



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Dottorato di ricerca  
in Scienze Ambientali  
ciclo 30°

Tesi di Ricerca

**Valutazione della qualità e  
sicurezza in prodotti di interesse  
alimentare attraverso metodi di  
indagine metabolomica**

SSD: CHIM01

**Coordinatore del Dottorato**  
ch. prof. Bruno Pavoni

**Supervisore**  
ch. prof. Gabriele Capodaglio

**Dottorando**  
Giovanni Rizzato  
Matricola 805776



*A Giulia,  
a mia madre*



# Ringraziamenti

Desidero ringraziare

Mia moglie e tutta la mia famiglia, per la pazienza ed il sostegno avuto durante questi anni.

I compagni di ufficio: dott.ssa Elisa Scalabrin, dott.ssa Marta Radaelli, dott. Federico Dallo, dott.ssa Callegaro Alice e dott.ssa Elisa Morabito, per l'amicizia e l'aiuto ricevuto durante questi anni.

Il prof. Gabriele Capodaglio, per l'opportunità offertami.

Il dott. Enrico Marchiori, perché avrei dovuto decisamente farlo prima.



# Indice

<b>Premessa</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1 Metabolomica . . . . .	1
1.1.1 Flavonoidi . . . . .	6
1.1.2 Tannini . . . . .	9
1.1.3 Saponine . . . . .	10
1.2 Liquirizia . . . . .	12
1.2.1 Specie principali . . . . .	13
1.2.2 Proprietà e composizione . . . . .	14
1.3 Vite . . . . .	15
1.3.1 Storia recente . . . . .	15
1.3.2 Innesto . . . . .	16
1.3.3 Proprietà e composizione . . . . .	17
1.4 Elicriso . . . . .	18
1.4.1 Proprietà e composizione . . . . .	19
<b>2 Materiali e metodi</b>	<b>21</b>
2.1 Descrizione dei campioni . . . . .	21
2.2 Trattamento dei campioni . . . . .	23
2.3 Analisi strumentale . . . . .	24
2.3.1 Cromatografia . . . . .	24
2.3.2 Spettrometria di massa . . . . .	25
2.4 Trattamento dati . . . . .	25
2.4.1 MetAlign . . . . .	26
2.4.2 MSClust . . . . .	26
2.4.3 Test ANOVA . . . . .	26
2.4.4 Analisi multivariata . . . . .	27
2.5 Identificazione . . . . .	28
<b>3 Risultati e discussione</b>	<b>31</b>
3.1 Analisi liquirizia . . . . .	31
3.1.1 Metaboliti principali . . . . .	31

3.1.2	Variabilità interspecifica . . . . .	33
3.2	Analisi vite . . . . .	41
3.2.1	Metaboliti comuni . . . . .	41
3.2.2	Variabilità interspecifica . . . . .	43
3.2.3	Resistenza . . . . .	52
3.2.4	Valutazioni di carattere nutraceutico . . . . .	52
3.3	Analisi elicriso . . . . .	52
3.3.1	Variabilità interspecifica . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>69</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>71</b>



# Elenco delle figure

1.1	Struttura base e numerazione degli atomi di carbonio dei flavonoidi . . . . .	7
1.2	Comparazione tra la struttura molecolare dell'ormone estradiolo (a) e la genisteina (b) . . . . .	7
1.3	Struttura molecolare rappresentativa di due diverse sapogenine, triterpenica (a) e steroidea (b) . . . . .	10
1.4	Struttura molecolare del resveratrolo . . . . .	18
1.5	Struttura molecolare tipica degli acidi clorogenici . . . . .	20
2.1	Gradiente cromatografico utilizzato . . . . .	25
3.1	PCA ottenuta sui campioni di liquirizia per le prime due componenti principali . . . . .	34
3.2	HCA: heatmap ottenuta sui campioni di liquirizia . . . . .	34
3.3	Composti caratterizzanti la specie <i>G. glabra</i> - confronto delle intensità di segnale . . . . .	35
3.4	Composti caratterizzanti le specie cinesi - confronto delle intensità di segnale . . . . .	37
3.5	Composti caratterizzanti la specie <i>G. inflata</i> - confronto delle intensità di segnale . . . . .	40
3.6	Heatmap ottenuta dall'analisi dei cluster sui campioni di portainnesto . . . . .	44
3.7	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i> - confronto delle intensità di segnale medie . . . . .	45
3.8	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i> - confronto delle intensità di segnale medie . . . . .	47
3.9	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i> - confronto delle intensità di segnale medie . . . . .	48
3.10	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. candicans</i> × <i>V. rupestris</i> - confronto delle intensità di segnale medie . . . . .	50
3.11	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. berlandieri</i> × <i>V. vinifera</i> - confronto delle intensità di segnale medie . . . . .	51
3.12	Heatmap ottenuta dall'analisi dei cluster sui campioni di Elicriso . . . . .	53

3.13 PCA ottenuta sui campioni di elicriso - prima componente contro seconda . . . . .	54
3.14 PCA ottenuta sui campioni di elicriso - prima componente contro terza . . . . .	55
3.15 Composti caratterizzanti la specie <i>H. arenarium</i> - confronto delle intensità di segnale . . . . .	55
3.16 Composti caratterizzanti la specie <i>H. nogaicum</i> - confronto delle intensità di segnale . . . . .	58
3.17 Formula di struttura dello xantone . . . . .	59
3.18 Composti caratterizzanti la specie <i>H. italicum</i> - confronto delle intensità di segnale . . . . .	60
3.19 Composti caratterizzanti la specie <i>H. stoechas</i> - confronto delle intensità di segnale . . . . .	63
3.20 Composti caratterizzanti la specie <i>H. hyblaicum</i> - confronto delle intensità di segnale . . . . .	66

# Elenco delle tabelle

1.1	Classificazione dei composti terpenici, tratta da [13] . . . . .	4
1.2	Classificazione dei composti fenolici, tratta da [17] . . . . .	5
1.3	Strutture base dei flavonoidi . . . . .	8
2.1	Elenco e suddivisione dei campioni di vite . . . . .	22
3.1	I dieci composti più intensi nelle radici delle tre specie di liquirizia	32
3.2	Composti caratterizzanti <i>G. glabra</i> . . . . .	36
3.3	Composti caratterizzanti le specie <i>G. uralensis</i> e <i>G. inflata</i> .	38
3.4	Composti caratterizzanti la specie <i>G. inflata</i> . . . . .	40
3.5	Elenco metaboliti mediamente più intensi nelle foglie di vite .	41
3.6	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>	46
3.7	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>	47
3.8	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i> .	49
3.9	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. candicans</i> × <i>V. rupestris</i>	50
3.10	Composti caratterizzanti il gruppo <i>V. berlandieri</i> × <i>V. vinifera</i>	51
3.11	Composti caratterizzanti la specie <i>H. arenarium</i> . . . . .	56
3.12	Composti caratterizzanti la specie <i>H. nogaicum</i> . . . . .	60
3.13	Composti caratterizzanti la specie <i>H. italicum</i> . . . . .	61
3.14	Composti caratterizzanti la specie <i>H. stoechas</i> . . . . .	64
3.15	Composti caratterizzanti la specie <i>H. hyblaicum</i> . . . . .	66



# Premessa

In questo lavoro di tesi sono esposti i risultati ottenuti durante il corso di Dottorato in Scienze Ambientali (XXX ciclo). Il progetto di ricerca è stato ideato considerando la tematica vincolata della valorizzazione di prodotti dell'agroalimentare italiano.

Dato il recente, e sempre più alto, interesse del mondo economico e accademico verso i prodotti naturali dotati di effetti farmacologici, sono state scelte tre matrici che posseggono la duplice natura di prodotti alimentari e prodotti officinali. Nella scelta del materiale da analizzare si è tenuto conto inoltre dell'impatto positivo che uno studio di questo tipo potrà avere sull'economia e sulla ricerca.

La liquirizia, importante denominazione di origine protetta (DOP) calabrese, è stata scelta per l'importanza economica che riveste nel settore dolciario e per le sue note proprietà farmacologiche. Inoltre, essendo un prodotto pregiato, può essere oggetto di contraffazione. Fornire strumenti chimici per la caratterizzazione delle specie e la discriminazione tra specie differenti, può essere dunque molto utile nel controllo della qualità e della sicurezza.

Le foglie di vite sono state scelte per l'impatto economico ed ambientale che la produzione di vino ha nel territorio italiano. Nel caso specifico si è scelto di studiare i portainnesto, che, a nostra conoscenza, non sono quasi mai stati caratterizzati dal punto di vista chimico. Capire il loro ruolo nella fisiologia della pianta potrà avere impatti sul futuro della viticoltura, aiutando nella scelta di nuovi portainnesto anche in vista dei cambiamenti climatici; in tutto questo, la caratterizzazione metabolica costituisce sempre il primo passo per la miglior comprensione del funzionamento dei sistemi biologici. Le foglie di vite possono rappresentare inoltre un cibo funzionale visto che in molti paesi (soprattutto nell'area orientale) sono normalmente utilizzate come alimento. Le viti impiegate come portainnesto derivano dalle specie americane, naturalmente resistenti alle avversità che affliggono la vite europea e offrono pertanto la possibilità di produrre senza trattamenti antiparassitari le foglie. In un contesto sempre più attento alla produzione "biologica", si prospettano dunque interessanti possibilità anche per l'utilizzo officinale e alimentare della foglia di vite.

L'elicriso infine è una pianta piuttosto comune in molte aree del Paese

ma, a differenza di quanto accade in altre culture, non è sfruttata, se non nella medicina popolare, per le sue proprietà ma relegata a semplice pianta ornamentale. Nonostante si sia perso nei secoli, l'uso erboristico è molto antico e ancora vivo in altri Paesi e merita di essere rivalutato e soprattutto studiato nel dettaglio vista la grandissima varietà di specie esistenti. Nell'ottica della ricerca di nuovi farmaci, le piante di elicriso si caratterizzano quindi come un'ottima risorsa.

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Metabolomica

La metabolomica è una disciplina sviluppatasi a partire dai primi anni del XXI secolo e che mira alla completa caratterizzazione del metaboloma di un organismo attraverso tecniche analitiche avanzate [1]. Per metaboloma si intende l'insieme dei metaboliti presenti in un dato organismo, pertanto, la metabolomica si propone di descrivere quanto più accuratamente possibile l'intero set di metaboliti, costituito in genere da molecole di piccole dimensioni (*small metabolites*, <1500 Da).

La definizione di metabolita normalmente accettata è quella di prodotto intermedio o finale dei processi metabolici di un organismo, o ancora il prodotto ultimo della regolazione cellulare [2]. Più in generale, viene considerata metabolita qualunque sostanza entri a far parte del metabolismo di un organismo. Normalmente vengono definiti due tipi di approcci analitici per lo studio di questi composti [2]:

- *Targeted*
- *Untargeted*

Il primo si concentra principalmente sull'analisi di alcune (in genere poche) specifiche molecole note, correlate a particolari vie metaboliche dell'organismo in studio. Tale approccio è caratterizzato da analisi di tipo quantitativo, tipicamente costose a causa del necessario utilizzo di standard e procedure analitiche estremamente specifiche per i composti di interesse. Il secondo approccio è di tipo globale, mirato alla caratterizzazione qualitativa di quanti più metaboliti possibile, prodotti in risposta ad un particolare stimolo ambientale, o correlati al patrimonio genetico dell'organismo. L'acquisizione del pattern metabolico completo costituisce una sorta di "impronta digitale" dell'organismo oggetto di studio.

Le tecniche analitiche maggiormente in uso nell'analisi metabolomica sono la risonanza magnetica nucleare (NMR, *nuclear magnetic resonance*) e

la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS, *high resolution mass spectrometry*). La prima è in grado di fornire informazioni molto dettagliate sulla struttura di una molecola e risulta indispensabile per l'identificazione univoca di un composto sconosciuto; tuttavia, presenta problemi di sensibilità e ridotto numero di composti isolabili qualora si lavori con matrici complesse [3] come estratti di origine vegetale. La spettrometria di massa, per contro, è dotata di una sensibilità decisamente maggiore ed è in grado di rilevare anche centinaia di composti a fronte di una minore riproducibilità strumentale. L'accoppiamento con tecniche separative come la gas cromatografia (GC) e la cromatografia liquida (LC) ha permesso di migliorare ulteriormente le performance di queste tecniche portando all'identificazione e alla caratterizzazione di un numero sempre maggiore di composti.

Negli ultimi anni la tecnica maggiormente utilizzata per gli studi di metabolomica è diventata la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, *high performance liquid chromatography*) abbinata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione. Questa combinazione permette infatti di separare e identificare con alta efficienza e grande accuratezza un elevato numero di composti polari e semi-polari. D'altra parte, la risposta dello strumento è fortemente dipendente dalla matrice analizzata, rendendo necessari alcuni accorgimenti in fase di preparazione del campione e di analisi strumentale. In generale la tecnica HPLC-HRMS è divenuta un mezzo versatile ed affidabile che si presta a diversi tipi di studi.

Le applicazioni della metabolomica sono molteplici e trovano impiego in diversi ambiti: studio dei meccanismi di risposta allo stress delle piante utilizzando organismi modello [4], studi genetici e chemotassonomici per differenziare specie diverse attraverso la ricerca di marker biologici [5, 6, 7], caratterizzazione di organismi (non solo vegetali) non ancora conosciuti [8], ricerca di nuovi farmaci, controllo qualità in matrici alimentari e prodotti naturali [9] (presenza di contaminanti, adulteranti, ecc...), verifica dell'originalità di un prodotto agroalimentare [10, 11] (ricerca di contraffazioni e falsificazioni).

Si possono distinguere due gruppi di metaboliti:

1. Primari
2. Secondari

Fanno parte del primo gruppo tutte quelle sostanze che sono indispensabili ai processi di crescita in condizioni ordinarie. Quantitativamente parlando costituiscono la maggioranza dei metaboliti presenti in un organismo e sono in genere molecole semplici quali: aminoacidi, zuccheri, acidi grassi, acidi nucleici, ecc.

I metaboliti secondari sono invece correlati ad altri meccanismi quali la risposta a stimoli ambientali, la competizione con altri organismi e la difesa da agenti patogeni o predatori. Per questo motivo il regno vegetale



presenta la più grande collezione di metaboliti secondari; le piante non potendo muoversi devono trovare un altro modo per poter rispondere ai diversi stimoli ambientali, siano essi fisici, chimici o biologici. È stato stimato che nel solo regno vegetale siano presenti più di 200 000 differenti metaboliti [2]. Questi non sono dunque indispensabili alla vita della pianta in normali condizioni, ma in particolari situazioni possono accrescerne in modo decisivo le probabilità di sopravvivenza. Queste sostanze sono in grado di agire a diversi livelli, possono essere tossici per alcuni insetti o altri predatori, agire come fotoprotettori in ambienti ad elevata presenza di radiazione luminosa, proteggere la pianta dall'aggressione di funghi e batteri o innescare particolari vie biosintetiche agendo come dei veri e propri ormoni [11]. Da queste ed altre numerose proprietà si evince la necessità di studiare questi particolari composti. I metaboliti secondari forniscono infatti importantissime informazioni sulla fisiologia della pianta, essendo relazionati sia al DNA che all'ambiente in cui cresce, ma sono estremamente importanti per il loro impatto sulla salute umana, possedendo le più disparate attività biologiche. Dette attività sono conosciute ormai da millenni dall'uomo e le piante officinali costituiscono la medicina popolare in uso da molte popolazioni che difficilmente hanno accesso alla medicina occidentale; vengono spesso utilizzate anche da persone che non avrebbero difficoltà all'utilizzo della moderna farmacia/medicina.

Essendo correlati anche al patrimonio genetico, i metaboliti secondari assumono inoltre una valenza chemotassonomica, permettendo la distinzione di specie diverse anche affini tra loro e difficilmente distinguibili con altre tecniche. Per poter individuare uno o più composti identificativi di una specie, è fondamentale avvalersi dell'approccio metabolomico mediante analisi qualitative. Una volta individuati dei composti marker per una specie particolare, un'analisi chimica potrà essere più pratica, veloce, affidabile ed economica rispetto ad altri metodi (come l'analisi del DNA).

I metaboliti secondari possono essere divisi in tre principali gruppi [12]:

- Terpeni
- Fenoli
- Alcaloidi

Ovviamente si potrebbero elencare altre sostanze presenti come metaboliti secondari, ma, generalmente, possono essere ricondotte, più o meno direttamente, ad uno di questi tre gruppi. Data l'importanza rivestita da questi composti nel regno vegetale e non solo, è bene darne una breve e generale descrizione.

### **Terpeni**

Anche detti terpenoidi o isoprenoidi, costituiscono il gruppo più numeroso di composti naturali prodotti dalle piante, tanto che si stima ne esistano più di

30 000 e ne vengono tutt'ora scoperti di nuovi. Malgrado i due termini siano spesso utilizzati indistintamente (anche in letteratura), "terpene" indica un idrocarburo, mentre "terpenoide" un suo derivato con uno o più eteroatomi (solitamente ossigeno); "isoprenoide" deriva invece dall'unità fondamentale che costituisce questi composti, ossia l'isoprene. Data la grandissima varietà strutturale, le loro proprietà chimico-fisiche sono molto eterogenee e queste molecole possono svolgere numerose funzioni all'interno della pianta (ormonali, difensive verso i patogeni, attrattive verso gli impollinatori, di pigmentazione. . .) [13]. Due sono le vie metaboliche principali che portano alla sintesi dei terpenoidi: la via del mevalonato e la via del metileritritolo fosfato, che portano entrambe alla formazione dell'unità base a cinque atomi di carbonio (il già citato isoprene) dei terpeni [13]. In base al numero di queste unità, i terpeni possono essere classificati come in Tabella 1.1.

Oltre ai molti ruoli nella fisiologia della pianta, questo gruppo di composti esercita diversi effetti biologici sugli altri organismi tra cui l'uomo. Molti terpenoidi presenti nei prodotti alimentari di origine vegetale svolgono infatti il ruolo di nutrienti essenziali per l'organismo come le vitamine A, D ed E. Altri ancora sono utilizzati nella ricerca di nuovi farmaci: ad esempio la molecola nota come paclitaxel è un potente antitumorale. Infine, all'interno di questo gruppo, esistono diverse sostanze, come ad esempio la digitossina presente in *Digitalis purpurea* L., in grado di esercitare effetti tossici. Diverse sono anche le applicazioni industriali, ad esempio questi composti conferiscono aroma a molti prodotti alimentari e la coltivazione di piante per estrarre fragranze è un settore importante dell'industria agricola. Altri terpenoidi trovano impiego nel settore chimico, in particolare nella produzione di vernici, gomme, resine, profumi, solventi e combustibili [13, 14, 15, 16].

Tabella 1.1: Classificazione dei composti terpenici, tratta da [13]

Classe	Numero di unità isopreniche	Numero di carboni	Esempi
Emiterpeni	1	5	Isoprene
Monoterpeni	2	10	Mentolo
Sesquiterpeni	3	15	Farnesene
Diterpeni	4	20	Acido abietico
Triterpeni	6	30	Colesterolo
Tetraterpeni	8	40	Licopene
Politerpeni	9-30000	>40	Gomma

## Fenoli

I composti fenolici formano un gruppo estremamente eterogeneo costituito da tutte quelle sostanze che contengono all'interno della struttura molecolare

un gruppo fenolico, ossia un anello aromatico con un gruppo idrossile. Anche in questo caso la variabilità strutturale è alta e le proprietà fisico-chimiche possono cambiare enormemente all'interno di questa classe. I composti fenolici vengono sintetizzati dalle piante superiori principalmente attraverso la via metabolica dell'acido shikimico che porta alla sintesi di aminoacidi aromatici. In particolare, dalla fenilalanina, mediante la rimozione del gruppo amminico ad opera dell'enzima PAL (*phenylalanine ammonia lyase*), si forma l'acido cinnamico, da cui poi viene sintetizzata la maggior parte dei composti fenolici [12]. Queste sostanze possono essere classificate in base alla loro struttura chimica secondo uno schema proposto da Harborne e Simmonds nel 1964 (e comunemente utilizzato ma altre classificazioni sono comunque possibili) e visibile in Tabella 1.2.

