la possibilità di svolgere il mio lavoro di tesi.

Alla mia famiglia e a tutte le persone che mi sono state accanto in questo percorso. Grazie, il vostro aiuto e il vostro amore mi hanno dato la forza di superare ogni difficoltà.

14. BIBLIOGRAFIA

- 74/409/CEE. (1974). Direttiva del Consiglio del 22 luglio 1974 Miele, relativa all'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri concernenti il miele. *Gazzetta Ufficiale Delle Comunità Europee*.
- Afanas'ev, I., Dorozhko, A., Brodskii, A., & Al., E. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*.
- Aguirre, L. ., Arias, N. ., Macarulla, M. T. ., Gracia, A. ., & Portillo, M. P. (2011). Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. *Open Nutraceuticals J*.
- Ahmadi, A., Hassandarvish, P., Lani, R., Yadollahi, P., Jokar, A., Bakar, S. A., & Zandi, K. (2016). Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. *RSC Advances*, 6(73), 69421–69430. <https://doi.org/10.1039/c6ra16640g>
- Al-Qassemi, R., & Robinson, R. K. (2003). Some special nutritional properties of honey – a brief review. *Nutrition & Food Science*. <https://doi.org/10.1108/00346650310507073>
- Alipieva, K., Kokubun, T., Taskova, R., Evstatieva, L., & Handjieva, N. (2007). LC-ESI-MS analysis of iridoid glucosides in *Lamium* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.07.004>
- Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2013). Honey as a Source of Dietary Antioxidants: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Human Chronic Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 621–638. <https://doi.org/10.2174/092986713804999358>
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparri, M., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Morroni, G., Simoni, S., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Giovanetti, E., & Battino, M. (2018). *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *Lwt*, 87, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.079>
- Aničić, N., Gašić, U., Lu, F., Ćirić, A., Ivanov, M., Jevtić, B., Dimitrijević, M., Anđelković, B., Skorić, M., Živković, J. N., Mao, Y., Liu, J., Tang, C., Soković, M., Ye, Y., & Mišić, D. (2021). Antimicrobial and immunomodulating activities of two endemic nepeta species and their major iridoids isolated from natural sources. *Pharmaceuticals*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/ph14050414>

- Araruna, M. K., Brito, S. A., Morais-Braga, M. F., Santos, K. K., Souza, T. M., Leite, T. R., Costa, J. G., & Coutinho, H. D. (2012). Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. *Indian J. Med. Res.*
- Asen, S., & Plimmer, J. R. (1972). 4,6,4'-Trihydroxyaurone and other flavonoids from *Limonium*. *Phytochemistry*, *11*(8), 2601–2603. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88547-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88547-7)
- Balkanska, R., Stefanova, K., & Stoikova–Grigorova, R. (2020). Main honey botanical components and techniques for identification: a review. *Journal of Apicultural Research*, *59*(5), 852–861. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1765481>
- Bernard, F. X., Sablé, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J. F., Crouzet, J., & Blanche, F. (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(5), 992–998. <https://doi.org/10.1128/aac.41.5.992>
- Boeckler, G. A., Gershenzon, J., & Unsicker, S. B. (2011). Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry*, *72*(13), 1497–1509. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.038>
- Bujor, A., Miron, A., Luca, S. V., Skalicka-Wozniak, K., Sillion, M., Ancuceanu, R., Dinu, M., Girard, C., Demougeot, C., & Totoson, P. (2019). Metabolite profiling, arginase inhibition and vasorelaxant activity of *Cornus mas*, *Sorbus aucuparia* and *Viburnum opulus* fruit extracts. *Food and Chemical Toxicology*, *133*(August), 110764. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110764>
- Cabras, P., & Martelli, A. (2015). *Chimica degli alimenti* (Piccin (ed.)).
- De Vos, R. C. H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J. B., Bino, R. J., & Hall, R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, *2*(4), 778–791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.95>
- Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological Research*, *99*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002>
- Dias, A. L. S., Rozet, E., Larondelle, Y., Hubert, P., Rogez, H., & Quetin-Leclercq, J. (2013). Development and validation of an UHPLC-LTQ-Orbitrap MS method for non-anthocyanin flavonoids quantification in *Euterpe oleracea* juice. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*(28), 9235–9249. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7325-z>

- Dickson, L., Tenon, M., Svilar, L., Faça-Berthon, P., Martin, J. C., Rogez, H., & Vaillant, F. (2020). Genipap (*Genipa americana* L.) juice intake biomarkers after medium-term consumption. *Food Research International*, *137*(January), 109375. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109375>
- Donna. (2012). LTQ Orbitrap XL混合线性离子阱质谱仪对绿茶和红茶提取物的代谢组学分析. *中国食品*, *22*, 82–85. <http://lib.cqvip.com/qk/44140303.html>
- Drescher, N., Klein, A. M., Schmitt, T., & Leonhardt, S. D. (2019). A clue on bee glue: New insight into the sources and factors driving resin intake in honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, *14*(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210594>
- Dubey, S., Ganeshpurkar, A., Bansal, D., & Dubey, N. (2013). Experimental studies on bioactive potential of rutin. *Chron. Young Sci.*
- Dunn, W. B., Erban, A., Weber, R. J. M., Creek, D. J., Brown, M., Breitling, R., Hankemeier, T., Goodacre, R., Neumann, S., Kopka, J., & Viant, M. R. (2013). Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, *9*(SUPPL.1), 44–66. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>
- E, M., & G., D. (1985). Naturally occurring flavonoids and human basophil histamine release. *Int Arch Allergy Appl Immun.*
- Emad, A. M., Rasheed, D. M., El-kased, R. F., & El-kersh, D. M. (2022). (*Apium graveolens* L., *Apiaceae*) *Aerial Parts via*. 1–19.
- Erben-Russ, M., Bors, W., & Saran, M. (1987). Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*
- FAO, & WHO. (1981). *Codex alimentarius: Standards for honey*.
- Ferracane, R., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V., & Ritieni, A. (2010). Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.018>
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., & Al., E. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.*

- Fiehn, O. (2002). Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), 155–171.
- Frabasile, S., Koishi, A. C., Kuczera, D., Silveira, G. F., Verri, W. A., Dos Santos, C. N. D., & Bordignon, J. (2017). The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. *Scientific Reports*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep41864>
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025>
- Gašić, U. M., Natić, M. M., Mišić, D. M., Lušić, D. V., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., & Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.08.008>
- Guiso, M., & Martino, C. (1981). *FROM LAMIUM*. 1981–1984.
- Jeandet, P. (2015). Phytoalexins: Current progress and future prospects. *Molecules*, 20(2), 2770–2774. <https://doi.org/10.3390/molecules20022770>
- Karim, N., Jia, Z., Zheng, X., Cui, S., & Chen, W. (2018). A recent review of citrus flavanone naringenin on metabolic diseases and its potential sources for high yield-production. *Trends in Food Science and Technology*, 79(June), 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.012>
- Kashyap, D., Sharma, A., Tuli, H. S., Sak, K., Garg, V. K., Buttar, H. S., Setzer, W. N., & Sethi, G. (2018). Apigenin: A natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function. *Journal of Functional Foods*, 48(April), 457–471. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.037>
- Ke, J. Y., Banh, T., Hsiao, Y. H., Cole, R. M., Straka, S. R., Yee, L. D., & Belury, M. A. (2017). Citrus flavonoid naringenin reduces mammary tumor cell viability, adipose mass, and adipose inflammation in obese ovariectomized mice. *Molecular Nutrition Food Research*.
- Kisiel, W., & Barszcz, B. (2000). Further sesquiterpenoids and phenolics from *Taraxacum officinale*. *Fitoterapia*, 71(3), 269–273. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00158-6)
- Koulis, G. A., Tsagkaris, A. S., Aalizadeh, R., Dasenaki, M. E., Panagopoulou, E. I., Drivelos, S., Halagarda, M., Georgiou, C. A., Proestos, C., & Thomaidis, N. S. (2021). Honey phenolic compound profiling and authenticity assessment using hrms targeted and untargeted metabolomics. *Molecules*, 26(9), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules26092769>

- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
- Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL*, 2(2), 22–37. <https://doi.org/10.4314/ijmu.v2i2.39851>
- Lee, H. S., Cho, H. J., Yu, R., Lee, K. W., Chun, H. S., & Park, J. H. Y. (2014). Mechanisms underlying apoptosis-inducing effects of kaempferol in HT-29 human colon cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2722–2737.
<https://doi.org/10.3390/ijms15022722>
- Legge 753/1982. (1982). Legge 753, 12 Ottobre 1982, Recepimento della direttiva del Consiglio della Comunità economica europea 74/409/EEC riguardante l'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri della C.E.E. concernenti il miele. *Gazzetta Ufficiale*.
- Makarov, A., & Scigelova, M. (2010). Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 3938–3945.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.022>
- Makawi, S. Z. A., Gadkariem, E. A., & Ayoub, S. M. H. (2009). Determination of antioxidant flavonoids in sudanese honey samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *E-Journal of Chemistry*, 6(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1155/2009/382504>
- McAlister, G. C., Berggren, W. T. T., Griep-Raming, J., Horning, S., Makarov, A., Phanstiel, D., Stafford, G., Swaney, D. L., Syka, J. E. P., Zabrouskov, V., & Coon, J. J. (2008). *J. Proteome Res.*
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.001>
- Moco, S., Bino, R. J., De Vos, R. C. H., & Vervoort, J. (2007). Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(9), 855–866.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.08.003>
- Montoro, P., D'urso, G., Kowalczyk, A., & Tuberoso, C. I. G. (2021). Lc-esi/ltq-orbitrap-ms based metabolomics in evaluation of bitter taste of arbutus unedo honey. *Molecules*, 26(9), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/molecules26092765>

- Nambara, E. (2017). Plant Physiology and Development. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*.
- Nešović, M., Gašić, U., Tosti, T., Horvacki, N., Šikoparija, B., Nedić, N., Blagojević, S., Ignjatović, L., & Tešić, Ž. (2020). Polyphenol profile of buckwheat honey, nectar and pollen: Polyphenolics in buckwheat. *Royal Society Open Science*, 7(12), 1–15.
<https://doi.org/10.1098/rsos.201576>
- Olsen, J. V., Godoy, L. M. de, G. Li, B. M., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., & Mann, M. (2010). *Mol. Cell. Proteomics*.
- Olsen, J. V., Macek, B., Lange, O., Makarov, A., Horning, S., & Mann, M. (2007). *Nat. Methods*.
- Ostrakhovitch, E. A., & Afanas'ev, I. B. (2001). Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: Suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochemical Pharmacology*, 62(6), 743–746. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00707-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00707-9)
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Pascual-Maté, A., Osés, S. M., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2018). Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures. *Separation and Purification Reviews*, 47(2), 142–158. <https://doi.org/10.1080/15422119.2017.1354025>
- Phenomenex. (2017). The Complete Guide to Solid Phase Extraction (SPE): A method development and application guide. *Phenomenex*, 1–15.
- Pimentel, R. B., da Costa, C. A., Albuquerque, P. M., & Junior, S. D. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. *BMC Complement. Altern. Med.*
- Pinho-Ribeiro, F. A., Zarpelon, A. C., Fattori, V., Manchope, M. F., Mizokami, S.S. Casagrande, R., & Verri, W.A., J. (2016). Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology*.
- Qi, Y., Li, S., Pi, Z., Song, F., Lin, N., Liu, S., & Liu, Z. (2014). Chemical profiling of Wu-tou decoction by UPLC-Q-TOF-MS. *Talanta*, 118, 21–29.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.054>

- Rasul, A., Millimouno, F. M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J., & Li, X. (2013). Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/379850>
- Rizzato, G., Scalabrin, E., Radaelli, M., Capodaglio, G., & Piccolo, O. (2017). A new exploration of licorice metabolome. *Food Chemistry*, 221, 959–968. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.068>
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., & Martins, N. (2019). The therapeutic potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>
- Scalabrin, E., Radaelli, M., & Capodaglio, G. (2020). Effects of water deficit and heat stress on nicotiana langsdorffii metabolomic pattern modified by insertion of rold gene from agrobacterium rhizogenes. *Metabolites*, 10(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/metabo10080310>
- Scalabrin, E., Radaelli, M., Rizzato, G., Bogani, P., Buiatti, M., Gambaro, A., & Capodaglio, G. (2015). Metabolomic analysis of wild and transgenic Nicotiana langsdorffii plants exposed to abiotic stresses: Unraveling metabolic responses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(21), 6357–6368. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8770-7>
- Schievano, E., Morelato, E., Facchin, C., & Mammi, S. (2013). Characterization of markers of botanical origin and other compounds extracted from unifloral honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1747–1755. <https://doi.org/10.1021/jf302798d>
- Seraglio, S. K. T., Valese, A. C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M. S., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2016). Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. *Food Research International*, 87, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.019>
- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Vergara, C. V., Kitic, D., Kostic, M., Armstrong, L., Shinwari, Z. K., Khalil, A. T., Brdar-Jokanović, M., Ljevnaić-Mašić, B., Varoni, E. M., Iriti, M., Leyva-Gómez, G., Herrera-Bravo, J., Salazar, L. A., & Cho, W. C. (2021). Genus Viburnum: Therapeutic Potentialities and Agro-Food-Pharma Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3095514>
- Shyur, L.-F., & Yang, N.-S. (2008). Metabolomics for phytomedicine research and drug

development. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 66–71.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.032>

- Silva, L. M. P., Alves, J. S. F., Da Silva Siqueira, E. M., De Souza Neto, M. A., Abreu, L. S., Tavares, J. F., Porto, D. L., De Santis Ferreira, L., Demarque, D. P., Lopes, N. P., Aragão, C. F. S., & Zucolotto, S. M. (2018). Isolation and identification of the five novel flavonoids from *genipa americana* leaves. *Molecules*, 23(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules23102521>
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3(3), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Abaza, L., Iswaldi, I., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., & Segura-Carretero, A. (2015). LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochemical Analysis*, 26(5), 320–330. <https://doi.org/10.1002/pca.2566>
- Termentzi, A., Skaltsounis, A. L., & Bioactive, O. O. (2021). *Elenolic Acid From Drupes to Olive Oil : An Explo- ration of Olive Key Metabolites*.
- Thermo Fisher Scientific. (2011). LTQ Series Hardware Manual. *ReVision*, May.
- Thissen, U., Coulier, L., Overkamp, K. M., Jetten, J., van der Werff, B. J. C., van de Ven, T., & van der Werf, M. J. (2011). A proper metabolomics strategy supports efficient food quality improvement: A case study on tomato sensory properties. *Food Quality and Preference*, 22(6), 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.12.001>
- Trener, V. C., & Rochfort, S. J. (2010). Natural Products Research and Metabolomics. In L. Mander & H.-W. (Ben) Liu (Eds.). *Comprehensive Natural Products II, Modern Methods in Natural Products Chemistry*, Elsevier, 595–628.
- Wang, Q., Yang, J., Zhang, X. M., Zhou, L., Liao, X. L., & Yang, B. (2015). Practical synthesis of naringenin. *Journal of Chemical Research*, 39(8), 455–457. <https://doi.org/10.3184/174751915X14379994045537>
- Xu, M., Deng, Y., Huang, R., He, Q., & Sun, C. (2019). Rapid characterization of compounds in fupog granules by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 176, 112819.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112819>

Zhou, J., Yao, L., Li, Y., Chen, L., Wu, L., & Zhao, J. (2014). Floral classification of honey using liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry and chemometric analysis. *Food Chemistry*, *145*, 941–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.117>

15. SITOGRAFIA

<https://en.wikipedia.org/wiki/Apigenin>

<https://www.medchemexpress.com/Naringenin.html>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Rutin>