Tabella 1.2: Classificazione dei composti fenolici, tratta da [17]

Struttura	Classe
$C_6$	fenoli semplici
$C_6-C_1$	acidi fenolici e composti correlati
$C_6-C_2$	acetofenoni e acidi fenilacetici
$C_6-C_3$	acidi cinnamici, aldeidi cinnamiche, alcoli cinamici
$C_6-C_3$	cumarine, isocumarine e cromoni
$C_{15}$	calconi, auron, diidrocalconi
$C_{15}$	flavani
$C_{15}$	flavoni
$C_{15}$	flavanoni
$C_{15}$	flavanonoli
$C_{15}$	antocianidine
$C_{15}$	antocianine
$C_{30}$	biflavoni
$C_6-C_1-C_6, C_6-C_2-C_6$	benzofenoni, xantoni e stilbeni
$C_6, C_{10}, C_{14}$	chinoni
$C_{18}$	betacianine
lignani, neolignani	dimeri e oligomeri
lignine	polimeri
tannini	oligomeri e polimeri
flobafeni	polimeri

I fenoli semplici sono costituiti da una molecola di fenolo con uno o più sostituenti ed includono alcuni importanti composti quali il resorcinolo. Qualora sia presente un gruppo carbossilico come sostituito sulla molecola del fenolo, si è in presenza di un acido fenolico; un esempio è costituito dal noto acido salicilico. Se al posto del gruppo carbossilico è presente un

gruppo aldeidico, la molecola si chiamerà aldeide fenolica, come nel caso della vanillina, molecola nota per la sua caratteristica fragranza. Molto diffusi sono anche i derivati dell'acido cinnamico, presenti in quasi tutte le piante data la già citata via metabolica dell'acido shikimico. Le cumarine rivestono ruoli difensivi quali la protezione dai raggi UV in diverse piante e sono caratterizzate dalla struttura  $C_6-C_3$  e dalla presenza di un ossigeno eterociclico come parte dell'anello  $C_3$ . L'umbelliferone, composto importante sia nel metabolismo delle piante, essendo un intermedio nella sintesi di composti più complessi, sia per le sue applicazioni tecnologiche, è una delle più note cumarine [17]. Queste esercitano inoltre una vasta gamma di attività biologiche tra cui antibiotica, anticoagulante, fotosensibilizzante, ma anche vari tipi di tossicità [18, 19], rendendole composti estremamente interessanti per la ricerca di farmaci, ma anche di fondamentale importanza nel controllo qualità e nella sicurezza alimentare.

Non è possibile fornire una descrizione esauriente per ogni classe di composti fenolici in questa sede, e si consiglia pertanto la lettura dei riferimenti bibliografici già citati nella sezione. Tuttavia una categoria in particolare, i flavonoidi, riveste una certa importanza in questo lavoro e verrà trattata più avanti in una sezione a parte.

## Alcaloidi

Il termine alcaloide indica in modo generico dei composti di origine naturale, a basso peso molecolare e contenenti eterocicli con uno o più atomi di azoto [20]. Come suggerisce il nome sono normalmente sostanze più o meno basiche. Sono tra i primi composti utilizzati dall'uomo e quelli con gli effetti più significativi, comprendendo molte sostanze tossiche e psicoattive quali morfina, nicotina, caffeina e molte altre. Le vie metaboliche che conducono alla sintesi degli alcaloidi partono normalmente da semplici aminoacidi e vengono prodotti dalle piante prevalentemente per scopi difensivi [21]. Sono note più di 12 000 strutture molecolari differenti, che riflettono una grande variabilità anche nelle attività biologiche. Il maggior interesse nei confronti di questi composti risiede nel fatto che molti alcaloidi sono tutt'ora utilizzati come farmaci o come modello per sintetizzarne di nuovi [20].

### 1.1.1 Flavonoidi

I flavonoidi rappresentano la classe più abbondante e largamente diffusa dei composti fenolici [22]. Fanno parte di questa categoria le molecole che contengono due anelli aromatici (A e B in Figura 1.1) uniti da tre atomi di carbonio (solitamente chiusi in un eterociclo ossigenato) a formare una struttura del tipo  $C_6-C_3-C_6$  [23]. La classificazione dei flavonoidi tiene conto della presenza di sostituenti e dello stato di ossidazione degli atomi di carbonio dell'anello  $C_3$ ; è possibile riassumere la classificazione secondo quanto

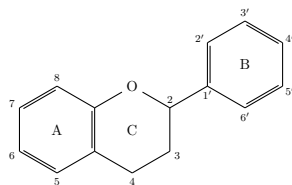


Figura 1.1: Struttura base e numerazione degli atomi di carbonio dei flavonoidi

riportato in Tabella 1.3. I flavonoidi, in natura, si presentano comunemente come derivati glicosidici, solitamente O- o C-glicosidi, delle strutture basi indicate in Tabella 1.3 e solo in misura minore vengono ritrovati come agliconi. Rivestono nella pianta diversi ruoli [24] e sono interessanti per la varietà di effetti biologici che possono esercitare sull'essere umano attraverso la dieta (antiossidanti, antimicrobici, antitumorali. . .) [25, 26, 27].

Una distinzione importante riguarda la posizione di attacco dell'anello B con il C: i flavonoidi con attacco in posizione 3 vengono infatti detti isoflavonoidi e costituiscono una sottoclasse ben distinta, con un'ampia variabilità strutturale riscontrabile in natura [28] e studiata da diverso tempo. La maggior parte degli isoflavonoidi sono stati isolati nella famiglia delle Fabaceae dove rivestono il ruolo di fitoalessine [26]. Sono molto noti ad esempio gli isoflavonoidi contenuti nella soia (*Glycine max* (L.) Merr.), in particolar modo gli isoflavoni genisteina e daidzeina e i loro rispettivi glucosidi genistina e daidzina. Agli isoflavonoidi vengono attribuite diverse attività biologiche ed in particolare la loro notevole presenza nella dieta delle popolazioni asiatiche (principalmente dovuta alla soia) sembra essere associata ad una consistente diminuzione del rischio di alcuni tipi di tumore (prostata e seno) [29]. Test *in-vitro* e *in-vivo* hanno più volte dimostrato anche un'azione diretta nell'eliminazione di cellule tumorali inducendo apoptosi [30]. Alcuni dubbi sorgono tuttavia a causa dell'attività ormonale di questi composti. Infatti, pur non avendo una struttura steroidea, sono in grado di mimare l'azione di certi ormoni estrogeni (si veda Figura 1.2) come per esempio l'estradiolo e la loro azione sulla salute umana è tuttora oggetto di studio e di controversie data la nota correlazione tra gli estrogeni endogeni ed il tumore al seno [31]. Seguono

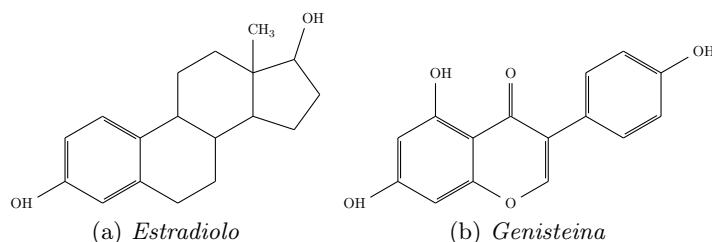
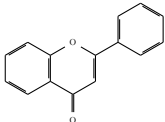
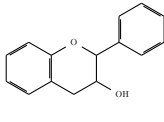
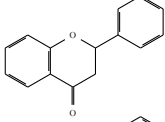
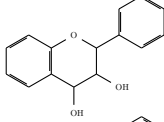
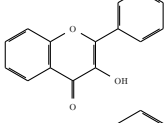
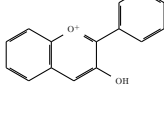
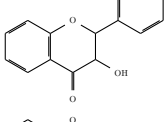
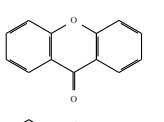
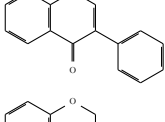
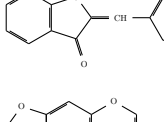
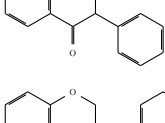
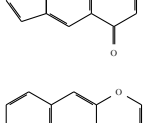
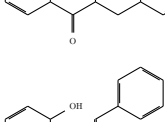
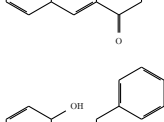
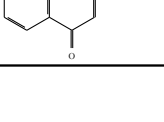
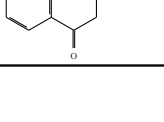


Figura 1.2: Comparazione tra la struttura molecolare dell'ormone estradiolo (a) e la genisteina (b)

Tabella 1.3: Strutture base dei flavonoidi

Tipo	Struttura	Tipo	Struttura
flavoni		flavanoli	
flavanoni		flavan-3,4-dioli	
flavonoli		antocianidine	
flavanonoli		xantoni	
isoflavoni		auroni	
isoflavanoni		furanocromoni	
omoisoflavoni		fenilcromoni	
calconi		diidrocalconi	

alcune delle più importanti sottoclassi di flavonoidi.

### **Calconi, Flavanoni e Flavanonoli**

I calconi sono una classe di flavonoidi caratterizzati dalla presenza dell'anello C aperto; in questo modo i due anelli A e B risultano connessi da una sistema carbonilico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturo. È ormai provato da tempo che questi composti sono i precursori per la sintesi di tutti gli altri flavonoidi [32] e derivano a loro volta dall'acido cinnamico e dall'acido triacetico. La struttura di collegamento tra gli anelli A e B sembra essere responsabile delle diverse attività biologiche attribuite ai calconi (antiinfiammatoria, antibatterica, antimicotica). Sono in genere molto presenti in diverse famiglie di piante superiori come Asteraceae e Fabaceae. I flavanoni sono composti strettamente legati ai calconi dei quali sono analoghi isomeri; biochimicamente risultano essere interconvertibili con quest'ultimi ed anch'essi vengono ritrovati in varie famiglie di piante superiori. Si possono poi distinguere dai flavanoni, per la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3, i flavanonoli.

### **Flavoni e Flavonoli**

I flavoni sono caratterizzati da una struttura planare (3-idrossiflavone) e sono presenti estensivamente in natura. Esibiscono una larga varietà di effetti biologici e possono avere un decisivo impatto sulla salute umana in quanto quasi ubiquitari in frutta e verdura. Sono studiati e utilizzati anche per la sintesi o lo sviluppo di nuovi farmaci [33]. I flavonoli, anch'essi molto diffusi, si distinguono per la presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3. Uno dei più noti flavonoli, nonché uno dei più studiati per la sua forte attività biologica, è la quercetina.

### **Flavani e flavanoli**

Il termine flavano indica molecole costituite da uno scheletro di 2-fenil-3,4-diidro-2H-cromene; si distinguono dagli altri flavonoidi principalmente per la mancanza del gruppo chetonico. Sono presenti nel regno vegetale e i derivati dei flavanoli sono in particolare conosciuti anche con il nome di catechine; queste vengono ritrovate in diversi prodotti alimentari come frutta (uva, mele, ciliegie), vino e tè. Anch'esse svolgono un ruolo importante per la salute umana, esercitando diverse azioni di prevenzione e protezione verso molte patologie (malattie degenerative, tumori) [34].

#### **1.1.2 Tannini**

I tannini sono una classe di polifenoli complessi sintetizzati da molte piante erbacee e legnose. Sono noti per la loro capacità di precipitare le proteine [35], conferendo la tipica sensazione astringente ad alcuni frutti e prodotti derivati

(vino principalmente). Sembrano svolgere un ruolo chiave nella difesa della pianta contro gli erbivori, svolgendo un'azione di repulsione nei loro confronti proprio grazie a queste caratteristiche; le interazioni tra queste sostanze e gli erbivori sono tuttavia complesse e ancora oggetto di studio [36].

Strutturalmente possono essere divisi in due grandi gruppi:

- Tannini condensati
- Tannini idrolizzabili

I primi sono costituiti sostanzialmente da oligomeri di catechina e/o epicatechina, due flavanoli molto diffusi nel regno vegetale. Vengono chiamati anche proantocianidine e, malgrado sia noto che la via metabolica che porta alla sintesi di queste sostanze inizi con la produzione di catechina ed epicatechina, e sia quindi comune a quella degli altri flavonoidi, non è ancora chiaro come avvenga la reazione di polimerizzazione [37, 36].

I tannini idrolizzabili sono costituiti da esteri di polialcoli (solitamente  $\beta$ -D-glucose) con acido gallico oppure con acido esaidrossidifenico. Nel primo caso si parlerà di gallotannini mentre nel secondo di ellagitannini [38].

Il castagno europeo (*Castanea sativa* Mill.) è noto per il suo alto contenuto di tannini, che possono venire estratti da foglie, legno e corteccia di questa pianta per interessanti applicazioni nel campo dell'industria conciaria e alimentare [39].

### 1.1.3 Saponine

Le saponine sono composti glicosidici che possono essere divisi in due gruppi in base alla struttura del loro aglicone: saponine triterpeniche e saponine steroidee (vedi Figura 1.3).

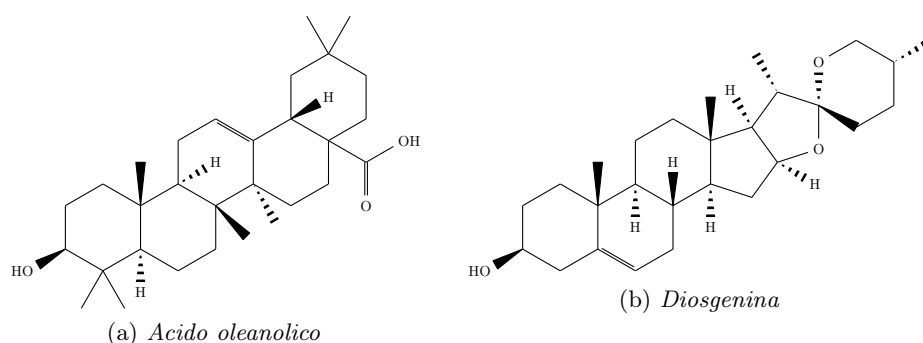


Figura 1.3: Struttura molecolare rappresentativa di due diverse saponine, triterpenica (a) e steroidea (b)

L'aglicone di una saponina è comunemente detto saponigenina; a questo possono poi essere attaccati uno, due o tre gruppi glicosidici (più un eventuale



gruppo acilico alla parte saccaridica). Inoltre, sullo scheletro, possono essere presenti diversi sostituenti quali gruppi carbossilici, ossidrilici e acilici, con conseguente grande variabilità strutturale.

Il termine "saponina" deriva dalla parola latina *sapo*, cioè sapone, e riflette la capacità di questi composti di creare in soluzione acquosa delle persistenti schiume, simili a quelle generate dai saponi. Soprattutto in passato, gli estratti di alcune piante quali *Saponaria officinalis* L. e *Quillaja saponaria* Mol. sono stati utilizzati per le loro proprietà detergenti dovute, appunto, alla presenza di saponine. Considerando la struttura molecolare di questi composti, è intuibile il loro comportamento anfifilico, dovuto alla presenza di una parte polare (uno o più saccaridi) attaccata ad una apolare (sapogenina), che permette loro di agire come dei tensioattivi [40].

Questi composti sono molto diffusi nel regno vegetale (in particolare le saponine triterpeniche), ma diverse saponine sono state isolate anche in organismi marini delle classi Holothuroidea e Asteroidea [41]. Sono tuttavia assenti nelle Gimnosperme. Nelle piante il loro ruolo non è stato ancora completamente compreso ma in generale sono considerate delle fitoalessine (dal greco *alexo*, "difendere" e *phytos*, "pianta"), cioè delle sostanze con funzione di difesa nei confronti di organismi fungini [42]. Oltre a questa attività protettiva, le saponine si sono dimostrate essere efficaci nella difesa verso altri patogeni o predatori (insetti, batteri...).

Lo studio di questi composti in diversi organismi continua tutt'ora e si dimostra di particolare importanza sia per la comprensione dei meccanismi che regolano le difese di un certo organismo, sia per l'impatto sulla salute umana che tali composti hanno. Unitamente ad altre classi di sostanze infatti, le saponine sono in grado di esercitare anche sugli esseri umani una vasta gamma di effetti biologici, e sono estesamente presenti in diversi cibi. Diverse attività biologiche sono state riportate da numerosi autori per molte saponine: antinfiammatoria [43], antiulcera [44], immuno-modulante [45], adiuvante [46], antitumorale [47] e l'elenco continuerebbe [40, 48]. È tuttavia opportuno fare delle precisazioni: questa grandissima varietà di effetti è correlata alla grande eterogeneità strutturale delle saponine e sarebbe errato considerarle (così come per altri composti come i flavonoidi) una classe omogenea [49]. Gli effetti farmacologici sono inoltre strettamente dipendenti dal modo di assunzione: è noto, infatti, che l'assunzione orale diminuisce molto la biodisponibilità e dunque l'efficacia di questi composti.

Come già accennato sopra, è possibile distinguere due classi di saponine di seguito brevemente descritte.

### **Saponine triterpeniche**

Le saponine triterpeniche, si trovano in varie piante dicotiledoni (Magnoliopsida), ma sono rare nelle monocotiledoni. Ove presenti entrano a far parte della membrana cellulare dove svolgono la loro azione difensiva [50].

Strutturalmente, l'aglicone è formato da uno scheletro di 30 atomi di carbonio (6 unità isopreniche) che si presenta frequentemente come un sistema a 5 anelli o più raramente a 4 [51], a cui possono essere attaccati i vari sostituenti e ovviamente gli zuccheri. Lo studio, la ricerca e l'identificazione di questi composti è tutt'ora in corso, ed ogni anno ne vengono segnalati di nuovi in diversi organismi. L'applicazione di maggior interesse, come anche per altre classi di molecole qui trattate, riguarda la ricerca di nuovi farmaci, viste le diverse proprietà farmacologiche. Nelle piante ricche in questi composti è dimostrata la loro valenza chemotassonomica [52]. Per le loro proprietà anti-ossidanti, negli ultimi anni rientrano nella composizione di alcuni integratori naturali [53].

### Saponine steroidee

Diversamente dalle saponine triterpeniche, le steroidee si ritrovano con frequenza maggiore nelle monocotiledoni (Liliopsida). Il loro aglicone si differenzia per lo scheletro a 27 atomi di carbonio che può presentarsi organizzato come una struttura a 6 anelli (spirostano) o 5 (furostano) [51]. Anch'esse rivestono particolare importanza per la salute umana per la varietà di effetti biologici esercitati; una delle applicazioni commerciali di maggior rilievo per queste sostanze, è stata la produzione di ormoni steroidei a partire da saponine quali la diosgenina [51, 49].