<https://www.medchemexpress.com/Quercetin.html>

www.googleearth.com

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat106202-oasis-hlb-6-cc-vac-cartridge-200-mg-sorbent-per-cartridge-30--m-.html>

<https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X%2C%20Polymeric%20Reversed%20Phase?returnURL=/Products/Search/SPE>

https://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055

https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process_fig31_225050758

https://www.researchgate.net/figure/The-Orbitrap-FT-mass-analyzer-In-the-Orbitrap-ions-oscillate-around-a-central_fig9_306542804

<https://www.freeforumzone.com/mobile/d/9164430/spettri-di-massa/discussione.aspx>

16. APPENDICE I

Procedimento Saggio di Fehling

Reattivo di Fehling A (per 100mL):

- solubilizzare 7 g di solfato rameico pentaidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in acqua e portare a volume in un matraccio da 100 ml

Reattivo di Fehling B (per 100mL):

- solubilizzare 35 g di tartrato di sodio e potassio [$\text{KNa}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2)$] e 10 g di idrossido di sodio (NaOH) in acqua e portare a volume in un matraccio da 100 ml

Procedimento:

- Introdurre in una provetta 2,5 ml di soluzione Fehling A e 2,5 ml di soluzione Fehling B
- Aggiungere 1 ml di campione
- Riscaldare a bagnomaria

Il saggio è positivo se c'è formazione di un precipitato rosso mattone di ossido rameoso (Cu_2O).

Saggio di Fehling dopo idrolisi di carboidrati (saccarosio) per via acida

Reattivi:

HCl acquoso 10%

NaOH acquoso 10%

Procedimento:

- Introdurre in una provetta 1 ml di campione
- Aggiungere 1 ml di HCl 10%
- Riscaldare a bagnomaria per almeno 30 minuti
- Dopo riscaldamento raffreddare la soluzione e neutralizzare con 1 ml NaOH 10% (verificare il pH con una cartina tornasole)
- Sulla soluzione a pH neutro effettuare il saggio di Fehling

17. APPENDICE II

Aree dei picchi relative ai flavonoidi standard aggiunti ai campioni di sciroppo di glucosio e fruttosio

Campione	Apigenin	Naringenin	Rutin	Kaempferol	Quercetin
S2	0	5917564	9573957	0	0
S3	6896162	9454037	9341106	694755	0
S4	732708	21737853	10769253	0	0
S5	2550653	7983274	11997692	3079133	0
S7	978013	8362343	17606765	0	0
S8	5392719	11748067	23200927	16051926	233315

18. APPENDICE III

Composti identificati in negativo:

RT	Massa	Formula molecolare	Composto ipotetico	Classe	Errore massa (ppm)	Frammenti	ID level
24,31	269,04526	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenin	Flavonoid	-1,066		1
23,39	271,06076	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Naringenin/ Pinobanksin	Flavonoid	-1,611	253, 225, 197, 151 / MS2 225, 209, 181 / MS3 197, 181, 157	1/2
17,68	609,1452	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutin	Flavonoid	-0,390		1
24,20	285,03995	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	Flavonoid	-1,794		1
19,00	301,03482	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetin	Flavonoid	-1,847		1
24,61	267,06592	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	Formonetin	Flavonoid	-1,581		3
26,45	247,09717	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	Prenyl caffeate	Cinnamic acid derivative	-1,668		3
20,08	431,09775	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Apigenin 8-C-hexoside (vitexin)/ Kaempferol 3-O- rhamnoside	Flavone glycoside	-1,438		3
27,92	283,06079	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Genkwanin/ Acacetin/ 7,2'-dihydroxy-6- methoxyisoflavone	Flavonoid	-1,437		3
27,40	253,05035	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Chrysin	Flavonoid	-1,115	209, 211, 207, 210	2
21,75	285,07635	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	Pinobanksin 5-methyl ether	Flavonoid	-1,743	267, 239, 252, 268 / MS2 252, 224, 239	2
26,93	255,06598	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocembrin	Flavonoid	-1,185	213, 211, 151, 187 / MS2 185, 169, 145	2
18,96	241,07249	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	Elenolic acid	Organic acid	3,022	198, 195	2
18,21	363,16550	C ₁₆ H ₂₈ O ₉	Adenosmoside	Iridoid	-1,530		3
23,14	363,14520	C ₁₉ H ₂₄ O ₇	Gibberellin A8	Tetracyclic diterpenoid	0,754	242, 241, 295 / MS2 198, 129	2
14,97	357,11856	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	Brasoside/Isosweroside/ Sweroside/ Gardaloside/ Synargentolide D/	Iridoid	-1,527		3

10-deoxygeniposidic acid							
21,21	263,12854	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	2-cis,4-trans Abscisic acid	Sesquiterpene	-1,301	153 , 219	2
20,41	199,09741	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	Camphoric acid/ 2-Hydroxycampholonic acid	Organic acid	-0,865	155 , 137	2
21,84	201,11305	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	Sebacic acid	Organic acid	-0,907	139 , 156	2
13,91	181,05058	C ₉ H ₁₀ O ₄	2',6'-Dihydroxy-4'-methoxyacetophenone/ Syringaldehyde	Benzoic acid derivative	-0,288		3
14,34	181,08691	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	dihydroconiferyl alcohol/ erythro-Anethole glycol/Mephenesin	Phenol	-0,594	163 , 123	2
17,29	463,14502	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₃	Phlorigidoside A	Iridoid glucoside	-1,498		3
13,14	315,10797	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	Vanilloside/ 3,4-Dihydroxyphenethyl glucoside/ Cornoside/ 3,5-Dihydroxyphenethyl alcohol 3-O-beta-glucopyranoside	Phenolic glycoside	-1,811		3
23,44	313,12729	C ₁₅ H ₂₂ O ₇	Viridoside/ Monovalerianester A	Phenolic glycoside	-6,343		3
14,13	343,13919	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	dihydroconiferin	Phenolic glycoside	-1,897		3
18,30	347,17087	C ₁₆ H ₂₈ O ₈	Rhodioloside A/ Nepetariaside	Iridoid glycoside	-0,781		3
14,84	387,12927	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	Geniposide/ Secologanin/Cornin/ dehydrologanin/ Arborescoside/ Majoroside	Iridoid glycoside	-1,033		3
17,08	403,16037	C ₁₈ H ₂₈ O ₁₀	6-deoxylamioside	Iridoid glycoside	-1,489	357 , 195, 161, 285	2
19,38	345,15497	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	Decapetaloside/ Nepetaside/ Villoside/Aucubin	Iridoid glycoside	-1,509		3
14,28	161,04556	C ₆ H ₁₀ O ₅	Levoglucosan	dehydrated glucose	0,083		3
14,55	549,18219	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	Genipin gentiobioside	Terpene glycoside	-0,552		3
15,96	519,20789	C ₂₃ H ₃₆ O ₁₃	Isosuspensolide E	Iridoid glucoside	-0,817	323 , 341	2
14,54	553,21124	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₀	Lappaol C	Polyphenol	6,001	507 , 505	2
17,51	357,15491	C ₁₇ H ₂₆ O ₈	Loliolide beta D glucopiranoside	Terpene glucoside	-1,627	195 , 237	2

14,59	389,14474	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	Loganin	Iridoid glycoside	-1,491	343 , 181, 161, 271, 253	2
14,38	505,19254	C ₂₂ H ₃₄ O ₁₃	Carthamoside B4	Phenolic glycoside	-0,246	323 , 341 / MS2 149 , 280	2
17,46	361,14981	C ₁₆ H ₂₆ O ₉	5-deoxylamiol / Suspensoside A / Gibboside	Iridoid glucoside	-1,649	199 , 301 / MS2 155	2
15,48	341,12393	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	Coniferin/ Bidenoside D/ Bidensyneoside C/ Pectinolide D/ Myzodendrone/ Citrusin D/ Sphalleroside A	Phenolic glycoside	-0,765		3
28,07	269,12064	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	4-Hydrocinnamoyl- 2,2,5-trimethyl-4- cyclopentene-1,3-dione/ Neocryptotanshinone II	Terpene	8,629		3
24,66	299,05588	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Chrysoeriol/Hispidulin	Flavonoid	-0,774		3
16,43	275,10562	C ₁₉ H ₁₆ O ₂	(1E,6E) -1,7-Diphenyl- 1,6-heptadiene-3,5-dione	Polyphenol	-7,754		3
15,73	461,16632	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	Decaffeoylverbascoside/ Forsythoside E	Phenyl ethanoid glycoside	-0,281		3
35,62	537,14349	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₁	5-Methoxyxanthocercin A	Flavonoid	6,060		3
14,63	223,09752	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	Isoacoramone	Alkyl- phenylketone	-0,279		3
14,54	521,18738	C ₂₂ H ₃₄ O ₁₄	Plicatoside A/Plicatoside B/ 1-O-Hexosyl- epideoxyloganic acid	Iridoid glycoside	-0,381		3
17,84	533,18726	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₄	Syringin-4-O-beta- glucoside	Phenolic glycoside	-0,598		3
14,38	541,16937	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₁	Ikarisoside D	Flavonol	-4,000		3

				glycoside			
14,15	507,16776	C ₂₈ H ₂₈ O ₉	4,7- Didehydroneophysalin B	Physalin	3,361	323, 341	2
17,99	195,10257	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	Loliolide	Terpene	-0,501	163, 177	2
35,60	475,17535	C ₂₈ H ₂₈ O ₇	Chushizisin I	Polyphenol	-1,844	407, 339	2
17,55	471,14584	C ₂₈ H ₂₄ O ₇	Tricuspidatol A	Terpene	1,939		3
26,80	283,09750	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	Phenetyl caffeate/ Isoliquiritigenin 4,4'- dimethyl ether/ Flavokawin B/ (-)-Homopterocarpin/ Mollugin	Phenol	-0,291		3
23,10	345,17044	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	Gibberellin A24/ Gibberellin A44/ Ballotinone/Epirosmanol	Terpene	-0,890		3
13,91	507,20825	C ₂₂ H ₃₆ O ₁₃	6-O-Oleuropeoylsucrose	Fatty acid	-0,127		3
17,77	163,04007	C ₉ H ₈ O ₃	p-Coumaric acid	Phenolic acid	0,016		3
23,69	269,08176	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	Hesperetin, Homoeriodictyol/ 4,2',4',6'-Tetrahydroxy-3- methoxychalcone/ 1-Hydroxy-3,5,8- trimethoxyxanthone/ Decussatin/Poric acid A	Flavonoid	-0,640		3
22,39	289,10803	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	Omphamurin	Phenol	-0,404		3
25,08	329,06641	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Cirsiliol/ Desmethoxysudachitin/ Thymusin/Jaceosidin/ Iristectorigenin A / Iristectorigenin B/Tricin	Flavonoid glycoside	-0,808		3
25,03	315,05075	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	8-methylherbacetin / Eupafolin / 6-Hydroxyluteolin 6-methyl ether / 6-Methoxykaempferol / Azaleatin	Flavonoid	-0,876		3
17,58	237,11317	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	1-Allyl-2,3,4,5-	Benzene triol	-0,263		3

tetramethoxybenzene							
14,64	165,05573	C ₉ H ₁₀ O ₃	Acetovanillone/Paeonol/ Melilotic acid/ Caffeyl alcohol/ p-Hydroxyphenyl acetic acid methyl ester/ Tropic acid/Methyl vanillin/Phenyllactic acid	Phenolic compound	0,076		3
21,52	335,11328	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	Isoapressin / Avicennone B	Phenolic compound	-1,033		3
17,17	267,12363	C ₁₄ H ₂₀ O ₅	Teucrein / Pectinolide B o C	Phenolic compound	-0,625		3

Composti identificati in positivo:

RT	Massa	Formula molecolare	Composto ipotetico	Classe	Errore massa (ppm)	Frammenti	ID level
14,17	309,13309	C ₁₆ H ₂₀ O ₆	Mexoticin/ Isomexoticin	Phenol	-0,566	147 , 291, 165	2
15,75	327,14307	C ₁₆ H ₂₂ O ₇	Eugenol beta-D- glucopyranoside/ Vimalin/ Bidensyoeside A1/ Leptin G/ Chavibetol glucoside	Phenolic glucoside	-2,322	165 , 309, 137 / MS2 (309) 147, 165, 291	2
14,55	531,20105	C ₃₁ H ₃₀ O ₈	Eriosemaone C	Flavonoid	-0,554	347 , 305 / MS2 259, 203, 329 / MS3 245 , 275	2
14,40	529,18561	C ₃₁ H ₂₈ O ₈	Palodesagretin I/II	Polyphenol	-0,159	347, 367, 305 / MS2 203, 259, 329/ MS3 349/ MS4 245	2
15,73	233,08034	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	6-Hydroxymusizin/ 5-Acetyl-7-hydroxy- 2-methylchromone/ Dihydrocoriandrin	Phenol	-2,125	212 , 221 / MS2 183 , 192, 203, 165	2
14,28	265,09131	C ₁₀ H ₁₆ O ₈	Kinsenoside	Phenolic glycoside	-1,825	305 , 165 / MS2 245 , 263	2

16,23	437,23279	C ₂₇ H ₃₂ O ₅	Kanzonol I/ Lespedezaflavanone F/G	Flavonoid	1,234	138, 348, 310	2
16,48	543,20135	C ₃₂ H ₃₀ O ₈	2',7-Dihydroxy-4'- methoxy-4-[2',7- dihydroxy-4'- methoxyisoflavan-5'- yl] isoflavan/ Vestitol/Parvistemin C	Flavonoid	0,010	305, 525 / MS2 245 / MS3 329	2
14,51	471,18738	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₁	13-O- Methylvernojalcanolide 8-O-acetate	Terpene	2,742	309	2
17,58	341,15878	C ₁₇ H ₂₄ O ₇	8-(Acetyloxy) octahydro-6,9- dihydroxy-3- (hydroxymethyl)-5a,9- dimethylnaphtho[1,2- b]furan-2(4H)-one	Polyphenol	-2,051	179, 197, 165	2
17,75	303,10157	C ₂₀ H ₁₄ O ₃	4'-O-methylirenonolone	Polyphenol	0,591	262, 280	2
21,32	161,05923	C ₁₀ H ₈ O ₂	Viburtinal	Aryl- aldehyde	-2,956	141, 150	2
21,99	317,11636	C ₂₁ H ₁₆ O ₃	2,6-Dimethoxy-9- phenyl-1H-phenalen-1- one	Phytoalexin	-2,715	276, 294	2
47,00	137,08096	C ₅ H ₁₂ O ₄	2-C-Methyl-D- erythritol/ 2-Deoxy-D-ribitol	Sugar alcohol	0,909	95, 110	2
49,45	179,09140	C ₇ H ₁₄ O ₅	Digitalose	Sugar	-0,083	137 / MS2 95, 110	2
51,71	163,09660	C ₇ H ₁₄ O ₄	Oleandrose	Sugar	0,702	122, 81	2
56,30	161,08092	C ₇ H ₁₂ O ₄	Pimelic acid	Organic acid	0,525	120, 121, 143, 134	2
15,83	403,19522	C ₁₉ H ₃₀ O ₉	Spionoside B/ Arachiside A	Phenol	-2,577	241, 223, 205	2
16,13	361,11304	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	Glucosyringic acid	Organic acid	0,323	345, 179	2
16,99	241,14278	C ₁₃ H ₂₀ O ₄	Cucumegastigmane I/ Drummondol	Phenol	-2,719	137, 223	2
17,64	148,05211	C ₉ H ₈ O ₂	Cinnamic acid	Organic acid	1,546	128, 119	2
47,00	149,08113	C ₆ H ₁₂ O ₄	Mevalonic acid	Organic acid	1,976	108	2
35,88	595,16449	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Luteolin 7-O- rutinoside/ Luteolin 3'-methyl ether 7-arabinosyl- galactoside/ Luteolin 3'-methyl ether 7-apiosyl- glucoside	Flavonoid	-2,111		3