## 1.2 Liquirizia

La liquirizia è una pianta erbacea perenne appartenente al genere *Glycyrrhiza* della famiglia delle Fabaceae. La pianta può raggiungere l'altezza di un metro e si presenta con foglie pennate composte lunghe da 7 a 15 cm; i fiori sono disposti in infiorescenze di colorito violaceo. La particolarità è data dalle radici e dai numerosi stoloni che partono dal rizoma centrale e che costituiscono la parte utilizzata della pianta. Gli stoloni sono lunghi fusti sotterranei che hanno la funzione di propagare per via vegetativa la pianta. Questa via è molto più rapida di quella sessuale e permette alla pianta di colonizzare rapidamente un certo ambiente. I frutti sono dei legumi contenenti diversi piccoli semi. La liquirizia cresce naturalmente in zone in cui le precipitazioni medie annue sono comprese tra 400 e 1160 mm, le temperature medie annue variano tra 5,7 e 25 °C e il pH del suolo è compreso tra 5,5 e 8,2. In generale è una pianta rustica che cresce bene in climi caldi e secchi, pur resistendo all'azione del gelo [54]. È considerata facile da coltivare qualora siano soddisfatte le caratteristiche ambientali sopra descritte, ma, allo stesso modo, la sua crescita risulta molto difficoltosa al di fuori delle condizioni ideali.

Il termine liquirizia indica le radici e i rizomi essiccati nonché, soprattutto in Italia, l'estratto secco ed i relativi prodotti derivati. Il nome *Glycyrrhiza*

deriva da due parole in greco antico: *glykys*, che significa dolce, e *rhiza*, radice. In effetti le radici di queste piante sono conosciute da molto tempo proprio per il loro gusto dolce, dovuto alla presenza di glicirrizina. Si stima infatti che questa saponina triterpenica abbia un potere dolcificante circa 50 volte superiore a quello del normale zucchero raffinato [55]. Questa caratteristica ha fatto sì che nel tempo le radici, e i relativi estratti, siano stati e vengano tutt'ora utilizzati come aromatizzanti e dolcificanti per moltissimi prodotti dell'industria dolciaria e non (molto usata ad esempio nella lavorazione del tabacco).

La produzione tradizionale e industriale dell'estratto di liquirizia utilizza principalmente la tecnica di infusione in acqua calda o l'estrazione in corrente di vapore delle radici precedentemente lavate. Il risultato di questo processo è un estratto acquoso e un residuo solido costituito dalle radici che hanno subito il processo. Al momento, l'unico utilizzo di questo materiale è come ammendante per i suoli agricoli e, in letteratura, non sono riportati altri significativi impieghi di questo residuo; può essere quindi interessante caratterizzarlo chimicamente per poter valutare la presenza di composti bioattivi.

Questa pianta è tuttavia molto più che una semplice alternativa al saccarosio: in Europa, infatti, vanta una lunghissima tradizione come erba officinale, le cui proprietà, note già ai greci, sembrano essere state scoperte e tramandate dagli Sciti, popolazione nomade indoeuropea. Anche altri popoli hanno fatto e fanno tutt'ora uso della radice di queste piante: le prime testimonianze documentate a riguardo possono essere fatte risalire alle culture egizie, indiane e cinesi [56]. L'utilizzo di questa medicina naturale prosegue nei secoli fino ai giorni nostri dove riveste ancora un ruolo di fondamentale importanza nella medicina tradizionale cinese (*Traditional Chinese Medicine*, TCM). Questa è profondamente differente dalla medicina tradizionale europea, in cui l'effetto farmacologico è affidato nella maggior parte dei casi ad un solo "ingrediente", prevedendo in genere l'utilizzo congiunto di diverse erbe, ognuna con uno specifico "ruolo"; la liquirizia entra a far parte di più della metà delle preparazioni quale "ingrediente guida" (*guide drug*), ossia componente in grado di potenziare gli effetti farmacologici dell'ingrediente principale e di mitigarne gli eventuali effetti collaterali, oltre che migliorare il sapore della preparazione [57].

### 1.2.1 Specie principali

Il genere *Glycyrrhiza* comprende circa 30 specie diverse ed è diffuso in tutto il mondo. Tuttavia le tre specie che rivestono importanza economica sono *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza inflata* Batalin e *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

Nell'area mediterranea è caratteristica la specie *G. glabra* che cresce spontanea in diverse regioni tra cui l'Italia. In Calabria vi è infatti una delle più importanti produzioni europee detentrici del marchio DOP (denominazione

di origine protetta). Oggigiorno rappresenta un importante prodotto tipico dell'agroalimentare italiano, riconosciuto ed esportato in tutto il mondo. In generale ci si riferisce a questa specie come "liquirizia europea". Si possono distinguere inoltre alcune varietà, tra cui le due principali sono: *typica*, la liquirizia mediterranea e *glandulifera*, che cresce nelle regioni dell'est europa e della Russia europea [58].

In Cina, malgrado la farmacopea identifichi tutte e tre le specie qui nominate come liquirizia (*Gan-Cao* in Cinese), la specie dominante per produzione è *G. uralensis*, tanto che si stima essere il 90% della produzione totale. *G. inflata* riveste comunque una certa importanza soprattutto in alcune aree. [59, 52]. Queste due specie sono abitualmente identificate come "liquirizia cinese", nonostante anche *G. glabra* cresca e venga utilizzata in Asia, seppure marginalmente.

Le differenze morfologiche tra le specie sono minime e di difficile interpretazione, soprattutto per quanto riguarda le radici che sono di fatto non distinguibili con certezza. Essendo la radice la parte commercializzata ed essendoci un certo interesse nella contraffazione, in quanto ad esempio la liquirizia di Calabria detiene il marchio DOP, la possibilità di distinguere il prodotto con un metodo chimico veloce ed affidabile trova applicazione nel controllo di qualità e tracciabilità.

### 1.2.2 Proprietà e composizione

Il composto chimico presente in queste specie che riveste il maggior interesse è senz'altro la glicirizina, ma molti altri composti, quali acido glicirretinico, liquiritigenina, licocalcone A e glabridina, sono stati descritti da numerosi autori [59, 60, 61, 62]. La glicirizina può arrivare a costituire il 10% del peso secco della radice [55], tuttavia il contenuto di questa e altre molecole bioattive non è costante e può dipendere dalla specie, dalle condizioni di crescita, dal diametro delle radici [63].

La liquirizia ed i suoi estratti hanno dimostrato in diversi studi di possedere attività antivirale (di notevole importanza l'attività contro herpes virus e HIV [63]), antimicrobica (particolarmente interessante l'azione contro l'ulcera peptica dovuta al batterio *Helicobacter pylori* [64]), antinfiammatoria e antitumorale [65, 56]. Molti di questi lavori si riferiscono a studi *in-vitro* e pertanto è necessario considerarli con cautela in quanto studi *in-vivo* potrebbero dare risultati differenti. Sicuramente per quanto riguarda l'uso tradizionale della radice, è possibile citare l'attività antinfiammatoria per i sistemi respiratorio e gastrointestinale [56]. L'utilizzo di questa pianta deve tuttavia essere condotto con cautela in quanto non privo di effetti collaterali; in particolare, il più noto, attribuito alla glicirizina, riguarda l'innalzamento della pressione sanguigna e lo sviluppo di una sindrome detta pseudoiperaldosteronismo. Questa è dovuta ad un'interferenza nel metabolismo del cortisolo a livello renale causato dall'attività inibitoria

della glicirrizina verso l'enzima  $11\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi; il risultato è un'accumulo di cortisolo intracellulare, che avendo affinità per il recettore dell'aldosterone (ormone in grado di agire sui livelli di sodio e potassio) provoca l'accumulo di sodio e l'eliminazione di potassio. In questo modo compaiono i sintomi dell'ipertensione e della ritenzione idrica. L'effetto è fortunatamente reversibile con la semplice interruzione dell'assunzione di prodotti a base di liquirizia; tuttavia, se ciò non avviene, la sindrome può aggravarsi fino ad avere esiti fatali, soprattutto in individui predisposti che già presentano condizioni di pressione sanguigna elevata. Affinché si manifestino questi effetti la dose assunta deve essere comunque molto alta, superando i 50 g al giorno per un periodo superiore a 6 settimane [66].

### 1.3 Vite

La vite è una pianta appartenente al genere *Vitis*, della famiglia delle Vitaceae, e comprendente circa 60 specie, generalmente interfertili, distribuite in Asia, Nord America ed Europa [67]. Le piante del genere *Vitis* sono solitamente rampicanti perenni, con apparato radicale molto sviluppato. Organi specifici derivati da modificazioni del fusto detti viticci, consentono alla vite di aggrapparsi a sostegni di vario tipo. I fiori sono organizzati in infiorescenze a grappolo e i frutti sono delle bacche, dette acini. L'aspetto delle foglie varia molto tra specie e anche tra varietà e sono un carattere morfologico molto utilizzato nel riconoscimento delle cultivar [68].

La vite europea, *Vitis vinifera* L., è una delle piante più coltivate al mondo e da più lungo tempo [69]; si pensa che la domesticazione della vite selvatica (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi) da cui derivano le odierne varietà (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) sia iniziata tra il settimo e il quarto millennio a.C., in una regione compresa tra il Mar Nero e l'odierno Iran. Durante i millenni la specie è stata quindi selezionata e modificata, originando una moltitudine di cultivar distinguibili soprattutto per il fatto di essere ermafrodite, a differenza della sottospecie selvatica che è dioica [67, 70]. In genere cresce bene in un clima temperato, con estati calde necessarie per la maturazione dei frutti.

#### 1.3.1 Storia recente

*V. vinifera* è una delle piante economicamente più importanti al mondo [71] ed in particolar modo in paesi come Italia, Spagna e Francia, dove la sua coltivazione e la produzione di vino dai suoi frutti vantano una lunghissima tradizione. Tuttavia, durante la seconda metà del XIX secolo, la viticoltura in Europa conobbe una grave crisi che portò quasi all'estinzione la vite europea e causò la perdita di molte varietà. Questa crisi fu causata principalmente da agenti patogeni di origine nordamericana quali la peronospora della vite (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni), l'oidio

della vite (*Uncinula necator* (Schw.) Burr) [69] e soprattutto la fillossera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch), parassita delle piante del genere *Vitis* in grado di attaccarne le radici causando delle alterazioni morfologiche che ne compromettono la funzionalità [72]. Specie di vite americane quali *Vitis rupestris* Scheele, *Vitis riparia* Michx., *Vitis labrusca* L. e *Vitis berlandieri* Planch. (ed altre), sono però naturalmente resistenti a questo parassita essendosi evolute adattandosi alla presenza dello stesso. Da qui nacque l'idea di utilizzare queste piante come portainnesto (vedi sezione successiva) per la vite europea consentendone la sopravvivenza e l'estensiva coltivazione fino ai giorni nostri.

Nei primi anni successivi all'avvento della fillossera si tentò una strada diversa, cercando di ottenere degli ibridi produttori diretti, cioè in grado di essere coltivati direttamente senza l'ausilio di un portainnesto; per fare ciò sono stati effettuati diversi incroci tra viti americane ed europee. Le prime infatti, in larga parte, non erano ancora state addomesticate e non erano adatte alla produzione di vino. I risultati più noti nella regione Veneto di queste selezioni sono i vitigni Clinton (*V. riparia* × *V. labrusca*) e Isabella (ibrido di *V. labrusca*, da cui si produceva il vino "Fragolino"). Il vino ottenuto aveva un caratteristico sentore di "selvatico", che gli anglosassoni denominano "foxy", ma che tuttavia riscontrò un notevole successo popolare. Questo almeno fino alla messa al bando in Europa di tutti i vitigni non europei: secondo il Regolamento (CE) N. 1493/1999 è infatti proibito vinificare qualunque uva che non provenga da una varietà appartenente alla specie *Vitis vinifera*. Le ragioni di questo divieto sono tutt'ora oggetto di dibattito, in quanto alla giustificazione scientifica (il vino ottenuto da queste piante conterrebbe una percentuale più elevata di metanolo e per questo ritenuto pericoloso per la salute), si affiancarono innegabili interessi protezionistici verso la vite europea che vedeva minacciato il suo "monopolio" da queste nuove piante dotate di resistenza ai parassiti, dunque più economiche da coltivare e mantenere, e che producevano un vino non certo di qualità ma sicuramente popolare.

In anni recenti, visto il massiccio utilizzo di prodotti fungicidi richiesti dalla coltura delle varietà di *V. vinifera*, si è posta l'attenzione sulle specie americane per la loro resistenza alle malattie e la ricchezza in metaboliti secondari [73]. Infatti il Regolamento (UE) N. 1308/2013 del Parlamento e del Consiglio, all'articolo 81 definisce le varietà di uva da vino come appartenenti alla specie *V. vinifera* o a suoi incroci con altre specie dello stesso genere, escludendo però le varietà Noah, Othello, Isabella, Jacquez, Clinton e Herbemont.

### 1.3.2 Innesto

La pratica dell'innesto è comunemente utilizzata in agricoltura, soprattutto in impianti permanenti ma talvolta anche per specie annuali, per unire le caratteristiche di un apparato radicale resistente e meglio adattato alle condizioni locali, con la parte superiore della pianta selezionata invece per

la produzione ottimale (solitamente di frutta) [74]. La parte inferiore della pianta, comprendente l'apparato radicale e la porzione basale del fusto, viene detta appunto "portainnesto", mentre la parte superiore, costituita dalla porzione di pianta inserita nel portainnesto, viene chiamata "nesto". Questa pratica consente inoltre di riprodurre le piante per clonazione, mantenendo quindi intatte le caratteristiche della varietà coltivata, evitando incroci e ibridazioni tipici della moltiplicazione per seme. Si stima che la padronanza di tale tecnica sia avvenuta intorno al 1800 a.C. e si ritiene abbia favorito lo sviluppo della domesticazione delle piante perenni, contribuendo in modo decisivo all'evoluzione della moderna agricoltura [75].

Per quanto riguarda la vite, dopo la crisi della fillossera, sono stati sviluppati diversi tipi di portainnesto, incrociando (non sempre in modo chiaro e ben documentato) le varie specie e/o selezionando diverse cultivar, cercando di combinare caratteristiche quali la resistenza alla siccità, ai suoli calcarei (tipici dei vigneti europei, possono limitare l'assorbimento di ferro portando la pianta a sviluppare clorosi ferrica [76]), alla fillossera nonché ad altri tipi di parassiti come alcuni nematodi. L'interazione tra portainnesto e nesto è molto complessa e ancora oggetto di studio; sono diverse le caratteristiche che il primo può imprimere al secondo (come le già citate resistenze ma anche il vigore), ma è noto che anche il nesto può influenzare lo sviluppo dell'altro organismo [77, 78, 79]. Studi accurati sulle caratteristiche metaboliche dei portainnesti sono quasi assenti in letteratura in quanto i lavori fatti finora si sono concentrati su pochi organismi (i più utilizzati commercialmente) e riguardano principalmente l'assorbimento di nutrienti dal suolo. La caratterizzazione metabolica di tali organismi è però di sicuro interesse nell'ambito agronomico, permettendo di comprendere meglio le caratteristiche del portainnesto, ed in quello ambientale, dato che uno studio di questo tipo potrà servire da base per la comprensione dei meccanismi di difesa delle piante dalle avversità, portando auspicabilmente allo sviluppo di varietà che richiedano meno trattamenti fitosanitari, o sviluppando nuovi prodotti maggiormente ecocompatibili a partire dai metaboliti secondari delle piante stesse.

### 1.3.3 Proprietà e composizione

La vite è utilizzata soprattutto per la produzione di uva o vino e altri derivati. Tuttavia in alcuni paesi come Turchia, Grecia ed altri, le foglie di vite costituiscono un alimento molto diffuso, sia fresco che conservato in salamoia [80]. Le foglie di *V. vinifera* sono anche state utilizzate a scopo medicinale da diverse popolazioni.

La produzione di fitoalessine da parte della vite è nota da tempo, in particolare il resveratrolo ed i suoi derivati oligomerici (quali  $\epsilon$ - e  $\alpha$ -viniferina), sono stati descritti da tempo [81]. Il resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene, Figura 1.4) è un composto fenolico non flavonoide presente nell'uva e nella vite. Chimicamente fa parte degli stilbenoidi, composti derivati dalla struttura base

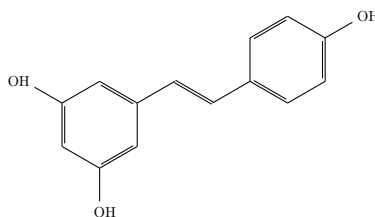


Figura 1.4: Struttura molecolare del resveratrolo

dello stilbene, un idrocarburo costituito da due fenili presenti come sostituenti su una molecola di etene (anche detto etilene). Resveratrolo e suoi derivati oligomerici rivestono un ruolo importantissimo nella vite, essendo attivi contro i patogeni *Botrytis cinerea* Pers. (muffa grigia) e *P. viticola* (peronospora), due delle maggiori avversità della vite [82]; vengono inoltre prodotti dalla pianta in risposta alla radiazione UV [81]. Sono dei composti tipici della vite e dei suoi frutti, ma la loro abbondanza in natura in altri organismi è limitata [83]. Diversi studi sembrano attribuire al resveratrolo e alle viniferine importati effetti sulla salute umana, quali l'attività antiossidante, protettiva nei confronti di malattie degenerative, antitumorale, neuroprotettiva [84, 85, 86, 87, 88].

Molto presenti nella pianta e nei suoi frutti sono anche i tannini, composti fenolici derivati oligomerici dei flavonoidi. Queste sostanze svolgono nella pianta un ruolo difensivo, ma intervengono anche in alcuni meccanismi di regolazione.

Le foglie di vite sono state utilizzate per la cura di ipertensione, vene varicose, disturbi gastrointestinali, per abbassare i livelli di glucosio nel sangue di persone affette da diabete; presentano inoltre proprietà epatoprotettive. La loro ricchezza in composti antiossidanti consente di svolgere una certa attività neuro-protettiva. [80].

## 1.4 Elicriso

Elicriso è il nome volgare del genere *Helichrysum*, appartenente alla famiglia della Asteraceae e diffuso in tutto il mondo con circa 600 specie. Un numero così alto di specie si traduce in una variabilità interspecifica molto alta e la tassonomia di queste piante è tutt'ora oggetto di discussione. Si presentano in genere come piante erbacee o piccoli arbusti perenni tipicamente odorosi. Caratteristica distintiva sono i piccoli fiori raccolti in capolini e particolarmente persistenti. È classificata come una pianta xerofila (i.e. adatta a sopravvivere in ambienti aridi) e in Europa è molto diffusa nell'area mediterranea, dove cresce in zone tipicamente sabbiose o pietrose nelle quali il genere è rappresentato da diverse specie. Tra le più studiate vi sono *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench e *Helichrysum stoechas*



(L.) Moench [89]. Queste piante sono inoltre in grado di crescere in un ampio intervallo di altitudine (fino a 2200 m s.l.m.).

Anche per questa pianta le testimonianze dell'utilizzo medicinale sono molto antiche e possono essere fatte risalire all'antica Grecia del III secolo a.C.; in seguito la pianta mantenne la sua importanza come erba officinale ed è possibile ritrovare testimonianze scritte risalenti al Rinascimento. Tuttavia, in queste prime descrizioni della pianta e del suo utilizzo, spesso non viene fatta distinzione di specie all'interno del genere *Helichrysum*; questo fatto è probabilmente dovuto alla grande complessità del genere [89].

#### 1.4.1 Proprietà e composizione

Recentemente, date le proprietà di queste piante testimoniate dall'uso tradizionale, vi è un rinnovato interesse nello studio dei loro componenti e dei loro effetti sull'essere umano.

*H. arenarium* è utilizzato in Europa centrale per le sue proprietà antisetliche e spasmolitiche; nelle ultime decadi sono stati riportati effetti epatoprotettivi, coleretici e antiossidanti [90]. La specie *H. stoechas* è segnalata per il suo utilizzo tradizionale in Spagna e Portogallo come rimedio per raffreddore, febbre e bronchite e per il potere antinfiammatorio, ed è stato dimostrato il potere antiossidante dei suoi estratti idroalcolici [91, 89]. Infine, alcuni studi su *H. italicum* hanno dimostrato che queste piante posseggono proprietà antinfiammatorie, antispasmodiche, antimicrobiche e insetticide, ma vengono segnalati anche possibili effetti avversi quali l'interazione con altre sostanze o farmaci [89, 92].