19. APPENDICE IV

Aree dei picchi dei composti ricercati in negativo

Composto ipotetico	Aree dei picchi				
	MM2	MA3	MB3	MP1	M9
Apigenin	3220149	4370250	13030472	4753235	26436765
Naringenin/ Pinobanksin	46624984	47433677	68957814	60716361	273929251
Rutin	243445	578671	392143	0	1179434
Kaempferol	265763	535906	1013338	0	4367066
Quercetin	757017	0	1668461	0	0
Formonetin	391695	499721	723723	357001	1735947
Prenyl caffeate	1436873	5112325	2816043	3731371	0
Apigenin 8-C-hexoside (vitexin)/ Kaempferol 3-O-rhamnoside	1359807	3103209	791541	1544231	1394203
Genkwanin/ Acacetin/ 7,2'-Dihydroxy-6- methoxyisoflavone	2653473	3510315	5767592	3529299	8451756
Chrysin	25814957	34176720	55043984	33333801	97839778
Pinobanksin 5-methyl ether	16867856	18104966	25348224	17870209	107940978
Pinocembrin	20299185	24319942	40773302	25900421	119865703
Elenolic acid	47694375	34956357	127595111	18246400	6694441
Adenosmoside	20839975	32370685	23038418	18940964	30891603
Gibberellin A8	5215959	22084047	4067780	8700504	0
Brasoside/Isosweroside/ Sweroside/Gardaloside/ Synargentolide D/ 10-deoxygeniposidic acid	1921176	8983927	873787	3875421	0
2-cis,4-trans Abscisic acid	15199907	32904196	11518678	24145787	16542611
Camphoric acid/ 2-Hydroxycampholonic acid	39958157	58384725	41823450	42864553	52547089
Sebacic acid	12725990	20857985	13160284	14323322	16889686
2',6'-Dihydroxy-4'- methoxyacetophenone/ Syringaldehyde	0	4557632	0	671288	0
dihydroconiferyl alcohol/ erythro-Anethole glycol/Mephenesin	54035209	35798012	18221451	119107958	38293505
Phlorigidoside A	1798166	16359636	1138723	363711	0
Vanillolloside/ 3,4-Dihydroxyphenethyl glucoside/ Cornoside/ 3,5-Dihydroxyphenethyl alcohol 3-O-beta- glucopyranoside	1490350	20172952	708552	3758284	1235456

Viridoside/Monovalerianester A	0	3276972	0	1224512	0
dihydroconiferin	69793063	38461200	26812044	125627255	48892010
Rhodiolide A/Nepetariaside	5325870	6282241	4873643	7548762	12507327
Geniposide/Secologanin/ Cornin/ dehydrologanin/ Arborescoside/Majoroside	25612099	11659055	18951577	34401067	17550270
6-deoxylamioside	78578050	124149926	20246825	263368411	234460522
Decapetaloside/ Nepetaside/ Villoside/Aucubin	9066625	7063218	5749423	13258857	20737096
Levoglucozan	18610982	18058643	6870729	42177130	26577638
Genipin gentiobioside	58947901	32229234	52838445	73730841	13225537
Isosuspensolide E	26315750	52780194	7193724	93515033	38381106
Lappaol C	121096471	94835339	57656933	246029919	56834735
Loliolide beta D glucopiranoside	15209952	22155189	3593991	51679840	41350728
Loganin	319728051	225963663	110761872	602646043	274601621
Carthamoside B4	83457473	45365951	78427779	126539947	18432828
5-deoxylamiol / Suspensoside A / Gibboside	82931504	105373143	89157157	71012719	105615787
Coniferin/Bidenoside D/ Bidensyneoside C/Pectinolide D/ Myzodendrone/Citrusin D/ Sphalleroside A	10115056	2661620	8906113	12316234	5292919
7,2'-Dihydroxy-6- methoxyisoflavone	2641551	3524074	5726796	3496274	8390091
4-Hydrocinnamoyl-2,2,5- trimethyl- 4-cyclopentene-1,3-dione/ Neocryptotanshinone II	3143027	3029467	3142360	3041756	3002434
Chrysoeriol/Hispidulin	763064	952174	1950570	938739	9019376
(1E,6E)-1,7-Diphenyl-1,6- heptadiene-3,5-dione	3070017	0	11855613	0	0
Decaffeoylverbascoside/ Forsythoside E	2107320	0	8069664	0	0
5-Methoxyxanthocercin A	2160404	0	256497	0	0
Isoacoramone	9542779	7219078	2856543	18692842	9200717
Plicatoside A / Plicatoside B / 1-O-Hexosyl- epideoxyloganic acid	5790533	4836704	1658743	12114810	0
Syringin-4-O-beta-glucoside	13211539	12725166	4280676	27585235	9563055
Ikarisoside D	17694960	14655630	6219915	37660848	5338530
4,7-Didehydroneophysalin B	23923792	0	80121872	0	529367
Loliolide	19552878	33498832	4119091	77356350	53199511
Chushizisin I	5141432	781916	783132	693229	724428

Tricuspidatol A	766805	1832781	0	5131899	4367238
Phenetyl caffeate/ Isoliquiritigenin 4,4'- dimethyl ether/ Flavokawin B/ (-)-Homopterocarpin/ Mollugin	0	3722070	386892	2781392	0
Gibberellin A24/ Gibberellin A44/Ballotinone/ Epirosmanol	511185	0	0	3250799	1085069
6-O-Oleuropeoylsucrose	5779635	3433477	2242206	11051075	8286872
p-Coumaric acid	1128112	604530	1131206	1539913	4299038
Hesperetin, Homoeriodictyol/ 4,2',4',6'-Tetrahydroxy-3- methoxychalcone/ 1-Hydroxy-3,5,8- trimethoxyxanthone/ Decussatin/Porric acid A	0	1602109	447182	1476310	3048959
Omphamurin	9783665	3753622	1792873	15239075	98221095
Cirsiliol/ Desmethoxysudachitin/ Thymusin/Jaceosidin/ Iristectorigenin A/ Iristectorigenin B/Tricin	2451638	3705310	6315945	3084470	25682829
8-methylherbacetin / Eupafolin/ 6-Hydroxyluteolin 6-methyl ether/ 6-Methoxykaempferol / Azaleatin	2190288	2929401	4192932	2331119	19956792
1-Allyl-2,3,4,5- tetramethoxybenzene	2149495	4631741	0	10334861	8717751
Acetovanillone/Paeonol/ Melilotic acid/ Caffeyl alcohol/ p-Hydroxyphenyl acetic acid methyl ester/ Tropic acid/Methyl vanillin/ Phenyllactic acid	1720158	3233844	2538425	2316805	8308735
Isoapressin / Avicennone B	889885	0	0	1653122	13628147
Teucrein / Pectinolide B o C	2758828	9412166	529630	10682459	6743681

Aree dei picchi dei composti ricercati in positivo

Composto ipotetico	Aree dei picchi				
	MM2	MA3	MB3	MP1	M9
Mexoticin/ Isomexoticin	41577753	32438011	13141498	104483897	38319278
Eugenol beta- D-glucopyranoside/ Vimalin/ Bidensyneoside A1/ Leptin G/ Chavibetol glucoside	66481125	47286349	20379500	153873747	55268464
Eriosemaone C	19244414	15489094	8306152	42226509	7194666
Palodesagretin I/II	248275997	207032580	119120801	430120578	92054923
6-Hydroxymusizin/ 5-Acetyl-7-hydroxy-2- methylchromone/ Dihydrocoriandrin	24592884	18080366	7121294	48465132	24828636
Kinsenoside	33966779	29731249	18601677	47014663	18410731
Kanzonol I/ Lespedezaflavanone F/ G	800914	894346	899124	921190	1162882
2',7-Dihydroxy-4'- methoxy-4-[2',7- dihydroxy-4'- methoxyisoflavan-5'- yl]isoflavan/ Vestitol/ Parvistemin C	32523910	75179156	8052824	141085596	44082185
13-O- Methylvernojalcanolide 8-O-acetate	11181218	9117048	3691553	30997424	8797011
8-(Acetyloxy) octahydro-6,9- dihydroxy-3- (hydroxymethyl)- 5a,9-dimethylnaphtho [1,2-b]furan-2(4H)-one	6353988	10439095	732202	27992141	17194995
4'-O-methylirenolone	3436681	2085034	1030662	7510537	1543539
Viburtinal	2942644	4409447	2727865	3832092	4269364
2,6-Dimethoxy- 9-phenyl-1H- phenalen-1-one	1292774	1192958	192909	5019197	1615645
2-C-Methyl- D-erythritol/ 2-Deoxy-D-ribitol	263971079	279320028	272369113	262937333	273205907
Digitalose	297311574	330396973	296399825	291400763	327734876
Oleandrose	225101838	295949194	217011071	210856886	290201949
Pimelic acid	187434310	225661225	184337852	175990608	219792530

Spionoside B/ Arachiside A	1836454	0	5065719	0	278934
Glucosyringic acid	1985101	3515035	315632	7016937	2442264
Cucumegastigmane I/ Drummondol	57465403	795640	145273104	0	4950528
Cinnamic acid	866008	774683	807512	536988	974459
Mevalonic acid	127349456	147735222	123526056	120970343	146517578
Luteolin 7-O-rutinoside/ Luteolin 3'-methyl ether 7-arabinosyl-galactoside/ Luteolin 3'-methyl ether 7-apiosyl-glucoside	23410856	24538828	24578421	25133304	23267862

20. APPENDICE V

Piante in cui si possono trovare i composti identificati

Composto ipotetico	Piante
Apigenin	Aechmea glomerata, Allium obliquum, Allium Sativum, Aloe, Anthemis altissima, Antirrhinum majus, Apium graveolens, Aquilegia ecalcarata, Asparagus officinalis, Bellis perennis, Betula nigra, Brassica oleracea, Chamomilla recutina, Daucus carota, Fumaria, Gnaphalium affine, Lactuca indica, Lychnis flos-cuculi, Medicago sativa, Mentha aquatica, Mentha pulegium, Mentha piperita, Nymphaea alba, Ocimum, Onopordium acanthium, Plantago argentea, Plantago holosteam, Plantago maritima, Punica granatum, Raphanus sativus, Rhodiola rosea, Rosmarinus officinalis, Salvia, Taraxacum officinale, Thymus, , Trifolium pratense, Verbena, Vicia faba, Limonium
Naringenin/Pinobanksin	Acacia dealbata, Allium Sativum, Aloe spp, Arabidopsis thaliana, Artemisia campestris ssp.maritima, Artemisia spp., Asparagus officinalis, Brassica oleracea, Broussonetia papyrifera, Dahlia spp, Daucus carota, Equisetum arvense, Glycine max, Linum tenuifolium, Magnolia denudata, Magnolia liliiflora, Medicago arabica, Medicago sativa, Medicago truncatula, Nymphaea spp, Origanum vulgare, Origanum majoricum, Petunia hybrida, Polygonum minus, Prunus avium, Prunus persica, Punica granatum, Raphanus sativus, Salix purpurea, Trifolium pratense, Trigonella foenum-graecum, Typha angustifolia, Verbena bipinnatifida, Vicia faba/Platanus vulgaris, Polygonum nodosum,

Populus deltoides, Tilia platyphyllos

Rutin

Achillea millefolium, Allium ascalonicum, Allium Sativum, Aloe vera, Artemisia annua, Asparagus officinalis, Bellis perennis, Boehmeria tricuspidata, Boehmeria holosericea, Bupleurum rotundifolium, Calendula officinalis, Campanula glomerata, Catharanthus roseus, Crataegus monogyna, Eupatorium microphyllum, Euphorbia virgata, Ficus carica, Ficus pumila, First Ruta graveolens, Fumaria capreolata, Fumaria officinalis, Fumaria schleicheri, Fumaria vaillantii, Houttuynia cordata, Humulus lupulus, Lactuca indica, Linum tenuifolium, Magnolia denudata, Magnolia liliiflora, Matricaria chamomilla, Medicago sativa, Medicago truncatula, Menyanthes trifoliata, Morus alba, Nerium oleander, Olea europaea, Pelargonium radula, Pelargonium reniforme, Plantago bellardii, Plantago holostium, Punica granatum, Rumex japonicus, Ruta graveolens, Salix songorica, Silphium perfoliatum, Solidago virgaurea, Stachys palustris, Styphnolobium japonicum, Syringa vulgaris, Tordylium apulum, Trifolium pratense, Tussilago farfara, Urtica dioica, Verbena bipinnatifida, Veronica spicata, Ziziphus jujuba

Kaempferol

Albizia chinensis, Allium ascalonicum, Allium obliquum, Aloe vera, Antirrhinum majus, Apocynum venetum, Arabidopsis thaliana, Artemisia annua, Asparagus officinalis, Brassicaceae, Brassica oleracea, Calluna vulgaris, Caltha palustris, Chenopodium murale, Equisetum hiemale, Euphorbia geniculata, Euphorbia lunulata, Euphorbia prostrata, Euphorbia virgata, Fumaria

capreolata, Fumaria officinalis, Fumaria
vaillantii, Humulus lupulus, Inula britannica,
Laurus nobilis, Lupinus albus, Magnolia
denudata, Magnolia liliiflora, Meconopsis
betonicifolia, Medicago arabica, Medicago
lupulina, Medicago truncatula, Myrica gale,
Nerium oleander, Nymphaea caerulea,
Nymphaea stellata, Origanum acutidens,
Origanum vulgare, Paeonia albiflora, Petunia
hybrida, Polygonum amphibium, Polygonum
aviculare, Polygonum convolvulus,
Polygonum hydropiper, Polygonum
lapathifolium, Polygonum mite, Polygonum
persicaria, Prunus avium, Prunus mahaleb,
Prunus persica, Rhamnus alaternus, Rhamnus
catharticus, Rhamnus saxatilis, Rhodiola rosea,
Rhododendron micranthum, Silphium
perfoliatum, Styphnolobium japonicum,
Trifolium pratense, Trigonella foenum-
graceum, Urtica dioica, Verbena bipinnatifida,
Verbena officinalis, Vicia faba

Quercetin

Albizia chinensis, Allium ascalonicum, Allium
cepa, Allium Sativum, Anethum graveolens,
Antirrhinum majus, Arabidopsis thaliana,
Artemisia vestita, Asparagus officinalis,
Calluna vulgaris, Caltha palustris, Ceratonia
siliqua, Fumaria capreolata, Fumaria
officinalis, Fumaria vaillantii, Houttuynia
cordata, Humulus lupulus, Linum tenuifolium,
Magnolia denudata, Magnolia liliiflora,
Matricaria recutita, Medicago arabica,
Medicago lupulina, Medicago sativa,
Medicago truncatula, Nerium oleander,
Nymphaea spp, Origanum spp, Pelargonium
reniforme, Pelargonium sidoides, Petunia
hybrida, Plantago holosteam, Polygonum
amphibium, Polygonum aviculare, Polygonum