Generalmente, molte delle proprietà officinali di queste piante sono attribuite alla presenza di diversi composti fenolici ed in particolare flavonoidi. Sono stati riportati ad esempio, come principali costituenti polari, acido chinico, acido caffeico e loro derivati (acidi clorogenici, Figura 1.5) [93, 94], importanti flavonoidi come i glucosidi di quercetina, apigenina e miricetina [91]. Studi sulla componente volatile hanno evidenziato una notevole presenza di composti terpenici nell'olio essenziale, come acetato di nerile (componente maggiore e responsabile del tipico odore), propanoato di nerile e  $\alpha$ -pinene e sesquiterpeni [95].

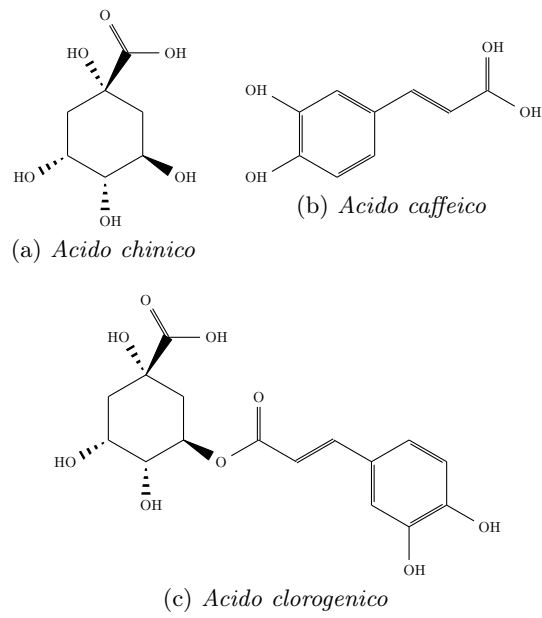


Figura 1.5: Struttura molecolare tipica degli acidi clorogenici

## Capitolo 2

# Materiali e metodi

### 2.1 Descrizione dei campioni

#### Campioni di liquirizia

Sono stati analizzati campioni di radice di liquirizia commerciali di specie diverse. Le radici erano in tutti i casi già essiccate, ma prima della macinatura con il mulino si è preferito eliminare eventuali residui di umidità trattando i campioni in stufa ad una temperatura di 40 °C per 24 h. In totale sono stati analizzati 6 campioni di *G. glabra*, di cui 5 provenienti dall'Italia (Calabria) e 1 dalla Russia, 3 di *G. uralensis* e 1 di *G. inflata* provenienti dalla Cina. Come già specificato ogni campione era costituito da una quantità di radice ritenuta sufficientemente rappresentativa della specie; nel caso particolare della specie *G. inflata*, il campione era costituito da una miscela di radici affettate del peso di circa 1 kg.

#### Campioni di vite

In questo lavoro, grazie alla collaborazione con il CRA-VIT (Centro di ricerca per la viticoltura) di Conegliano, è stato possibile reperire un vasto numero di campioni di foglie provenienti dalla collezione interna dell'ente. Gli organismi erano tutti approssimativamente della stessa età e cresciuti nelle medesime condizioni sullo stesso appezzamento di terreno. Le foglie, prelevate nel medesimo periodo (tra giugno e agosto 2015), sono state liofilizzate e conservate in provette di polietilene a 4 °C fino al momento delle analisi. Dato il grande numero e l'alta variabilità, i campioni sono stati suddivisi in macro-gruppi in base alla composizione parentale come indicato in Tabella 2.1, esplorando quindi la variabilità del metaboloma tra queste classi.

Tabella 2.1: Elenco e suddivisione dei campioni di vite

Gruppo	Nome	Parentali
1	COSMO 2 ISV 1	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	COSMO 10	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	161.49 C.	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	34 E. M.	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	TELEKI 5C ISV 1	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	TELEKI 8 B FERRARI ISV 1	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	KOBER 5 BB ANTAV 3	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	125 AA Fb 26	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	SO4 ISV-VCR 4	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	BINOVA	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	420 A INRA 2064	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
	420 A ISV1	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
Geisenheim 5 C	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>	
2	779 PAULSEN ISV 1	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
	1103 PAULSEN ANTAV 113	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
	1447 PAULSEN	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
	21bis	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
	57 RICHTER	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
	99 RICHTER 13	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
	110 RICHTER	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
	140 RUGGERI ISV 1	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
3	101.14	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
	101.14 ANTAV 3	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
	SCHWARZMANN	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
	3309 C.	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
	216-3 CASTEL	( <i>V. riparia</i> × <i>Vitis solonis</i> Planch. ) × <i>V. rupestris</i>
	GOLIA	( <i>V. riparia</i> × <i>V. vinifera</i> ) × <i>V. rupestris</i>

*Continua nella prossima pagina*

*Continua dalla pagina precedente*

Gruppo	Nome	Parentali
4	41 B	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. vinifera</i>
	333 E.M.	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. vinifera</i>
5	DOG RIDGE	<i>Vitis candicans</i> Engel. × <i>V. rupestris</i>
	SALT CREEK	<i>V. candicans</i> × <i>V. rupestris</i>
	Vitis champinii	<i>V. candicans</i> × <i>V. rupestris</i>

*Si conclude dalla pagina precedente*

### Campioni di elicriso

Per quanto riguarda le piante del genere *Helichrysum*, sono state analizzate cinque specie, due provenienti dalla Russia e tre dall'Italia. In particolare, *H. arenarium* ed *Helichrysum nogaicum* Tzvelev dalla zona della città di Astrachan' e *H. italicum*, *Helichrysum hyblaeum* Brullo e *H. stoechas* dalla regione Sicilia. Di particolare interesse è la specie *H. nogaicum*, endemica della regione di Astrachan', e su cui non vi sono riferimenti in letteratura.

Dopo l'essiccazione, i fiori, cioè la parte officinale della pianta, sono stati separati e sottoposti ai rimanenti passaggi procedurali.

## 2.2 Trattamento dei campioni

Il trattamento dei campioni segue le regole generali stabilite da protocolli già pubblicati per l'analisi metabolomica [96].

I campioni delle tre differenti matrici hanno subito lo stesso trattamento, con lievi modificazioni per adattarsi alle diverse caratteristiche. In generale tutti i campioni sono stati essiccati prima della macinatura con il mulino a sfere (MM 400, Retsch, Verder Scientific, Haan, Germany), strumento adatto ad assicurare l'omogeneità del diametro delle particelle e la riproducibilità della procedura. Sono state utilizzate giare e sfere in PTFE (politetrafluoroetilene). Tra un campione e l'altro, le giare, le sfere e qualunque altro materiale venuto in contatto con il campione (pinze, spatole...) sono stati accuratamente lavati con acqua ultrapura e metanolo superpuro. Ogni campione è stato macinato per cinque minuti ad una frequenza di 20 Hz; i campioni erano costituiti in genere da più individui appartenenti alla medesima specie, ma ovviamente non è stato possibile macinarli insieme a causa della capienza

limitata delle giare del mulino. Pertanto, terminata questa fase, i campioni della stessa specie sono stati uniti ed omogeneizzati. In questo modo ogni campione risulta essere formato da più individui della stessa specie e può essere considerato rappresentativo di essa e della sua variabilità intraspecifica. Successivamente sono state pesate 3 aliquote da 50 mg da ciascun campione omogeneo e poste in provette eppendorf da 2 mL. Al fine di mantenere la riproducibilità della procedura, fondamentale per il confronto fra più campioni data la natura dell'analisi qualitativa, le pesate sono state effettuate mantenendo una variazione massima del peso di  $\pm 2$  mg. Per ogni matrice analizzata sono stati creati inoltre dei campioni chiamati "MIX" prelevando un'aliquota da ogni specie e preparando poi tre repliche da 50 mg come per qualunque altro campione. Questi MIX sono stati analizzati inserendoli lungo tutta la sequenza dei campioni per controllare la riproducibilità strumentale come da protocollo [96].

Ad ogni provetta eppendorf sono stati aggiunti 1,5 mL di miscela estraente, costituita da metanolo (75%) e acqua ultrapura (15%) acidificati con acido formico (0,1%), ed uno standard interno marcato (fenil- $^{13}\text{C}_6$  acido salicilico) per controllare la ripetibilità della procedura di trattamento dei campioni. L'estrazione è avvenuta mediante bagno ad ultrasuoni per 30 minuti, alla quale è seguita la centrifugazione per 20 minuti a 14 000 rpm; in seguito i surnatanti sono stati raccolti e filtrati con filtri in PTFE ( $\text{\O} 25$  mm,  $0,2 \mu\text{m}$ ). Gli estratti così ottenuti sono stati analizzati infine mediante HPLC-HRMS.

## 2.3 Analisi strumentale

La metodologia analitica utilizzata è stata sviluppata internamente al gruppo di ricerca ed è stata precedentemente pubblicata [4, 7]. Il metodo è stato creato considerando la necessità di separare ed identificare il più largo spettro di metaboliti possibile, pertanto è stato ricercato il miglior compromesso per quanto riguarda i parametri strumentali.

Lo strumento utilizzato è un cromatografo UltiMate 3000 (Dionex), accoppiato a un ESI-LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA).

### 2.3.1 Cromatografia

La separazione cromatografica è avvenuta attraverso una colonna SB-Aq Narrow Bore RR  $2.1 \times 150$  mm,  $3,5 \mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Wilmington, USA) e utilizzando come fasi mobili acqua (eluente A) e acetonitrile (eluente B), entrambi acidificati con lo 0,01% di acido formico. La corsa cromatografica, schematizzata in Figura 2.1, inizia con una fase isocratica di 5 minuti al 100% di eluente A, seguita da 40 min di gradiente fino al raggiungimento del 100% di eluente B. La colonna viene dunque mantenuta in queste condizioni per 15 min e riportata in seguito al 100% di acqua per altri 15 min in modo da

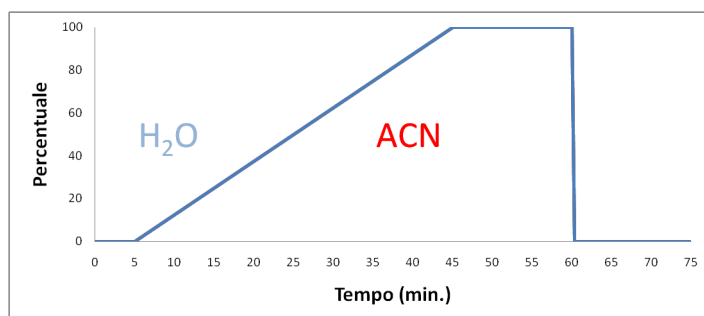


Figura 2.1: Gradiente cromatografico utilizzato

condizionarla per l'analisi successiva. Il flusso dell'eluente è stato impostato a  $200 \mu\text{L min}^{-1}$ , mentre il volume di iniezione del campione era di  $5 \mu\text{L}$ .

### 2.3.2 Spettrometria di massa

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

Le analisi sono state condotte in modalità full scan in un range di massa compreso tra  $90$  e  $1500 \text{ Da}$ . Il potere risolvente è stato impostato a  $60\,000$ . Per poter ottenere informazioni sulla struttura molecolare dei composti di interesse, 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.

La calibrazione esterna mediante apposita soluzione calibrante assicura un'accuratezza di massa inferiore alle  $5 \text{ ppm}$ . La riproducibilità della procedura è stata controllata, come già detto, mediante l'utilizzo di uno standard interno, la cui intensità di segnale è risultata essere comparabile tra i campioni della stessa matrice ( $\text{CV}=7\%$ ). La riproducibilità strumentale è stata invece controllata mediante l'analisi dei campioni "MIX" nel corso di ogni sequenza.

## 2.4 Trattamento dati

I dati ottenuti mediante analisi HRMS in modalità full scan, data l'enorme mole di informazioni generata, sono difficilmente trattabili senza un'adeguata elaborazione mediante programmi dedicati; è pertanto necessario disporre di appositi strumenti software atti ad estrarre l'informazione utile. In questo lavoro, tutti i dati relativi ad ogni pianta analizzata sono stati elaborati con i medesimi strumenti e criteri, rendendo molto confrontabili i dati tra loro, pur tenendo conto della diversità delle matrici.

### 2.4.1 MetAlign

Per l'allineamento dei cromatogrammi e la correzione della linea di base (eliminazione del rumore di fondo strumentale) è stato utilizzato il software MetAlign 3, free e open source, sviluppato e scritto da Arjen Lommen [97] presso l'istituto RIKILT Wageningen University & Research (Olanda). Questo programma è stato sviluppato appositamente per l'elaborazione dei dati ottenuti in spettrometria di massa operando in modalità full scan, sia in massa nominale (quadrupolo) che massa accurata (Tempo di volo, Orbitrap). Consente all'operatore di operare selezionando specifici parametri mediante un'interfaccia grafica minimale ma efficace, e in molti casi si è dimostrato più efficiente di altri software proprietari (Sieve 2.0, Thermo Scientific). L'utente può impostare parametri molto importanti quali: la soglia minima di intensità di segnale al di sotto della quale il dato viene escluso, un fattore moltiplicativo della precedente soglia (normalmente un picco cromatografico è considerato tale se supera la linea di base di un fattore 3), un parametro di selezione della pendenza minima che deve avere un picco ed altri parametri relativi all'allineamento dei cromatogrammi.

Il software può ricevere come input dei file nei più diffusi formati proprietari (come ".raw" per Thermo Scientific) e non, generando infine un output costituito dai cromatogrammi corretti per il rumore di fondo e allineati.

### 2.4.2 MSClust

Dalla stessa pagina web è disponibile per il download il software MSClust, anch'esso free e open source, indispensabile per la successiva fase di elaborazione. Questo programma genera infatti un output costituito da una lista di segnali di massa (possibili metaboliti) con le relative intensità di segnale in ogni campione. MSClust è in grado di elaborare i dati generati da MetAlign, riconoscendo, attraverso un particolare algoritmo, le correlazioni esistenti fra i segnali di massa in uno stesso campione e tra campioni diversi, e individuando quindi quali segnali possono essere attribuiti ad una stessa molecola (pattern isotopico, addotti, eventuali dimeri, ioni dicarica. . .). Anche in questo caso si possono impostare alcuni parametri che influiranno sul grado di accorpamento dei segnali di massa operato dal software.

### 2.4.3 Test ANOVA

Il passaggio successivo prevede di utilizzare metodi statistici per ridurre il numero di variabili, in particolar modo eliminare eventuali variabili non significative per la differenziazione delle specie. Il metodo più utilizzato in questi casi è l'analisi della varianza, anche detta test ANOVA (*analysis of variance*), che, operando un confronto tra la varianza interna ad un campione e la varianza tra diversi gruppi di campioni, è in grado di determinare se la variabilità di un parametro da un gruppo ad un altro è dovuta al caso



oppure no. In questo ultimo caso la variabile è considerata statisticamente significativa. In questo genere di studio il test ANOVA si rivela molto importante dato l'altissimo numero di variabili in gioco, che rende necessaria una riduzione delle stesse prima di procedere ad ulteriori analisi. Per effettuare questo test, i dati ottenuti con le precedenti elaborazioni software delle analisi in modalità negativa e positiva sono stati uniti in un'unica matrice eliminando le eventuali ripetizioni (molecole rilevate in entrambe le modalità). Su questa base di dati è stato poi eseguito il test ANOVA mediante la piattaforma online MetaboAnalyst 3.0 [98], software free basato su R, in grado di operare molti tipi di analisi statistiche in modo semplice ed efficace grazie ad un'interfaccia grafica intuitiva. Non è infatti necessario conoscere specifici linguaggi per poter utilizzare questo programma.

Il livello di significatività (*p-value*) è stato impostato a 0,01; le variabili con valore superiore sono state dunque scartate.

#### 2.4.4 Analisi multivariata

Per poter esplorare lo spazio multivariato sono state utilizzate due tecniche di *Pattern Recognition*:

- Analisi dei cluster (HCA, *hierarchical cluster analysis*)
- Analisi delle componenti principali (PCA, *principal component analysis*)

La prima permette di capire in che modo possono essere raggruppati i campioni (oggetti) ad un livello di similarità crescente (o decrescente). L'analisi dei cluster opera stabilendo delle gerarchie di appartenenza utilizzando una certa metrica, mentre per decidere con che criterio un cluster si unisce ad un altro, viene utilizzata una funzione matematica detta algoritmo di clustering. In questo caso è stata utilizzata come metrica la distanza euclidea, mentre, come algoritmo di clustering, il metodo di Ward. Tipicamente il risultato di queste analisi viene visualizzato in un grafico detto dendrogramma, in cui vengono mostrati i gruppi di campioni che si formano a diversi livelli di similarità. In questo caso si è fatto uso dello strumento detto heatmap, che all'analisi sugli oggetti unisce anche quella sulle variabili, rappresentando l'intensità relativa di ognuna mediante celle colorate secondo una scala scelta dall'operatore. In questo modo è possibile effettuare un'interpretazione grafica piuttosto semplice, visualizzando direttamente quali sono i gruppi di variabili che caratterizzano un certo gruppo di campioni.

L'analisi delle componenti principali opera una trasformazione delle variabili riducendo la complessità della matrice originaria di dati. Le nuove variabili vengono chiamate componenti principali e, se la base di dati è sufficientemente correlata, la maggior parte dell'informazione contenuta nella matrice originaria viene riassunta nelle prime componenti principali. Oltre al vantaggio di operare con poche e significative variabili, la PCA permette

di visualizzare graficamente i dati, cosa molto difficile in uno spazio multivariato. In particolare è possibile costruire diagrammi di dispersione degli oggetti (score plot) e diagrammi di dispersione delle variabili (loading plot) nelle componenti principali. I grafici sono solitamente bidimensionali per facilitarne l'interpretazione. La PCA è stata eseguita, ove possibile, con il software Statistica 8 (StatSoft®). La scelta di operare con questo software proprietario è dovuta principalmente a ragioni di carattere pratico. Sebbene MetaboAnalyst sia perfettamente in grado di eseguire una PCA, permette una minor personalizzazione del grafico ottenuto, motivo per cui si è preferito, in questo caso, rivolgersi a Statistica. Prima di queste analisi, i dati sono stati autoscalati.

Queste due tecniche permettono di evidenziare le differenze in termini di profilo metabolico tra i campioni analizzati e sono strumenti indispensabili (insieme al test ANOVA) all'analisi metabolomica. Una volta individuati i metaboliti responsabili della diversità dei campioni si è proceduto all'identificazione degli stessi.

## 2.5 Identificazione

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

- calcolo della formula molecolare;
- confronto dello spettro di massa teorico con quello misurato;
- ricerca su database e letteratura della probabile formula;
- confronto delle frammentazioni ottenute in modalità data-dependent con quelle presenti in bibliografia o archivi online;
- eventuale calcolo e confronto dello spettro di frammentazione simulato (*in silico*) qualora non siano presenti le reali frammentazioni in letteratura;
- assegnazione di uno o più probabili nomi alla molecola oggetto di studio.

In base al grado di certezza con cui una molecola è identificata è possibile assegnare il livello di identificazione [99]:

1. composto identificato tramite confronto con standard interno, per cui vi è la certezza dell'identificazione;
2. composto probabile;
3. composto caratterizzato solamente per la classe di appartenenza;
4. composto sconosciuto o non identificato.

Ovviamente il livello uno, cioè la certezza dell'identificazione, in un'analisi qualitativa untargeted non è normalmente presente a causa del mancato utilizzo di standard interni. In taluni casi, è comunque possibile tramite confronto con precedenti analisi in cui si sono utilizzati sostanze standard, a condizione che siano state fatte con il medesimo metodo strumentale.

Il secondo livello è pertanto il risultato maggiormente sperato in questo tipo di analisi, e consiste nell'annotazione del nome più probabile di una molecola in base al confronto con i dati reperibili in letteratura e database online delle informazioni strutturali ottenute sperimentalmente.

La procedura di identificazione è il passaggio procedurale che richiede più tempo e, nonostante negli ultimi anni si siano fatti passi avanti notevoli nell'automatizzazione di questi passaggi tramite appositi software, il controllo da parte dell'operatore dell'affidabilità dei risultati ottenuti è, a parere di chi scrive, ancora fondamentale per una buona qualità del dato presentato.

Prima di procedere alla presentazione ed alla discussione dei risultati ottenuti, è bene fare una precisazione per quanto riguarda l'annotazione dei composti identificati. Dato l'alto numero di molecole individuate con le tecniche sopra descritte, non sempre è possibile fornire il nome comune in lingua italiana; in questi casi le sostanze sono state identificate con il loro nome inglese, comune quando presente o IUPAC in caso contrario.



## Capitolo 3

# Risultati e discussione

### 3.1 Analisi liquirizia

L'elaborazione dei dati con MetAlign e in seguito con MSClust ha portato alla costruzione di due matrici, una per i dati acquisiti in modalità positiva e una per i dati in polarità negativa. Prima di sottoporre questi dati al test ANOVA creando un'unica matrice (avendo cura di eliminare i dati ridondanti, acquisiti in ambedue le polarità), la matrice positiva era costituita da 528 variabili, mentre quella negativa da 652. In seguito all'elaborazione con MetaboAnalyst, la matrice unificata era costituita da 369 variabili in negativo e 226 in positivo ( $p\text{-value}<0,01$ ). Questa è stata poi utilizzata per le analisi multivariate.

#### 3.1.1 Metaboliti principali

In questa sezione verranno discussi i metaboliti delle radici di liquirizia che presentavano le intensità di segnale più alte in tutte le specie (Tabella 3.1), sempre considerando quelli con  $p\text{-value}<0,01$ .

Il metabolita principale in *G. glabra* e *G. uralensis* è la glicirrizina, la più studiata delle saponine triterpeniche presenti nelle radici di liquirizia e caratterizzata, come già scritto, da un deciso gusto dolce nonché da un ampio range di attività biologiche. Questo composto, pur essendo presente con elevate intensità in tutte e tre le specie considerate, mostra livelli di segnale strumentale significativamente più alti in *G. glabra* rispetto alla liquirizia cinese. La specie *G. glabra* risulta fortemente caratterizzata anche dalla presenza della glabridina che non si trova nelle altre specie; questo isoflavonoide è infatti un ben conosciuto marker chemotassonomico per *Glycyrrhiza glabra* al quale sono associate diverse attività biologiche [65, 100]. Altre tre saponine, licorice saponin K2 (o H2), licorice saponin B2 e licorice saponin G2 oppure yunganoside K2, si sono dimostrate caratteristiche della liquirizia europea non essendo state rilevati a livelli significativi nelle altre specie. Altri studi le hanno riportate [60], ma questa è la prima volta che viene ipotizzato un

Tabella 3.1: I dieci composti più intensi nelle radici delle tre specie di liquirizia

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
24.80	821.3971 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	glicirrizina	saponina
25.43	821.3972 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	licorice saponin K2, H2	saponina
18.37	549.1612 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	liquiritina apioside; isoliquiritina apioside	flavonoide glicoside
29.53	323.1281 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	glabridina	isoflavano prenilato
20.19	549.1611 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	liquiritina apioside; isoliquiritina apioside	flavonoide glucoside
23.08	418.1920 (-)	C <sub>28</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O	N.I.	N.I.
25.09	807.4193 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>64</sub> O <sub>15</sub>	licoricesaponin B2	saponina
23.08	837.3913 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>17</sub>	licorice saponine G2; yunganoside K2	saponina
24.00	837.3919 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>17</sub>	licoricesaponin G2	saponina
18.16	549.1613 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	liquiritina apioside; isoliquiritina apioside	flavonoide glicoside
29.83	335.0922 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	kanzonol W; licoagroisoflavone	isoflavonoide prenilato
23.37	879.4020 (-)	C <sub>44</sub> H <sub>64</sub> O <sub>18</sub>	22b-acetoxylglicirrizina	saponina
32.04	391.1909 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	kanzonol C	calcone diprenilato
20.63	417.1190 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	liquiritina; neoisoliquiritina	flavonoide glucoside
18.62	417.1190 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	isoliquiritina; neoisoliquiritigenina; liquiritina	flavonoide glucoside
32.52	423.1805 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	gancaonin E	flavonoide diprenilato
27.38	353.1391 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	licocalcone D	calcone prenilato
29.69	337.1434 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	licocalcone A, C, E	calcone prenilato
29.24	353.1023 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	N.I.	flavonoide
28.57	353.1384 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	licocalcone D (isomero)	calcone prenilato
27.70	367.1181 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	gancaonin N, B, W	isoflavone prenilato; cumarina

ruolo anche come biomarker. Generalmente la presenza di saponine è molto importante sia per le loro attività biologiche sia per il ruolo di fitoalessine.

A differenza di *G. glabra*, il profilo metabolico della liquirizia cinese sembra maggiormente caratterizzato dai composti fenolici. In particolare, la specie *G. inflata* risulta essere estremamente caratterizzata dalla presenza di licocalcone A, C, E, che, non essendo presente nelle altre specie, si può considerare un marker specie-specifico. Insieme a questo metabolita, anche il licocalcone D, già noto come marker, è stato identificato [101]. In accordo con altri studi [102], anche il composto kanzonol C è stato individuato, ma per la prima volta con intensità di segnale strumentale significativamente più alte che in altre specie. Vi è inoltre la presenza di un altro flavonoide presente a livelli significativi nella liquirizia cinese ed in particolar modo in *G. inflata*, ma non è stato possibile identificarlo ( $C_{20}H_{18}O_6$ ).

*G. inflata* e *G. uralensis* presentano dei metaboliti in comune che le distinguono dalla liquirizia europea. Ad esempio la molecola identificata come gancaonin N, B, W; in particolare, gancaonin B è un isoflavone prenilato isolato in *G. uralensis* che ha dimostrato di possedere forti proprietà neuroprotettive [103, 104].

Mentre in questa sezione sono state evidenziate le maggiori differenze tra le specie per quanto riguarda composti presenti con una certa intensità di segnale, l'analisi multivariata presentata nella sezione che segue permette di esplorare maggiormente la variabilità interspecifica, identificando nuovi marker presenti anche a bassi livelli.

### 3.1.2 Variabilità interspecifica

I dati ottenuti dal test ANOVA sono stati utilizzati per effettuare delle analisi multivariate: HCA e PCA. In Figura 3.1 è illustrato il risultato dell'analisi delle componenti principali nelle prime due componenti; la varianza spiegata cumulativa è di 59,62%. La terza componente principale non aggiungeva informazioni rilevanti sulla variabilità dei campioni, che hanno dimostrato di mantenersi piuttosto omogenei all'interno delle specie.

L'analisi dei cluster, riportata in Figura 3.2 come una heatmap, conferma quanto ottenuto con la PCA provvedendo al tempo stesso ad una visualizzazione più intuitiva delle differenze che intercorrono nella composizione metabolica dei campioni.

#### Liquirizia europea

I metaboliti con valori dei loading alti e positivi ( $>0,8$ ) nella prima componente principale, caratterizzano principalmente i campioni di liquirizia europea come è ben visibile dal grafico in Figura 3.3. Oltre al kanzonol Y e alla glabridina, flavonoidi prenilati noti per essere dei marker per la specie *G. glabra*, altri composti sono stati ritrovati esclusivamente nei campioni di

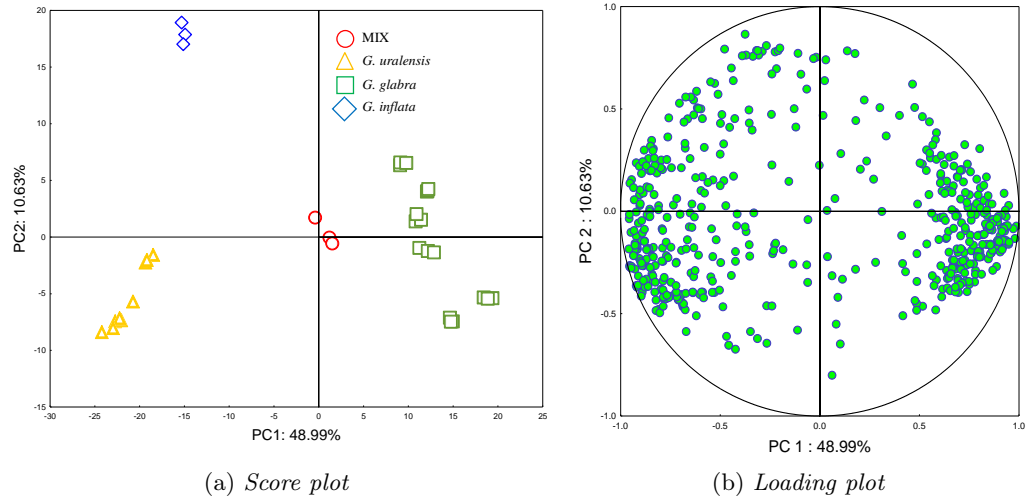


Figura 3.1: PCA ottenuta sui campioni di liquirizia per le prime due componenti principali

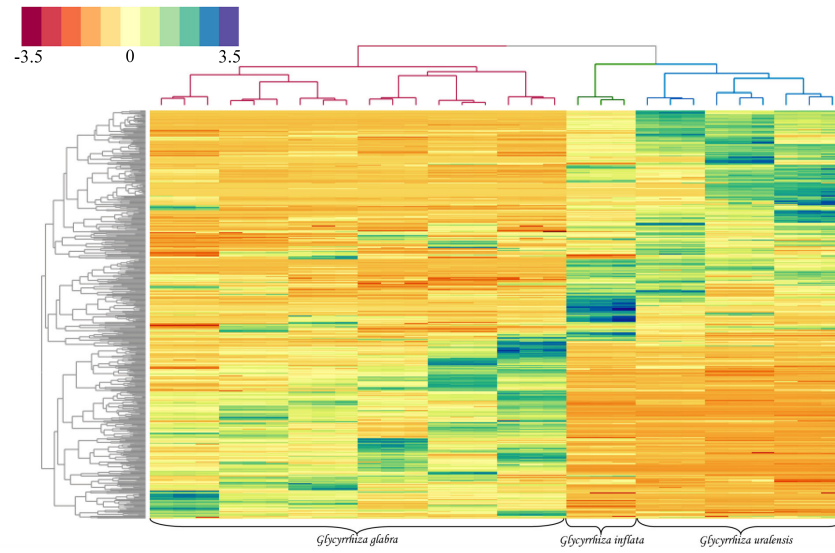


Figura 3.2: HCA: heatmap ottenuta sui campioni di liquirizia



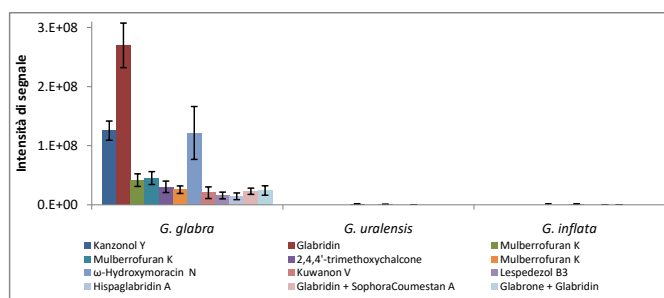


Figura 3.3: Composti caratterizzanti la specie *G. glabra* - confronto delle intensità di segnale

questa pianta: 2,4,40 trimethoxychalcone, guangsangon F, schaftoside e due composti non identificati di formula  $C_{24}H_{26}O_5$  e  $C_{45}H_{42}O_9$ . Lo schaftoside è un glicoside trovato in altre Fabaceae mentre il guangsangon F è stato isolato in piante della famiglia delle Moraceae [105]; questo è il primo studio in cui viene segnalata la presenza di questi composti nel genere *Glycyrrhiza*. Tra i composti significativi sono stati identificati cinque metaboliti di uguale formula ( $C_{40}H_{36}O_8$ ) corrispondenti a cinque diversi picchi cromatografici e il cui segnale strumentale era assente in entrambe le specie cinesi. La procedura di identificazione ha portato a pensare si tratti di un composto chiamato mulberrofuran K e suoi isomeri, noti per essere presenti nelle radici di piante della famiglia delle Moraceae [106]. Non avendo trovato riferimenti in letteratura circa la presenza di questi composti nella liquirizia, è possibile proporre il mulberrofuran K e i suoi isomeri come nuovi marker per la specie *G. glabra*. Questi non sono gli unici casi di composti normalmente trovati in altri generi ma rilevati anche nei campioni oggetto di studio:  $\omega$ -hydroxymoracin N e 2-arylbenzofuran ritrovati in piante di *Morus alba* L. [107] e kuwanon V e cudranone, due metaboliti bioattivi isolati nel genere *Morus* e *Cudrania* rispettivamente [108]. Questi ritrovamenti possono quindi suggerire un collegamento genetico tra le famiglie delle Fabaceae e delle Moraceae, e rappresentano un interessante risultato nella ricerca di composti marker per la distinzione delle specie di liquirizia.

Un altro composto mai segnalato prima è lepedezol B3, isolato in *Lespedeza homoloba* Nakai [109] e presente con intensità maggiori nei campioni di liquirizia europea. Quattro composti non identificati, probabilmente costituiti da una molecola di glabridina unita ad un altro flavonoide, sono stati isolati dall'analisi multivariata; i dimeri di flavonoidi sono stati ritrovati in vari generi di piante e sono noti per la loro attività antiossidante [110]. Ancora una volta, tuttavia, non vi sono riferimenti circa la presenza di questi composti nel genere *Glycyrrhiza*.

Hispaglabridin A, come confermato da letteratura [65], si trova solamente

Tabella 3.2: Composti caratterizzanti *G. glabra*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
31.41	409.2011 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	kanzonol Y	diidrocalcone diprenilato
34.57	657.2120 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	glabridina + sophoracou- mestan A	dimero flavonoide
24.58	410.1942 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	glicirrizina	saponina
29.53	323.1281 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	glabridina	isoflavano prenilito
33.73	657.2121 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	glabridina + sophoracou- mestan A	dimero flavonoide
32.81	645.2457 (+)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	mulberrofuran K	composto fenolico
33.25	645.2455 (+)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	mulberrofuran K	composto fenolico
33.41	659.2281 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	glabrone + glabridina	dimero flavonoide
32.84	643.2336 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	mulberrofuran K	composto fenolico
33.63	393.1702 (-)	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	N.I.	N.I.
21.26	725.2090 (-)	C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	licorice glycoside C1, C2	flavonoide glicoside
35.54	675.2225 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	guangsangon F	derivato flavanone
19.35	563.1407 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	schaftoside	flavone glicoside
33.39	643.2333 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	mulberrofuran K	composto fenolico
29.60	355.1533 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	2,4,4'-trimethoxychalcone	calcone
37.76	725.2746 (-)	C <sub>45</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	N.I.	N.I.
33.79	643.2330 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	mulberrofuran K	composto fenolico
30.60	323.1262 (+)	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	kanzonol D	flavonoide prenilito
33.00	659.2281 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	glabrone + glabridina	dimero flavonoide
28.93	325.1072 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	$\omega$ -hydroxymoracin N	2-arylbenzofuran flavonoi- de
20.19	549.1611 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	liquiritina apioside; isoli- quiritina apioside	flavonoide glucoside
31.82	647.2610 (+)	C <sub>40</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	kuwanone V	diaryleptanoide
27.45	329.1367 (+)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	cudranone	derivato benzenofenone
33.14	661.2401 (+)	C <sub>40</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	lespedezol B3	2-arylbenzofuran dimero
34.67	403.1542 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	glyinflanin G, D	calcone
34.14	391.1884 (+)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	licoflavone B	flavone diprenilato
34.16	393.2039 (+)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	hispaglabridina A	isoflavano prenilito

in *G. glabra*.

Considerando Figura 3.2, la heatmap mostra chiaramente che alcuni composti costituenti la specie *G. glabra*, sono presenti anche in *G. inflata*. In particolare, un calcone identificato come glyinflanin D o G e il licoflavone B, sono stati ritrovati solamente nei campioni di *G. inflata* e *G. glabra*. Sicuramente è interessante notare come nonostante la distanza tra le due specie vi siano ancora dei metaboliti in comune.

### Liquirizia cinese

La liquirizia cinese è caratterizzata dalla presenza di metaboliti con valori dei loading alti e negativi nella prima componente principale, che non sono presenti a livelli significativi nel metaboloma della liquirizia europea. I composti identificati come specifici di *G. inflata* e *G. uralensis* sono riportati in Tabella 3.3 e le relative intensità di segnale sono state riportate nel grafico in Figura 3.4. Le due specie cinesi si rivelano molto simili, condividendo buona parte del profilo metabolico; in particolare i già noti metaboliti gancaonin N/B/W, licocalcone D (isomero), kanzonol P, 8-alkylnaringenin 8d, glyasperin L, licoisoflavone A / glycyrrhisoflavone / allolicioli soflavone A, glyrallin A, 7-O-methyllicoricidin, isoglycycomarin, biseryvarin A sono stati ritrovati nelle radici di liquirizia cinese ma non in quelle europee.

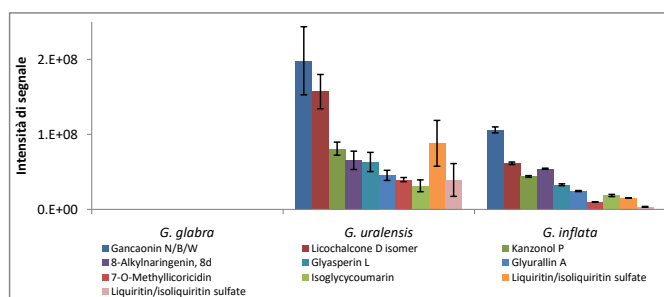


Figura 3.4: Composti caratterizzanti le specie cinesi - confronto delle intensità di segnale

Come confermato da altri studi [111], la quercetina è presente solamente nei campioni di liquirizia cinese, con intensità di segnale strumentale più alta in *G. inflata* rispetto a *G. uralensis*. La quercetina è conosciuta per il suo forte potere antiossidante oltre che antimicrobico e antiinfiammatorio. Negli ultimi anni tuttavia questo composto ha destato interesse per il suo potenziale antitumorale basato sulla sua capacità di inibire la proliferazione delle cellule cancerose modulandone i processi cellulari di crescita; in alcuni casi, come altri composti, è in grado di indurre apoptosi nelle cellule tumorali [112].