	<p>convolvulus, Polygonum hydropiper, Polygonum lapathifolium, Polygonum mite, Polygonum persicaria, Prunus avium, Punica granatum, Raphanus sativus, Rhamnus saxatilis, Rhododendron spp, Ricinus communis, Rosa luciae, Rumex acetosa, Silphium perfoliatum, Solidago canadensis, Styphnolobium japonicum, Trifolium pratense, Verbena bipinnatifida, Verbena officinalis, Veronica officinalis, Veronica persica, Veronica polita, Veronica teucrium, Vicia faba</p>
Formonetin	<p>Albizia procera, Aloe vera, Amorpha fruticosa, Arabidopsis thaliana, Brassica oleracea, Eschscholzia californica, Genista tinctoria, Glycine max, Medicago arabica, Medicago monspeliaca, Medicago sativa, Medicago truncatula, Melilotus italica, Onobrychis viciifolia, Ononis spinosa, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Pueraria lobata, Spartium junceum, Trifolium medium, Trifolium pratense, Trifolium repens, Trifolium riograndense, Trifolium subterraneum, Trigonella foenum-graecum, Wisteria brachybotrys</p>
Prenyl caffeate	Populus spp.
Apigenin 8-C-hexoside (vitexin)/ Kaempferol 3-O-rhamnoside	<p>Adonis spp, Commelina communis, Crataegus oxyacantha, Cucumis sativus, Cytisus hirsutus, Gleditsia triacanthos, Glycine max, Humulus japonicus, Lychnis flos-cuculi, Ononis spinosa, Origanum vulgare, Oxalis corniculata, Pelargonium reniforme, Pelargonium sidoides, Pisum sativum, Spartium junceum, Stellaria media, Trifolium pratense, Trigonella foenum-graecum/Chenopodium murale, Geranium rotundifolium, Houttuynia cordata, Nymphaea caerulea, Nymphaea odorata, Platanus acerifolia, Raphanus sativus,</p>

	Trachelospermum asiaticum var.intermedium, Equisetum palustre
Genkwanin/Acacetin/7,2'-Dihydroxy-6-methoxyisoflavone	Artemisia capillaris, Medicago polymorpha, Ocimum basilicum, Ocimum kilimandscharicum, Origanum spp, Rosmarinus officinalis, Salvia lavandulaefolia, Salvia officinalis, Artemisia minor, Artemisia vestita, Chrysanthemum leucanthemum, Eupatorium tinifolium, Mentha aquatica, Mentha longifolia, Trifolium repens, Verbena bipinnatifida, Veronica officinalis, Veronica teucrium/Salicornia europaea
Chrysin	Artemisia campestris ssp. glutinosa, Escallonia spp, Origanum spp, Populus spp, Primula farinosa, Spartium junceum, Veronica spicata, Vicia faba
Pinobanksin 5-methyl ether	Populus deltoides
Pinocembrin	Populus, Euphorbia
Elenolic acid	Olea europaea
Adenosmoside	Adenosma caeruleum
Gibberellin A8	Allium cepa, Althaea rosea, Arabidopsis thaliana, Betula pendula, Brassica napus, Calonyction aculeatum, Cucumis melo, Cucumis sativus, Cucurbita maxima, Cytisus laburnum, Fragaria x ananassa, Glycine max, Helianthus annuus, Juglans regia, Laburnum anagyroides, Lactuca sativa, Lathyrus odoratus, Malus domestica, Matthiola incana, Pharbitis purpurea, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Prunus avium, Prunus persica, Raphanus sativus, Silene armeria, Spinacia oleracea, Thlaspi arvense
Brasoside/Isosweroside/ Sweroside/Gardaloside/ Synargentolide D/ 10-deoxygeniposidic acid	Verbena brasiliensis, Verbena officinalis/Sambucus ebulus/ Catharanthus roseus, Centaurium erythraea, Pileostegia viburnoides var. glabrescens, Scabiosa japonica/Gardenia jasminoides/Syncolostemon argenteus/ Leonurus persicus
2-cis,4-trans Absciscic acid	Arabidopsis thaliana, Daucus carota, Equisetum arvense, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum, Robinia pseudoacacia, Vicia faba, Malus pumila
Camphoric acid/ 2-Hydroxycampholonic acid	Camphor tree, Salvia officinalis

Sebacic acid	Ricinus communis, Phaseolus vulgaris, Isatis tinctoria
2',6'-Dihydroxy-4'-methoxyacetophenone/ Syringaldehyde	Prunus domestica, Sanguisorba minor/Gymnadenia conopsea, Hibiscus taiwanensis, Punica granatum, Seseli tortuosum, Taraxacum formosanum
dihydroconiferyl alcohol/ erythro-Anethole glycol/Mephenesin	lactuca sativa/pimpinella anisum, foenicum vulgare
Phlorigidoside A	phlomis rigida
Vanilloside/ 3,4-Dihydroxyphenethyl glucoside/ Cornoside/3,5-Dihydroxyphenethyl alcohol 3-O-beta-glucopyranoside	Scutellaria albida subsp.albida/Prunus/Forsythia europaea, Olea europaea/Veronica thymoides subsp.pseudocinerea
Viridoside/Monovalerianester A	Pimpinella anisum, Rhodiola rosea/Valeriana officinalis
dihydroconiferin	Picris kantschatica, Rhodiola crenulata
Rhodioloside A/Nepetariaside	Rhodiola crenulata, Rhodiola rosea/Nepeta cataria
Geniposide/Secologanin/ Cornin/dehydrologanin/ Arborescoside/Majoroside	Gardenia jasminoides, Gardenia spp/Catharanthus roseus, Centaurium erythraea/ Verbena brasiliensis, Verbena officinalis/ Ligustrum lucidum, Osmanthus austrocaledonicus/ Plantago ovata/ Plantago cornuti, Plantago major
6-deoxylamioside	Lamium amplexicaule
Decapetaloside/Nepetaside/ Villoside/Aucubin	Viburnum betulifolium/Nepeta cataria/Patrinia villosa
Levoglucosan	Arabidopsis thaliana
Genipin gentiobioside	Gardenia jasminoides
Isosuspensolide E	Viburnum ayavacense
Lappaol C	Arctium lappa
Loliolide beta D glucopiranoside	Salacia chinensis
Loganin	Catharanthus roseus, Centaurium erythraea, Jasminum grandiflorum, Jasminum officinale, Menyanthes trifoliata, Osmanthus austrocaledonicus, Patrinia villosa
Carthamoside B4	Carthamus tinctorius
5-deoxylamiol / Suspensoside A/ Gibboside	Clinopodium vulgare, Lamium purpureum / Viburnum suspensum / Patrinia gibbosa
Coniferin/Bidenoside D/Bidensyneoside C/ Pectinolide D/Myzodendrone/	Carum carvi, Rhodiola crenulata/ Bidens bipinnata/ Bidens parviflora/ Hyptis pectinata/ Vitex agnus-castus/ Citrus limon, Fortunella japonica/ Foeniculum vulgare

Citrusin D/Sphalleroside A	
7,2'-Dihydroxy-6-methoxyisoflavone	Salicornia europaea
4-Hydrocinnamoyl-2,2,5-trimethyl- 4-cyclopentene-1,3-dione/ Neocryptotanshinone II	Myrica gale/Salvia miltiorrhiza
Chrysoeriol/Hispidulin	Apium graveolens, Daucus carota, Lotus maritimus, Medicago marina, Medicago sativa, Medicago truncatula, Nymphaea caerulea, Onopordum acanthium, Origanum majoricum, Origanum vulgare, Raphanus sativus, Salix babylonica, Salvia lavandulaefolia, Salvia palaestina, Tanacetum parthenium, Tanacetum vulgare, Trifolium pratense, Verbena bipinnatifida, Veronica hederifolia/Artemisia vestita, Digitalis lanata, Inula viscosa, Ononis spinosa, Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis, Veronica officinalis, Veronica teucrium
(1E,6E) -1,7-Diphenyl-1,6-heptadiene-3,5-dione	Kaempferia parviflora
Decaffeoylverbascoside/ Forsythoside E	Stachys sieboldii, Firmiana platanifolia
5-Methoxyxanthocercin A	Dipteryx odorata
Isoacoramone	Acorus calamus, Acorus tatarinowii
Plicatoside A / Plicatoside B / 1-O-Hexosyl-epideoxyloganic acid	Pedicularis verticillata
Syringin-4-O-beta-glucoside	Foeniculum vulgare, Magnolia sieboldii
Ikarisoside D	Epimedium grandiflorum
4,7-Didehydroneophysalin B	Physalis alkekengi
Loliolide	Commelina communis, Euphorbia helioscopia, Fumaria officinalis, Helianthus annuus, Lythrum salicaria, Melia azedarach, Menyanthes trifoliata, Plantago lanceolata, Plantago major
Chushizisin I	Broussonetia papyrifera
Tricuspidatol A	Parthenocissus tricuspidata
Phenetyl caffeate/ Isoliquiritigenin 4,4'-dimethyl ether/ Flavokawin B/(-)-Homopterocarpin/ Mollugin	Populus spp/Bidens tripartita/Medicago sativa/Trifolium hybridum/Galium mollugo
Gibberellin A24/Gibberellin A44/ Ballotinone/Epirosmanol	Arabidopsis thaliana, Catharanthus roseus, Cucurbita maxima, Lilium elegans, Lilium longiflorum, Malus domestica, Matthiola incana, Pisum sativum, Raphanus sativus/