Tabella 3.3: Composti caratterizzanti le specie *G. uralensis* e *G. inflata*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
27.70	367.1181 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	gancaonin N, B, W	isoflavone prenilato; cumarina
28.57	353.1384 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	licocalcone D isomero	calcone prenilato
22.40	895.3974 (-)	C <sub>44</sub> H <sub>64</sub> O <sub>19</sub>	22-acetoxyl licorice saponin G2	saponina
31.67	367.1544 (-)	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	kanzonol P	pterocarpano
32.71	421.1653 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	isoangustone A; glyasperin A	flavonolo prenilato
31.22	369.1687 (-)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	8-alkylnaringenin, 8D	flavonoide prenilato
30.20	365.1021 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	glyasperin I	cumarina prenilata
28.64	353.1004 (+)	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	licoisoflavone B	isoflavone prenilato
29.79	353.1022 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	licoisoflavone A; glycyrrhisoflavone; allolicoisoflavone A	isoflavone prenilato
26.56	353.1367 (+)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	glyurallin A	pterocarpano prenilato
24.30	881.4189 (-)	C <sub>44</sub> H <sub>66</sub> O <sub>18</sub>	22-acetoxyl licorice saponin J2	saponina
35.35	437.2323 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	7-o-methyllicoricidin	isoflavano
26.70	369.1340 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	N.I.	flavonoide prenilato
31.58	335.0923 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	4-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl)-6-hydroxy-7-methyl-2h-chromen-2-one	cumarina
27.38	367.1183 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	isoglycycoumarin	isoflav-3-ene
22.56	301.0354 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	quercetina	flavonolo
23.24	911.4269 (-)	C <sub>45</sub> H <sub>68</sub> O <sub>19</sub>	N.I.	saponina
27.20	369.1314 (+)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	topazolin	flavonolo prenilato
23.67	881.4127 (-)	C <sub>44</sub> H <sub>64</sub> O <sub>18</sub>	22b-acetoxylglycyrrhizin	saponina
31.17	707.2823 (+)	C <sub>42</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	biseryvarin A	bi isoflavonoide
15.53	499.0916 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> S	liquiritina, isoliquiritin solfato	flavonoide solfato
15.65	631.1331 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> SO <sub>13</sub>	licuraside solfato; isoliquiritina, liquiritina apioside ssolfato	flavonoide solfato
14.95	499.0912 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> S	liquiritina, isoliquiritina solfato	flavonoide solfato
26.06	375.1843 (-)	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> S	N.I.	coniugato solfato
17.13	585.0916 (-)	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>15</sub> S	sulfomalonyl isoliquiritina	flavonoide solfato
17.73	337.0384 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> S	isoliquiritigenina, liquiritigenina solfato	flavonoide solfato
13.54	661.1439 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> SO <sub>17</sub>	isoliquiritigenina 4,4'-diglucoside solfato	flavonoide glucoside solfato
16.32	624.1749 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> O <sub>16</sub> S	N.I.	coniugato solfato
19.05	611.1076 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub> S	N.I.	flavonoide glicoside solfato
16.83	351.0540 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> S	N.I.	calcone solfato

Tra i composti identificati, un gruppo di molecole facenti parte per lo più della classe dei flavonoidi, ha dimostrato di possedere nella struttura molecolare il gruppo funzionale solfato e di essere esclusivamente presenti nella liquirizia cinese. I flavonoidi solfati sono ben noti componenti di molte piante ma il loro ruolo nella fisiologia vegetale resta ancora ignoto; in passato, alcuni autori proposero che la coniugazione con il solfato rappresenta un meccanismo di adattamento ad un ambiente caratterizzato da elevata presenza di acqua [113] o comunque da un non ottimale drenaggio del suolo. È stato osservato che, paragonati ai loro precursori, i flavonoidi coniugati con il solfato posseggono una ridotta attività biologica in conseguenza dell'incremento della loro solubilità in acqua [114, 115]. La presenza di questi metaboliti può essere correlata ad aspetti genetici o specifici meccanismi metabolici. Si può comunque notare che le specie *G. uralensis* e *G. inflata* mostrano intensità di segnale significativamente più alte di *G. glabra* anche dei corrispondenti flavonoidi non coniugati; questo risultato può suggerire che la reazione di coniugazione con il solfato venga attivata solamente in presenza di livelli rilevanti di flavonoidi prodotti e che solamente una parte di questi vada incontro a questo tipo di processo. Ad esempio è stato riportato che, tra le piante delle Fabaceae, lo zolfo e i composti solforati, giocano un ruolo importante nello stabilire le relazioni di simbiosi con i batteri fissatori di azoto [116]. In ogni caso, i risultati qui ottenuti suggeriscono che la produzione di composti coniugati con il gruppo solfato sono strettamente correlati con la liquirizia cinese, ed ulteriori studi sono necessari per meglio chiarire i meccanismi che portano alla produzione di questi composti e le conseguenze sulla salute del loro consumo.

L'analisi dei cluster conferma quanto visto con la PCA: i composti che caratterizzano *G. uralensis* appartengono a varie classi tra cui saponine, calconi, flavonoli, isoflavoni e altri flavonoidi. La maggior parte di questi composti era presente anche nel profilo metabolico di *G. inflata*, indicando una relazione tra le due specie. Come già suggerito, questa vicinanza dal punto di vista metabolico, riflette probabilmente una vicinanza genetica [117].

### **Glycyrrhiza inflata**

Nonostante quanto visto sopra circa la somiglianza tra le due specie cinesi, sono evidenziabili alcune importanti differenze nei due metabolomi. I metaboliti che posseggono un valore dei loading  $\geq 0,7$  nella seconda componente principale differenziano infatti *G. inflata* da *G. uralensis* e sono riportati in Tabella 3.4 e le loro intensità sono confrontate in Figura 3.5. Alcuni composti come i licocalconi sono già stati discussi nel paragrafo 3.1.1. Altri metaboliti includono: tre calconi prenilati, in particolare glycyrdione B e glynflavin A (e suo isomero), caratterizzano fortemente il profilo di *G. inflata*. Questa osservazione viene confermata anche dall'analisi dei cluster. In generale, come già detto, i calconi sono abbondanti nelle piante e sono precursori degli altri

flavonoidi, ma la presenza distintiva di questi composti ed in particolare della loro forma prenilata, può rivelarsi molto interessante a causa della loro nota attività biologica. *G. inflata* mostra infatti un profilo metabolico arricchito in questi composti che numerosi autori riportano avere una incrementata attività grazie alla maggiore lipofilità che consentirebbe una maggiore affinità per le membrane biologiche. Queste caratteristiche rendono la specie *G. inflata* una fonte interessante di composti ad attività farmacologica [118, 119].

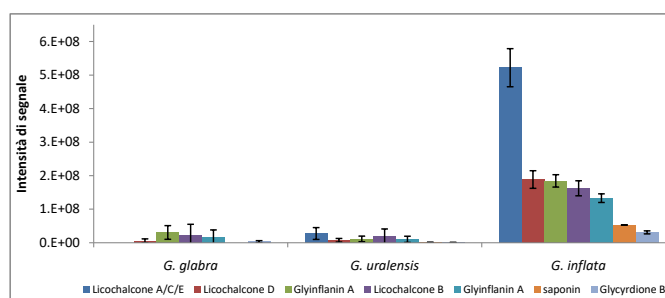


Figura 3.5: Composti caratterizzanti la specie *G. inflata* - confronto delle intensità di segnale

Tabella 3.4: Composti caratterizzanti la specie *G. inflata*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
29.69	337.1434 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	licocalcone A, C, E	calcone prenilato
27.38	353.1391 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	licocalcone D	calcone prenilato
32.19	407.1859 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	glyinflanin A	calcone diprenilato
21.88	285.0768 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	licocalcone B	calcone
35.62	407.1857 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	glyinflanin A	calcone diprenilato
32.90	407.1859 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	bartericin A; fukanemarin B; macarangaflavone B	flavonoide
32.93	391.1885 (+)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	N.I.	isoflavano
31.77	339.1234 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	N.I.	flavonoide
24.36	269.0820 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	echinatin, isoliquiritigenin 4-methyl ether	calcone
26.60	777.4070 (-)	C <sub>41</sub> H <sub>62</sub> O <sub>14</sub>	N.I.	saponina
34.79	405.1698 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	gancaonin Q	flavone diprenilato
37.85	405.1699 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	glycyrdione B	calcone prenilato
19.03	674.2454 (-)	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>14</sub>	N.I.	N.I.
24.60	793.4023 (-)	C <sub>41</sub> H <sub>62</sub> O <sub>15</sub>	N.I.	glicoside triterpenico
22.24	939.4600 (-)	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>19</sub>	N.I.	saponina
17.20	660.2296 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> O <sub>17</sub> S	N.I.	flavonoide solfato
36.28	407.1856 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	N.I.	flavonoide
39.79	475.2478 (-)	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	lespeflorin B3	flavanonolo triprenilato

Altri composti qui ritrovati si sono dimostrati essere possibili marker per la specie in esame: lespeflorin B3, isolata in una pianta della famiglia delle Fabaceae (*Lespedeza floribunda* Bunge) è un inibitore della sintesi di melanina

[120]. La presenza di questa sostanza andrebbe investigata maggiormente per capire meglio le implicazioni sulla salute umana ed eventualmente le possibilità di uso terapeutico. Un'ulteriore saponina di formula  $C_{41}H_{62}O_{14}$ , a cui non è stato possibile attribuire un nome, risulta essere composto distintivo per *G. inflata*.

## 3.2 Analisi vite

I dati ottenuti in modalità negativa uniti a quelli ottenuti in modalità positiva formavano, in seguito all'elaborazione con MSClust, una matrice di 810 variabili (possibili metaboliti). Nelle sezioni che seguono si studierà la composizione metabolica delle foglie di vite analizzate partendo inizialmente da questa matrice grezza. Per esplorare la variabilità interspecifica si opererà invece su una matrice con ridotto numero di variabili grazie al test ANOVA.

### 3.2.1 Metaboliti comuni

Come molti organismi appartenenti allo stesso genere, anche le viti condividono una larga parte del metaboloma con le specie affini. Come punto di partenza sono quindi stati identificati i metaboliti che presentavano mediamente, tra tutte le specie analizzate, le intensità di segnale strumentale più alte (Tabella 3.5).

Tabella 3.5: Elenco metaboliti mediamente più intensi nelle foglie di vite

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
18.53	477.0650 (-)	$C_{21}H_{18}O_{13}$	quercetin glucuronide (miquelianin)	o- flavonoide o-glucuronide
19.49	461.0708 (-)	$C_{21}H_{18}O_{12}$	kaempferol-o- glucuronide	flavonoide o-glucuronide
1.77	149.0092 (-)	$C_4H_6O_6$	acido tartarico	acido organico
41.14	613.4796 (+)	$C_{39}H_{64}O_5$		lipide, terpenoi- de
1.66	195.0509 (-)	$C_6H_{10}O_7$	acido glucuronico	acido organico
12.05	311.0403 (-)	$C_{13}H_{12}O_9$	acido caftarico	acido idrossicin- namico
1.66	277.0328 (-)	$C_6H_{15}O_{10}P$		monosaccaride
37.83	813.5085 (+)	$C_{54}H_{68}O_6$		steroidi o deri- vato
37.69	981.5800 (-)	$C_{51}H_{84}O_{15}+F.A.$		glicerolipide
14.14	295.0450 (-)	$C_{13}H_{12}O_8$	acido cutarico	acido idrossicin- namico
17.34	447.0910 (-)	$C_{21}H_{20}O_{11}$		flavonoide glico- side
17.55	493.0600 (-)	$C_{21}H_{18}O_{14}$	miricetina glucuronide	flavonoide o-glucuronide
19.54	447.0914 (-)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	quercitrina	flavonolo glicosi- de
34.61	997.5745 (-)	$C_{51}H_{84}O_{16}+F.A.$		galattolipide

*Continua nella prossima pagina*

*Continua dalla pagina precedente*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
41.03	819.5272 (-)	C <sub>45</sub> H <sub>74</sub> O <sub>10</sub> +F.A.	mgdg(18:3(9z,12z,15z); 18:3(9z,12z,15z))	glicerolipide
1.53	387.1132 (-)	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> +F.A.		disaccaride
19.30	417.2111 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub> +F.A.	9-hydroxy-7- megastigmen-3-one glucoside; blumenol c glucoside	glicoside di un acido grasso
39.32	959.5945 (-)	C <sub>49</sub> H <sub>86</sub> O <sub>15</sub> +F.A.	inugalattolipide A	galattolipide
1.93	439.0837 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>		xantonioide
39.41	937.5819 (+)	C <sub>51</sub> H <sub>85</sub> O <sub>13</sub> P		glicerofosfolipide
15.27	289.0707 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	(+)-catechina, (-)-epicatechina	flavanolo
38.38	758.5422 (-)	C <sub>40</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>9</sub> +F.A.		sfingolipide
39.42	591.4952 (+)	C <sub>37</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>		sfingolipide
17.52	479.0806 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>14</sub>	myricetin 3-glucuronide	flavonolo o-glucuronide
38.50	714.5474 (+)	C <sub>40</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>9</sub>		glucocerebroside
1.85	387.1129 (-)	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> +F.A.		disaccaride
15.75	371.1331 (-)	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	syringina	glicoside fenoli- co
17.88	407.0236 (-)	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>24</sub>	brevilagina I	tannino
14.54	311.0397 (-)	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>		acido idrossicin- namico

*Si conclude dalla pagina precedente*

Il metabolita che in tutti i campioni ha l'intensità più alta è il 3-O-glucuronide della quercetina, anche detto michelianina, seguito dal kaempferol-O-glucuronide. Questi composti fanno parte della classe dei coniugati glucuronidi dei flavonoidi e sono tipicamente ritrovati nel vino e nelle bucce degli acini di uva [121]. La quercetina, già discussa nella sezione 3.1.2, è uno dei più noti composti bioattivi delle piante così come il kaempferol. Entrambi si ritrovano solitamente nelle forme di diversi glicosidi o coniugati glucuronidi. La via metabolica che porta alla sintesi del kaempferol parte dalla condensazione di una molecola di 4-coumaroyl-CoA con tre di malonyl-CoA [122]. Quercetina e kaempferol si sono rivelati in grado di interagire con l'assorbimento di alcuni farmaci antitumorali migliorandone l'efficacia contro le cellule cancerose che manifestano resistenza al trattamento chemioterapico. La resistenza sembra essere dovuta alla presenza di particolari proteine della membrana cellulare che espellono il farmaco dalla cellula limitandone l'efficacia. Sono stati sviluppati diversi farmaci inibitori della resistenza ma spesso presentano effetti collaterali; non sono invece ancora segnalati effetti avversi per quanto riguarda l'assunzione di flavonoli in concomitanza a chemioterapici [123].

In generale, nel metabolismo umano, le coniugazioni con l'acido glucuronico di molte molecole naturali e non, sono una delle principali vie di escrezione di composti estranei all'organismo, dato che rendono la molecola di partenza maggiormente idrofila e ne facilitano l'eliminazione attraverso le interazioni con i trasportatori di anioni organici (OAT). D'altra parte questi meccanismi



possono anche essere fonti di problemi nel metabolismo di alcuni farmaci; un eccesso di attività da parte di queste proteine di trasporto causa infatti un accumulo della sostanza da eliminare nei reni, aumentando il rischio di danni a questi organi. Sostanze come i flavonoidi glucuronidi sono considerate inibitori degli OAT, dato che competono con altre sostanze per il trasporto nelle vie urinarie e limitano così un accumulo nei reni di composti tossici [124].

Altri metaboliti molto importanti presenti normalmente nella vite sono gli acidi organici tartarico e glucuronico e gli acidi idorossicinnamici caftarico e cutarico. L'acido tartarico è l'acido organico maggiormente presente nell'uva e nel vino e, insieme ad altri acidi organici, è stato associato a meccanismi di resistenza contro funghi e batteri [125] nell'uva e sulle foglie; l'abbassamento di pH conseguente alla presenza di questi composti inibirebbe la crescita di alcuni patogeni. Gli acidi cutarico e caftarico sono anch'essi tipicamente ritrovati in vite e uva e derivano entrambi dall'acido tartarico; come per il loro precursore, alcuni autori hanno associato questi acidi a meccanismi di resistenza ai patogeni [126]. L'acido caftarico sembra inoltre svolgere una certa attività biologica: Zhang et al., 2011 [127], riportano infatti, per la prima volta, l'attività antimutagena di questo composto.

Catechina ed epicatechina sono due flavanoli presenti in grandi quantità nella vite, nei suoi frutti e nel vino. I polimeri di questi composti vengono chiamati tannini condensati o proantocianidine e contribuiscono in modo sensibile ad alcune qualità organolettiche del frutto e del vino con caratteri quali l'amarezza e l'astringenza. Posseggono attività antiossidante anche se non forte come altri composti quali la quercetina [128], ma sono tuttavia annoverate tra i composti con attività preventiva nei confronti di malattie cardiovascolari [129]. Sono noti, inoltre, importanti effetti biologici quali l'induzione di apoptosi e l'inibizione della formazione di metastasi nelle cellule responsabili del tumore al seno [130]. Catechine e derivati svolgono nella pianta primariamente funzioni di difesa dai predatori.

Tra i composti notevoli troviamo inoltre la quercitrina, glucoside della già citata quercetina, molto conosciuta per le sue attività farmacologiche.

Molto presenti infine vari tipi di lipidi (glicerolipidi, sfingolipidi e altri), che risultano essere tra i maggiori composti delle foglie di vite da letteratura.

### 3.2.2 Variabilità interspecifica

Come specificato in Tabella 2.1, i campioni sono stati divisi in gruppi considerando la loro composizione parentale. Ogni gruppo era costituito da almeno tre campioni, ma nel caso del gruppo *V. berlandieri* × *V. vinifera* si è utilizzata la media aritmetica dei due disponibili. La matrice dei dati, dopo l'esecuzione del test ANOVA, era composta da 132 variabili. Queste sono state utilizzate per eseguire un'analisi dei cluster ottenendo come risultato la heatmap riportata in Figura 3.6. Qui è possibile vedere come i gruppi

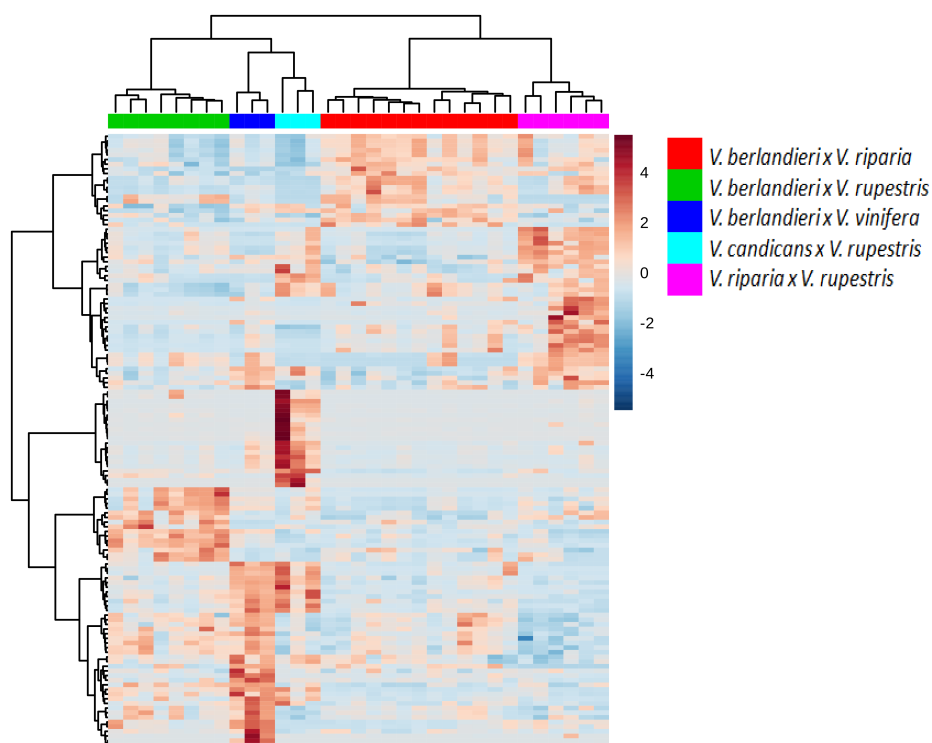


Figura 3.6: Heatmap ottenuta dall'analisi dei cluster sui campioni di portainnesto

appaiono tutti ben divisi e caratterizzati da un certo gruppo di composti. I gruppi più numerosi erano *V. berlandieri* × *V. riparia*, *V. berlandieri* × *V. rupestris* e *V. riparia* × *V. rupestris* e al loro interno vi sono alcune delle selezioni più utilizzate come portainnesto, sia in passato che oggi.

#### *V. berlandieri* × *V. riparia*

In Tabella 3.6 sono riportati i composti che maggiormente caratterizzano il gruppo *V. berlandieri* × *V. riparia* rispetto agli altri. È stato possibile, in particolare, identificare due composti, l'acido fertarico e l'acido aconitico, per i quali, malgrado siano presenti in tutti i campioni con livelli di intensità simili (ciò vale in particolare per il gruppo *V. berlandieri* × *V. rupestris*), è stata ritenuta statisticamente significativa la loro presenza in questi campioni. D'altra parte è ben visibile da Figura 3.6 come, nonostante la buona separazione dei gruppi, non vi siano differenze particolarmente marcate nelle intensità dei composti del gruppo in esame. In questo caso, dunque, non sarà possibile parlare di marker molecolari ma di composti che si presentano nel gruppo con un'intensità significativamente superiore. Le intensità medie per

ogni gruppo dei composti presente in Tabella 3.6 sono riportate nel grafico di Figura 3.7.

L'acido ferutarico appartiene alla classe degli acidi idrossicinnamici ed è formato da una molecola di acido tartarico e una di acido ferulico. È un noto metabolita dell'acido caftarico e si trova in tutta la pianta; condivide il suo ruolo con gli altri acidi della sua categoria. L'acido aconitico è un acido tricarbossilico che entra a far parte del metabolismo dell'acido citrico ed è noto per le sue proprietà antiossidanti.

Vitexin e isovitexin sono due glucosidi dell'apigenina ritrovati in diverse piante officinali e sono tipici componenti della medicina tradizionale cinese. Gli effetti a loro attribuiti sono molto simili e coinvolgono diversi sistemi includendo le attività: antitumorale, antiossidante, antinfiammatoria, antinocicettiva, anti-AD (AD, *Alzheimer's disease*), antiipertensiva, antispasmodica, antidepressiva e antivirale [131]. Non sono ad oggi riportati effetti collaterali e pertanto queste due molecole si caratterizzano come promettenti nuovi farmaci rendendo le foglie di vite un materiale interessante su cui approfondire gli studi nel campo della ricerca di nuove molecole bioattive.

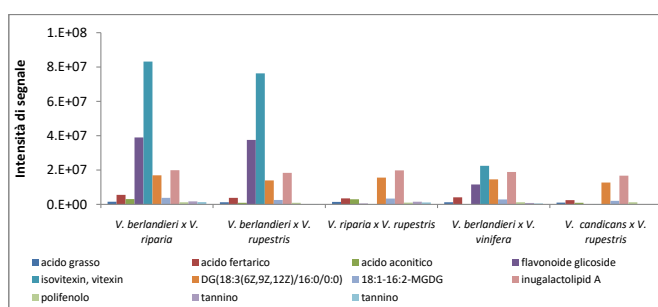


Figura 3.7: Composti caratterizzanti il gruppo *V. berlandieri* × *V. riparia* - confronto delle intensità di segnale medie

### *V. berlandieri* × *V. rupestris*

Il secondo gruppo è costituito da selezioni aventi composizione parentale *V. berlandieri* × *V. rupestris*; i composti significativi di questo gruppo sono riportati in Tabella 3.7 e le loro intensità medie sono evidenziate nel grafico di Figura 3.8. Questo gruppo è caratterizzato dalla presenza di quattro composti derivati da catechina ed epicatechina ai quali si aggiunge una procianidina, composto appartenente alle proantocianidine, costituito da un dimero della catechina e classificato come tannino condensato. Studi *in-vitro* e *in-vivo* hanno evidenziato l'attività protettiva di questi composti a carico del sistema cardiocircolatorio [132]. È noto che la sintesi di questi composti parte dalla via metabolica dei flavonoidi e pertanto sono sostanze che si ritrovano molto frequentemente nel regno vegetale e la cui distribuzione nella pianta varia con

Tabella 3.6: Composti caratterizzanti il gruppo *V. berlandieri* × *V. riparia*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
39.39	313.2719 (+)	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	N.I.	acido grasso
15.22	325.0553 (-)	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	acido fertarico	acido idrossicinnamico
2.26	173.0087 (-)	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	acido aconitico	acido organico
17.34	447.0910 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	N.I.	flavonoide glicoside
18.39	431.0964 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	isovitexin, vitexin	flavone glucoside
39.42	591.4952 (+)	C <sub>37</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	DG(18:3(6Z, 12Z)/16:0/0:0) 9Z,	lipide
42.72	797.5418 (-)	C <sub>43</sub> H <sub>76</sub> O <sub>10</sub> +F.A.	18:1-16:2-MGDG	lipide
39.32	959.5945 (-)	C <sub>49</sub> H <sub>86</sub> O <sub>15</sub> +F.A.	inugalactolipid A	lipide
1.84	875.7697 (+)	C <sub>43</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	N.I.	polifenolo
14.46	646.0427 (-)	C <sub>54</sub> H <sub>38</sub> O <sub>38</sub>	N.I.	tannino
13.74	646.0425 (-)	C <sub>54</sub> H <sub>38</sub> O <sub>38</sub>	N.I.	tannino

diversi fattori tra cui il genotipo [36]. In genere i livelli di tannini condensati aumentano con la maturazione delle foglie [36], ma in questo caso, dato che la raccolta è avvenuta a livelli simili di maturazione e le altre condizioni di crescita erano uguali, si può attribuire questo fatto a differenze genetiche tra le specie confrontate. Essendo prodotti come meccanismo di difesa contro gli insetti erbivori, è possibile supporre una migliore resistenza a questi ultimi da parte di questo gruppo di portainnesto. È stato anche suggerito che questi composti possano agire come agenti protettivi verso la radiazione UV.

Gallocatechina ed epigallocatechina sono flavanoli molto simili e strettamente correlati a catechina ed epicatechina (già discusse). Notevole inoltre in questo gruppo la presenza dei coniugati di questo composto con l'acido gallico, tipicamente ritrovati in grandi quantità nelle foglie di tè (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) [133] ma note anche in *Vitis vinifera*. La presenza dell'acido gallico sembra incrementare la capacità antiossidante (intesa come capacità di sequestrare radicali HO·) di questi composti rispetto ai loro precursori [27].

Interessante è anche la presenza della naringenina, noto flavanone che è stato possibile identificare con certezza grazie al confronto con uno standard interno. Diversi autori hanno studiato le proprietà farmacologiche di questo composto tra cui l'attività antiossidante e le proprietà antimicrobiche verso diversi microrganismi [15]. Nella pianta funge da precursore nella sintesi dei flavoni, ma l'aspetto forse più interessante è che è stato associato nella pianta dell'orzo, insieme ad altri composti, a meccanismi di resistenza verso funghi del genere *Fusarium* [134]. Questi organismi causano nei cereali diverse malattie economicamente rilevanti per i danni provocati, ma sono importanti anche nella coltivazione della vite, poiché i funghi appartenenti al genere *Fusarium* sono in grado di attaccare diversi organi.

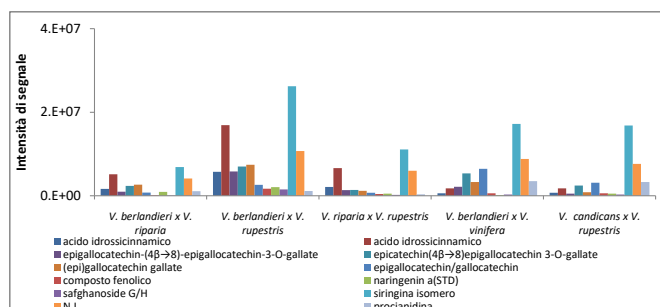


Figura 3.8: Composti caratterizzanti il gruppo *V. berlandieri* × *V. rupestris* - confronto delle intensità di segnale medie

Tabella 3.7: Composti caratterizzanti il gruppo *V. berlandieri* × *V. rupestris*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
15.45	295.0448 (-)	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	N.I.	acido idrossicinnamico
16.04	295.0451 (-)	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	N.I.	acido idrossicinnamico
1.77	149.0092 (-)	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	acido tartarico	acido organico
14.89	761.1332 (-)	C <sub>37</sub> H <sub>30</sub> O <sub>18</sub>	epigallocatechin-(4β → 8)-epigallocatechin-3-O-gallate	catechina
16.39	745.1379 (-)	C <sub>37</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	epicatechin(4β → 8)epigallocatechin 3-O-gallate	catechina
17.01	457.0753 (-)	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	(epi)gallocatechin gallate	catechina
14.35	305.0655 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	epigallocatechin, gallocatechin	catechina
14.01	577.1329 (-)	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	procianidina	proantocianidina
15.77	346.6171 (+)	C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	N.I.	composto fenolico
24.38	271.0599 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	naringenina (STD)	flavone
15.76	509.1822 (+)	C <sub>49</sub> H <sub>60</sub> O <sub>23</sub>	safghanoside G, H	glucoside
15.75	371.1331 (-)	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	siringina isomero	glucoside fenolico
15.77	183.0479 (+)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	N.I.	N.I.

***V. riparia* × *V. rupestris***

I metaboliti evidenziati tramite la heatmap di Figura 3.6 sono stati riportati in Tabella 3.8 e le loro rispettive intensità di segnale medie in Figura 3.9. Ciò che maggiormente colpisce è la presenza, rispetto ad altri campioni, di diversi tannini (non è stato possibile identificarli tutti) ed in particolare la vescalina (anche detto castalina), un ellagitannino (classificato come tannino idrolizzabile), presente con due picchi cromatografici distinti, probabilmente dovuti alla presenza di un isomero di struttura molto simile. Questa classe di composti è stata descritta in altre piante ma mai in foglie di vite prima di Becker et al., 2013 [126], dove rilevarono degli ioni attribuibili a queste sostanze in campioni di *Muscadinia rotundifolia* Michx., specie affine al genere *Vitis* (non è ancora chiaro se si tratta di un genere a parte o di un sottogenere). Questa pianta è nota per la sua totale resistenza alla peronospora ed è dunque possibile ipotizzare un ruolo di questi composti nel combattere questo patogeno.

Degna di nota è anche la presenza dei già discussi michelianina e kaempferol-O-glucuronide. Come si ricorderà sono i metaboliti che presentano le intensità di segnale strumentale più alte in tutti i campioni. Il fatto che l'analisi della varianza e la successiva cluster analysis facciano emergere questi composti in questo gruppo, è indice di una loro presenza (sempre in termini di intensità di segnale) significativamente maggiore all'interno del gruppo.

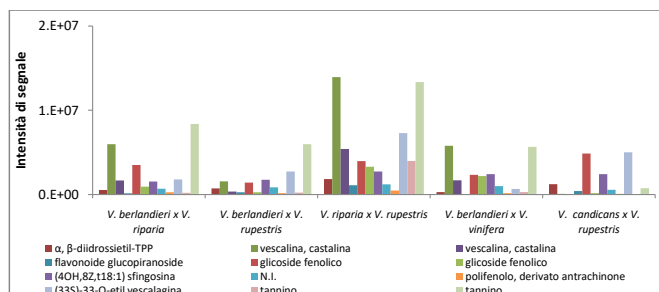


Figura 3.9: Composti caratterizzanti il gruppo *V. riparia* × *V. rupestris* - confronto delle intensità di segnale medie

***V. candicans* × *V. rupestris***

In Figura 3.6 è possibile vedere come il gruppo *V. candicans* × *V. rupestris* sia quello che maggiormente si differenzia dai restanti, probabilmente per la presenza nei suoi parentali della specie *V. candicans*. In Tabella 3.9 vi è l'elenco dei composti ritrovati in questo gruppo con intensità decisamente maggiori che negli altri. Osservando anche Figura 3.10 è possibile vedere come, a differenza degli altri gruppi, le intensità medie di segnale siano evidentemente

Tabella 3.8: Composti caratterizzanti il gruppo *V. riparia* × *V. rupestris*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
1.66	195.0509 (-)	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	acido glucuronico	acido organico
19.53	485.0660 (+)	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> P <sub>2</sub> S	alpha,beta- diidrossietil-TPP	derivato da vitamina B1
16.7	631.0552 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>20</sub> O <sub>18</sub>	vescalina (castalina)	ellagitannino
17.41	663.0809 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>20</sub> O <sub>18</sub> +CH <sub>3</sub> OH	vescalina (castalina)	ellagitannino
20.99	475.0854 (-)	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	N.I.	flavonoide glucopira- noside
19.49	461.0708 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	kaempferol-O- glucuronide	flavonoide O-glucuronide
18.53	477.0650 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub>	melichianina	flavonoide O-glucuronide
14.91	221.0557 (+)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	3,5- Dihydroxyphenyl 1-O-(6-O-galloyl-β- D-glucopyranoside)	glicoside fenolico
18.82	519.1848 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	N.I.	glicoside fenolico
25.35	316.2827 (+)	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>3</sub>	(4OH,8Z,t18:1) sfin- gosina	lipide
16.59	764.5550 (+)	C <sub>62</sub> H <sub>38</sub> O <sub>44</sub>	N.I.	polifenolo, derivato antrachinone
19.53	482.0573 (+)	C <sub>43</sub> H <sub>30</sub> O <sub>26</sub>	(33S)-33-O-etil vescalagina	tannino
19.01	861.0601 (-)	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> O <sub>24</sub> +F.A.	N.I.	tannino
16.53	714.0506 (-)	C <sub>68</sub> H <sub>38</sub> O <sub>36</sub>	N.I.	tannino

superiori agli altri campioni, con diversi composti non rilevabili se non in queste selezioni. In particolare si possono notare il resveratrolo e una serie di suoi oligomeri e derivati. Il composto, già brevemente descritto in sezione 1.3.3, è uno dei più importanti e studiati nella vite e gli stilbenoidi in genere appaiono essere i composti che maggiormente separano questo gruppo dalle altre specie. Essendo queste molecole notoriamente attive contro peronospora e muffa grigia, incroci ottenuti con la specie *V. candidans* potrebbero essere estremamente interessanti in viticoltura. Inoltre la resistenza alla fillossera delle selezioni Dog Ridge e Salt Creek qui analizzate viene descritta da Christensen [135] come media e alta rispettivamente; considerando le intensità di segnale maggiori in Salt Creek è possibile ipotizzare un certo ruolo degli stilbenoidi anche nel fronteggiare la fillossera.

### *V. berlandieri* × *V. vinifera*

L'ultimo gruppo preso in considerazione è quello composto da portainnesto aventi composizione parentale *V. berlandieri* × *V. vinifera*. Appare evidente la vicinanza di questo gruppo di campioni con quello composto da *V. berlandieri* × *V. rupestris*, con il quale condivide una parte dei metaboliti. Si differenzia tuttavia per una serie di composti elencati in Tabella 3.10 e le cui intensità di segnale medie sono mostrate in Figura 3.11.

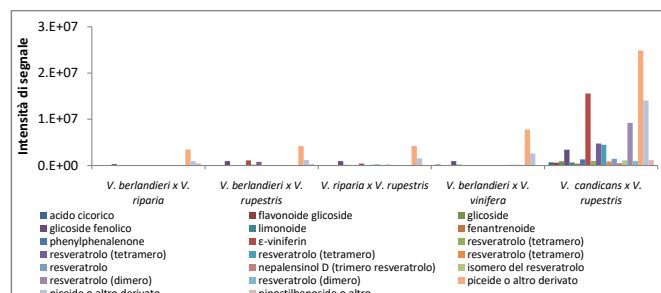


Figura 3.10: Composti caratterizzanti il gruppo *V. candicans* × *V. rupestris* - confronto delle intensità di segnale medie

Tabella 3.9: Composti caratterizzanti il gruppo *V. candicans* × *V. rupestris*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
19.42	475.0882 (+)	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	acido cicorico	acido idrossicinnamico
23.30	681.2079 (+)	C <sub>31</sub> H <sub>36</sub> O <sub>17</sub>	N.I.	flavonoide glicoside
19.40	410.1097 (+)	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>23</sub>	N.I.	glicoside
16.77	525.1954 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub>	N.I.	glicoside fenolico
19.38	401.1513 (+)	C <sub>40</sub> H <sub>48</sub> O <sub>17</sub>	N.I.	limonoide
28.83	481.1652 (-)	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	N.I.	fenantrenoide
18.51	288.0759 (+)	C <sub>38</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	N.I.	phenylphenalenone
24.44	499.1374 (-)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> +F.A.	ε-viniferin	resveratrolo (dimero)
24.76	951.2618 (-)	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub> +F.A.	resveratrolo (tetramero)	stilbenoide
23.47	905.2556 (-)	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	resveratrolo (tetramero)	stilbenoide
23.25	725.1987 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub> +F.A.	resveratrolo (tetramero)	stilbenoide
25.88	679.1944 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	resveratrolo (tetramero)	stilbenoide
21.80	227.0704 (-)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	resveratrolo	stilbenoide
22.90	681.2105 (-)	C <sub>42</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	nepalensinol D (trimer resveratrolo)	stilbenoide
19.40	229.0843 (+)	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	isomero del resveratrolo	stilbenoide
21.26	499.1375 (-)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> +F.A.	resveratrolo (dimero)	stilbenoide
24.03	453.1320 (-)	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	resveratrolo (dimero)	stilbenoide
19.36	389.1229 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	piceide o altro derivato	stilbenoide glicoside
18.33	435.1272 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub> +F.A.	piceide o altro derivato	stilbenoide glicoside
21.57	403.1374 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	pinostilbenoside o altro	stilbenoide (glicoside)



Particolarmente interessante è la presenza di due molecole identificate come cinchonain I (a, b oppure c), facenti parte della classe dei flavolignani. Fino ad ora non erano mai state identificate in piante del genere *Vitis* e posseggono particolari proprietà farmacologiche. Ad esempio la cinchonain Ib, isolata dalle foglie del nespolo giapponese (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.), è capace di indurre la secrezione di insulina; non a caso dette foglie sono un ingrediente tipico della medicina orientale per il trattamento del diabete mellito [136].