	Brassica napus, Pharbitis purpurea, Silene armeria, Spinacia oleracea, Trifolium repens/ Ballota nigra/Perovskia scrophularifolia, Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis
6-O-Oleuropeoylsucrose	Olea europaea
p-Coumaric acid	Allium obliquum, Allium Sativum, Aloe vera, Althaea nudiflora, Althaea rosea, Arabidopsis thaliana, Asparagus officinalis, Begonia nantoensis, Brassica napus, Cucumis sativus, Curcuma domestica, Curcuma longa, Cyperus rotundus, Daucus carota, Equisetum arvense, Fumaria capreolata, Fumaria officinalis, Fumaria vaillantii, Glycine max, Gymnadenia conopsea, Humulus lupulus, Juncus inflexus, Inula britannica, Magnolia denudata, Magnolia liliiflora, Malva silvestris, Matricaria chamomilla, Medicago sativa, Medicago truncatula, Melissa officinalis, Mentha piperitae, Nymphaea caerulea, Ocimum basilicum, Ocimum sanctum, Origanum vulgare, Pelargonium reniforme, Pittosporum tobira, Plantago major, Plantago media, Populus deltoides, Populus spp, Populus trichocarpa, Prunus avium, Prunus serotina, Punica granatum, Ranunculus baudotii, Raphanus sativus, Rosmarinus officinalis, Solanum tuberosum, Thymus vulgaris, Trifolium medium, Trifolium pratense, Veronica officinalis, Veronica spicata, Veronica teucrium, Vitis rupestris, Vitis vinifera
Hesperetin, Homoeriodictyol/ 4,2',4',6'-Tetrahydroxy-3-methoxychalcone/ 1-Hydroxy-3,5,8-trimethoxyxanthone/ Decussatin/Poric acid A	Anthurium spp, Citrus spp, Medicago sativa, Mentha aquatica, Origanum majorana, Prunus persica, Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis, Verbena bipinnatifida/Artemisia campestris/Populus sieboldii, Tulipa spp/Centaurium littorale/Centaurium pulchellum/Allium porrum
Omphamurin	Murraya paniculata
Cirsiliol/ Desmethoxysudachitin/ Thymusin/Jaceosidin/ Iristectorigenin A / Iristectorigenin B/Tricin	Cirsium lineare, Lippia citriodora, Salvia officinalis, Salvia stenophylla, Salvia verbenaca / Ambrosia trifida, Gardenia lucida, Mentha piperita, Ononis natrix / Nepeta assurgens, Origanum sp. / Centaurea jacea, Mentha pulegium, Salvia tomentosa, Veronica officinalis, Veronica teucrium / Iris germanica, Iris unguicularis / Iris florentina / Aechmea glomerata, Catharanthus roseus, Medicago sativa, Medicago truncatula, Phragmites communis, Spartina cynosuroides, Valeriana laxiflora
8-methylherbacetin / Eupafolin / 6-Hydroxyluteolin 6-methyl ether/	Dorycnium pentaphyllum, Enceliopsis nudicaulis, Lotus corniculatus, Ozothamnus spp., Rhodiola crenulata, Sedum sexangulare /

6-Methoxykaempferol / Azaleatin	Rosmarinus officinalis, Staehelina dubia/ Mentha pulegium, Tanacetum vulgare / Aeonium, Ambrosia artemisiifolia, Matricaria chamomilla, Matricaria recutita, Prunus avium / Rhododendron
1-Allyl-2,3,4,5-tetramethoxybenzene	Petroselinum
Acetovanillone/Paeonol/ Melilotic acid/Caffeyl alcohol/ p-Hydroxyphenyl acetic acid methyl ester/ Tropic acid/Methyl vanillin/Phenyllactic acid	Allium cepa, Iris germanica, Iris spp, Paeonia suffruticosa, Thymus broussonneti, Thymus maroccanus / Brassica hirta, Morus alba, Paeonia albiflora, Paeonia lactiflora wild, Paeonia moutan, Paeonia suffruticosa / Melilotus alba, Melilotus caspius, Melilotus officinalis, Melilotus suaveolens / Arabidopsis thaliana / Taraxacum formosanum / Datura stramonium / Galium verum, Gymnadenia conopsea / Atropa belladonna, Datura metel, Datura stramonium
Isoapressin / Avicennone B	Achillea ligustica / Avicennia marina
Teucrein / Pectinolide B o C	Teucrium marum / Hyptis pectinata
Mexoticin/Isomexoticin	Murraya paniculata
Eugenol beta-D-glucopyranoside/ Vimalin/Bidensyneside A1/ Leptin G/Chavibetol glucoside	Dalmatian sage, Eupatorium glehnii, Perilla frutescens var.forma viridis, Perovskia scrophularifolia, Salvia officinalis/Rhodiola crenulata/Bidens parviflora/Evodia lepta/Pimpinella anisum
Eriosemaone C	Eriosema tuberosum
Palodesagretin I/II	Brosimum rubescens
6-Hydroxymusizin/ 5-Acetonyl-7-hydroxy-2-methylchromone/ Dihydrocoriandrin	Cassia tora/Cassia siamea, Senna siamea, Rheum sp/Coriandrum sativum
Kinsenoside	Anoetochilus formosanus, Anoetochilus koshunensis
Kanzonol I/Lespedezaflavanone F/ Lespedezaflavanone G	Glycyrrhiza uralensis/Lespedeza formosa
2',7-Dihydroxy-4'-methoxy-4- [2',7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavan- 5'-yl]isoflavan/Vestitol/Parvistemin C	Dalbergia nitidula/Dalbergia odorifera/Stemona parviflora
13-O-Methylvernojalcanolide 8-O-acetate	Pseudoelephantopus spicatus
8-(Acetyloxy)octahydro-6,9-dihydroxy- 3-(hydroxymethyl)-5a,9-dimethylnaphtho [1,2-b]furan-2(4H)-one	Achillea fragrantissima
4'-O-methylirenolone	Musa acuminata (Platano)

Viburtinal	Viburnum opulus, Viburnum tinus
2,6-Dimethoxy-9-phenyl-1H-phenalen-1-one	Eichhornia crassipes (Giacinto d'acqua)
2-C-Methyl-D-erythritol/ 2-Deoxy-D-ribitol	Anethum graveolens, Coriandrum sativum, /Foeniculum vulgare
Digitalose	Digitalis purpurea
Oleandrose	Nerium oleander
Pimelic acid	Ricinus communis
Spionoside B/Arachiside A	Capparis flavicans, Capparis spinosa/Arachis hypogaea
Glucosyringic acid	Foeniculum vulgare, Linaria vulgaris
Cucumegastigmane I/Drummondol	Cucumis sativus/Capsicum annum, Solanum nigrum
Cinnamic acid	Salix fragilis, Pittosporum tobira, Helianthus tuberosus
Mevalonic acid	Arabidopsis thaliana, Asparagus officinalis, Chamaemelum nobile, Matricaria recutita, Polygonum minus, Rosmarinus officinalis, Salvia miltiorrhiza, Tripterygium wilfordii
Luteolin 7-O-rutinoside/ Luteolin 3'-methyl ether 7-arabinosyl-galactoside/ Luteolin 3'-methyl ether 7-apiosyl-glucoside	Capsella bursa-pastoris, Cynara scolymus (carciofo), Daucus carota, Mentha aquatica, Salvia lavandulifolia/Salix caprea/Apium graveolens, Petroselinum hortense