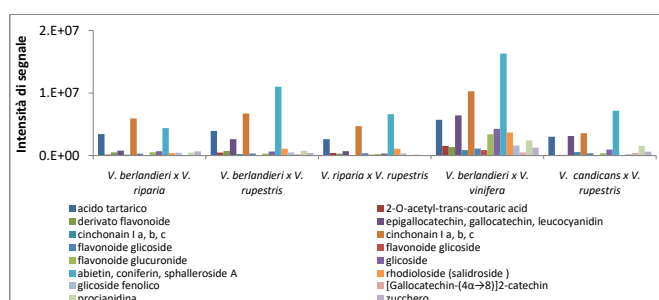


Figura 3.11: Composti caratterizzanti il gruppo *V. berlandieri* × *V. vinifera* - confronto delle intensità di segnale medie

Tabella 3.10: Composti caratterizzanti il gruppo *V. berlandieri* × *V. vinifera*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
9.76	149.0090 (-)	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	acido tartarico	acido organico
13.15	170.0401 (+)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	2-O-Acetyl- trans-coutaric acid	composto fenolico
21.24	613.1320 (-)	C <sub>33</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	N.I.	derivato flavonoide
21.37	451.1008 (-)	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	cinchonain I a, b, c	flavolignano
19.88	451.1012 (-)	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	cinchonain I a, b, c	flavolignano
17.85	465.1015 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	N.I.	flavonoide glicoside
21.64	449.1427 (-)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	N.I.	flavonoide glicoside
19.63	477.1017 (-)	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	N.I.	flavonoide glucuronide
17.15	433.2059 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub> +F.A.	N.I.	glicoside
15.57	341.1228 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	abietin, coniferin, sphalleroside A	glicoside fenolico
13.12	345.1178 (-)	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> +F.A.	rhodioside (salidrosi- de)	glicoside fenolico
13.98	343.1019 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	N.I.	glicoside fenolico
13.85	897.1849 (-)	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub>	[Galocatechin- (4α->8)] 2-catechin	proantocianidina
14.28	577.1329 (-)	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	procianidina	proantocianidina
10.54	323.1338 (-)	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	N.I.	zucchero

### 3.2.3 Resistenza

Da letteratura, alcuni tra i portainnesto più utilizzati manifestano una migliore resistenza alla fillossera; Palliotti et al. 2015 [137] indicano in particolare le selezioni Riparia Gloire ISV1, 161.49 Courdec, 779 Paulsen ISV1, e Fercal come i più resistenti. Eseguendo un t-test tra questo gruppo e i restanti campioni emergono due composti presenti ad intensità decisamente maggiori rispetto agli altri portainnesto. Il primo composto è stato identificato come digalloylglucosio ed è un galletannino (tannino idrolizzabile), cioè un composto formato dall'esterificazione di una o più molecole di acido gallico con una di un carboidrato (glucosio in questo caso). Non è chiaramente possibile attribuire con certezza a questo composto la maggiore resistenza alla fillossera di queste piante rispetto agli altri portainnesto (comunque a loro volta dotati di tolleranza a questo parassita), ma è comunque notevole verificare che questo ed un altro sono gli unici ad emergere dal t-test. Il secondo composto era un glucoside ma non è stato possibile trovare una corrispondenza con i frammenti; si sospetta tutta via uno jasminoside.

### 3.2.4 Valutazioni di carattere nutraceutico

Da questo studio emergono interessanti possibilità per quanto concerne l'utilizzo alimentare e farmaceutico delle foglie di vite. Per quanto riguarda l'uso alimentare, vi è sempre una maggiore attenzione alla produzione "biologica" del cibo. La vite europea (*V. vinifera*) necessita attualmente di diversi trattamenti antiparassitari a causa delle già citate vulnerabilità di questa pianta. In particolare è ammesso entro certe quantità l'utilizzo del solfato di rame anche nella produzione "biologica". Tuttavia questo composto non è propriamente innocuo e sarebbe opportuno limitarne l'assunzione. Utilizzare quindi delle varietà resistenti che non necessitano di trattamenti fitosanitari per la produzione di foglie da destinare al consumo umano o alla produzione di integratori o prodotti erboristici, rappresenterebbe una buona opportunità.

Da quanto visto sopra inoltre la composizione metabolica delle foglie può variare notevolmente tra selezioni diverse e dunque anche l'effetto farmacologico sarà differente. Garantire un controllo qualità adeguato ed una standardizzazione del prodotto a seconda degli utilizzi (soprattutto in ambito farmaceutico) è dunque una necessità stringente.

## 3.3 Analisi elicriso

Anche in questo caso i dati ottenuti in modalità negativa sono stati uniti a quelli in polarità positiva formando una matrice di 948 variabili. Dato che le specie presentavano una notevole variabilità del profilo metabolico, non è stato possibile individuare dei metaboliti comuni presenti in tutti i campioni agli stessi livelli come per altre matrici. Si è proceduto quindi direttamente

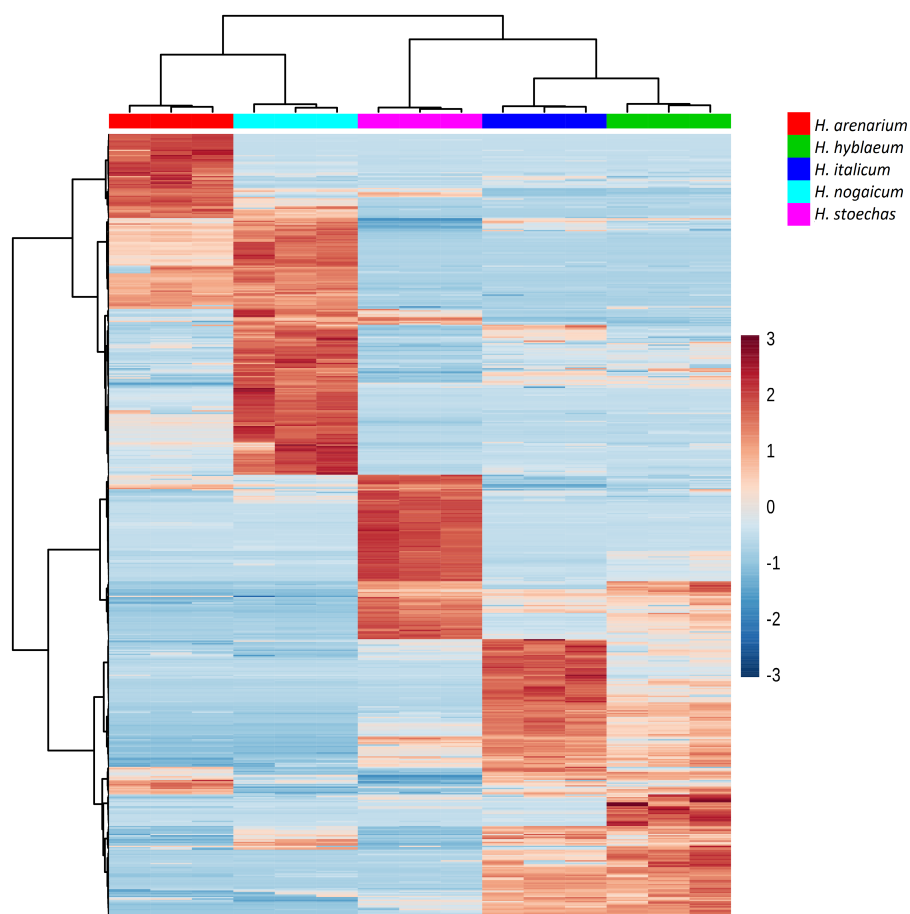


Figura 3.12: Heatmap ottenuta dall'analisi dei cluster sui campioni di Elicriso

all'esecuzione del test ANOVA, considerando sempre come significativi i metaboliti con  $p\text{-value} < 0,01$ . La matrice è stata così ridotta a 596 variabili.

### 3.3.1 Variabilità interspecifica

Il risultato dell'analisi dei cluster sulla matrice dei dati ridotta dopo il test ANOVA è visibile in Figura 3.12. In questa immagine è possibile vedere come tutte le differenti specie siano ben distinte le une dalle altre e, in particolare, sono evidenti due cluster principali:

- Il primo a partire da sinistra, è formato dalle specie di Elicriso raccolte in Russia e costituito da *H. arenarium* e *H. nogaicum*
- Il secondo, che possiamo quindi denominare Elicriso italiano, è formato dalle specie *H. stoechas*, *H. italicum* e *H. hyblaenum*

Sulla medesima matrice di dati è stata effettuata un'analisi delle componenti principali, i cui risultati sono visibili nelle Figure 3.13 (prima componente contro seconda) e 3.14 (prima componente contro terza). Dagli score plot è possibile vedere come la prima componente principale, che spiega il 44,52% della varianza, sia in grado di separare i campioni di elicriso russo da quelli italiani, in accordo con quanto mostrato dalla heatmap. La seconda componente principale spiega il 26,58% della varianza ed è in grado di separare molto bene la specie *H. stoechas*, che si distingue nettamente dalle altre due italiane come evidenziato dall'analisi dei cluster precedente. La terza componente principale (17,06% di varianza spiegata) risulta invece indispensabile per analizzare le differenze tra le due specie russe; sempre in accordo con la heatmap di Figura 3.12 le specie *H. italicum* ed *H. hyblaenum* pur differenziandosi, non presentano differenze paragonabili a quelle riscontrate tra le altre specie. I grafici dei loading sono utili per isolare le variabili che pesano molto nelle componenti principali e dunque per isolare i composti che più caratterizzano i gruppi evidenziati nel grafico degli scores.

In accordo con quanto fatto per la liquirizia, sono stati isolati i metaboliti che più differenziano i gruppi esaminando i risultati delle due analisi multivariate e nelle sezioni che seguono verranno discussi i risultati di queste operazioni.

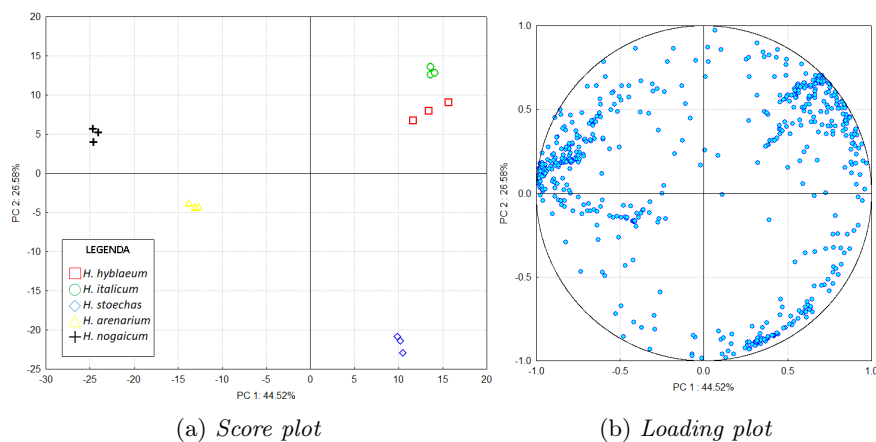


Figura 3.13: PCA ottenuta sui campioni di elicriso - prima componente contro seconda

### Elicriso russo

Secondo il grafico di Figura 3.15, recante le intensità di segnale medie dei composti riportati in Tabella 3.11, la specie *H. arenarium* è chiaramente caratterizzata dalla presenza di diversi glicosidi per molti dei quali non è stato tuttavia possibile assegnare un ipotetico nome data la compatibilità di troppe

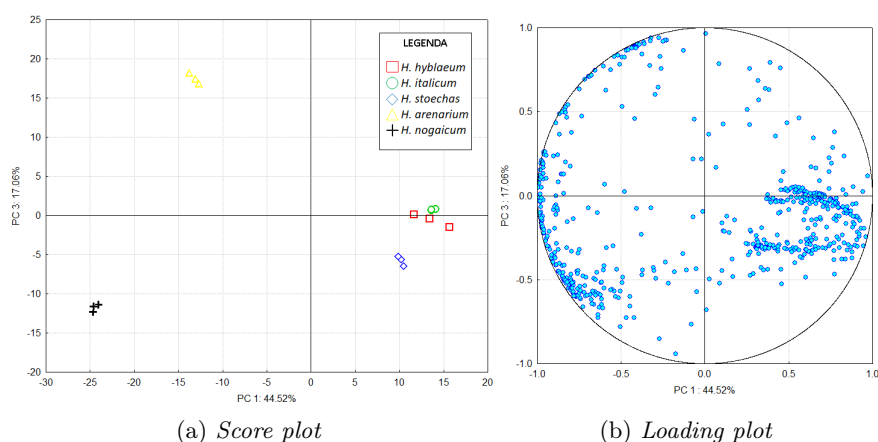


Figura 3.14: PCA ottenuta sui campioni di elicriso - prima componente contro terza

molecole con le frammentazioni ottenute. Tra questi tuttavia è interessante notare la gaulterina, isolata in *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehd., che in test *in vivo* ha dimostrato un'attività analgesica e antiinfiammatoria paragonabile a quella dell'aspirina, ma senza i suoi tipici effetti collaterali [138]. La possibile presenza di questa molecola e altre simili rende la specie studiata molto interessante dal punto di vista della ricerca di nuovi farmaci.

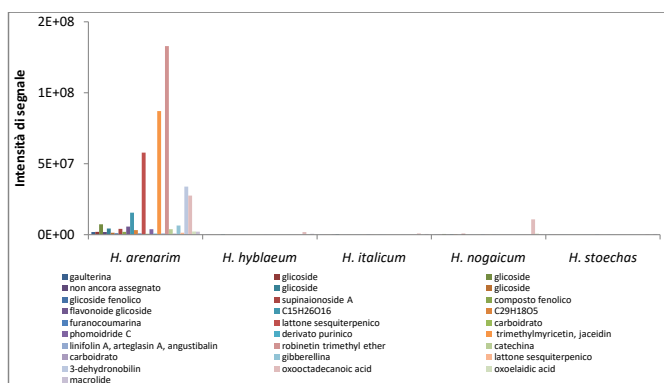


Figura 3.15: Composti caratterizzanti la specie *H. arenarium* - confronto delle intensità di segnale

Altra caratteristica notevole è la presenza di alcuni lattoni sesquiterpenici, composti formati da tre unità isopreniche e un anello lattonico. Possono essere divisi ulteriormente in diverse altre classi e presentano una notevole variabilità strutturale. Tra i più importanti della categoria, è doveroso citare l'artemisia, isolata in *Artemisia annua*, che si è dimostrata essere un efficace farmaco

Tabella 3.11: Composti caratterizzanti la specie *H. arenarium*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
34.04	297.2391 (+)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	oxooctadecanoic acid	acido grasso
32.87	297.2429 (-)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	oxoelaidic acid	acido grasso
22.10	517.1417 (-)	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>		carboidrato
28.49	236.1092 (+)	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>13</sub>		carboidrato
28.48	319.0825 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>		catechina
17.13	565.1519 (+)	C <sub>33</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>		composto fenolico
23.34	343.6389 (+)	C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>12</sub>		derivato purinico
27.76	343.0809 (-)	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	robinetin trimethyl ether	flavone
17.32	447.0940 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>		flavonoide glicoside
25.45	359.0755 (-)	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	trimethylmyricetin, ja- ceidin	flavonoide metilato
19.07	203.5606 (+)	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub> +ACN		furanocoumarina
29.24	333.1660 (+)	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>		gibberellina
13.79	477.1586 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub> +F.A.		glicoside
14.41	401.1439 (-)	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	methyl 1- (hexopyranosyloxy)- 7,7a-dimethyl-5- oxo-1,4a,5,6,7,7a- hexa-hydrocyclo- penta[c]pyran-4- carboxylate	glicoside
16.11	228.0628 (+)	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>		glicoside
16.07	431.1906 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub> +F.A.		glicoside
13.31	445.1330 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	gaulterina	glicoside
16.61	237.1037 (+)	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub>	(2r)-4-(4- hydroxyphenyl)-2- butanyl 6-o-[(3s)-4- carboxy-3-hydroxy-3- methylbutanoyl]-α-D- glucopyranoside	glicoside fenolico
14.85	221.0552 (+)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	non ancora assegnato	isomero dell'acido caf- feoilchinico malonato
30.18	245.1146 (+)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>		lattone sesquiterpeni- co
20.67	263.1251 (+)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>		lattone sesquiterpeni- co
26.00	305.1349 (+)	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	linifolin A, arteglinin A, angustibalin	lattone sesquiterpeni- co
30.48	345.1667 (+)	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	3-dehydronobilin	lattone sesquiterpeni- co
34.41	725.3749 (-)	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>14</sub>		macrolide
16.85	401.1800 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	supinaionoside A	megastigmane glucosi- de
23.25	569.2378 (-)	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	phomoidride C	phomoidride
17.78	461.1126 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>16</sub>	sconosciuto	sconosciuto
18.69	447.1225 (+)	C <sub>29</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	sconosciuto	sconosciuto

antimalarico [139]. In generale questa classe di composti è caratteristica delle Asteraceae ed è nota per l'attività antitumorale esercitata [140]. Per quanto riguarda i lattoni sesquiterpenici ritrovati in *H. arenarium*, per una molecola di formula  $C_{17}H_{20}O_5$  si è arrivati a definire i tre nomi più probabili: linifolin A, arteglin A, angustibalin. Un'altra molecola di questa classe è stata identificata come 3-dehydronobilin, composto appartenente alla sottoclasse dei germacranolidi, che sembra dotato di una certa attività antitumorale [141].

Sempre tra i composti terpenici (diterpenoidi in questo caso) è presente una gibberellina, molecole note da tempo per avere nella pianta funzioni ormonali. Sono prodotte da piante e funghi e influenzano molti aspetti della crescita e dello sviluppo della pianta come la germinazione dei semi, la divisione cellulare, l'allungamento del fusto e la fioritura [142]. Alti livelli di questi ormoni stimolano quindi la crescita della pianta. Possono indurre ad esempio una maggiore crescita dei frutti e per questo alcune gibberelline sono utilizzate commercialmente [12].

Già isolati ma dal nome non ancora assegnato sono due isomeri del malonato dell'acido caffeoilchinico, che in uno studio hanno dimostrato una certa attività antiossidante [143].

Presente tra i composti che più caratterizzano la specie rispetto alle altre anche una probabile furanocoumarina. Questi particolari composti possono presentare diverse attività biologiche e sono presenti in molte piante della medicina tradizionale orientale, ma allo stesso tempo possono anche essere tossiche o irritanti. Sono note infatti per sensibilizzare le cellule alla radiazione luminosa e specialmente alla radiazione UV, causando lesioni e anche possibili mutazioni; le molecole infatti, una volta attivate dalla luce sono in grado di reagire con le basi pirimidiniche del DNA e in particolare con la timina [144]. Le furanocumarine sono un tipico esempio di meccanismo di difesa contro gli erbivori e la presenza di questo composto e altri simili andrebbe dunque indagata più a fondo per capire se l'utilizzo della pianta possa essere pericoloso per la salute oltre certe quantità.

In Tabella 3.12 sono invece elencati i composti identificati che maggiormente caratterizzano la specie *H. nogaicum*, che si ricorda essere, ad oggi, completamente sconosciuta dal punto di vista del profilo metabolico. Il confronto delle intensità di segnale dei composti caratteristici è riportato in Figura 3.16. Si nota l'abbondante presenza di glicosidi flavonoidi e alcuni derivati ed è possibile dire che, tra quelli identificati in questo studio, i composti fenolici costituiscono la maggior parte dei metaboliti che differenziano maggiormente questa specie. Interessante è la presenza di un flavonolo detto tilirioside e di un suo probabile isomero, date le diverse attività attribuitegli: antiinfiammatoria, antiossidante, antitumorale ed epatoprotettiva. Più recentemente sono stati riportati interessanti effetti sul metabolismo: in particolare questo composto sarebbe in grado di inibire l'accumulo di grasso viscerale e l'aumento di peso nei topi. Ulteriori studi riportano un miglioramento delle

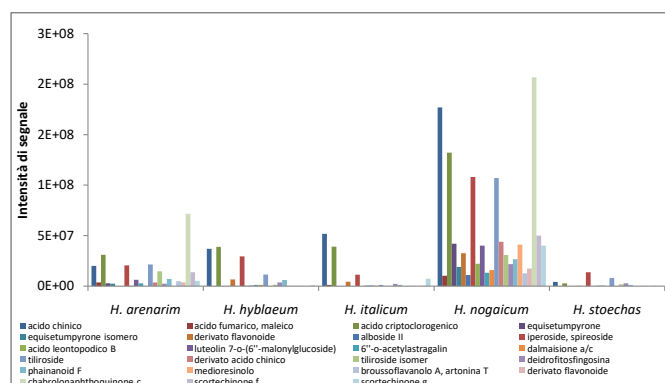


Figura 3.16: Composti caratterizzanti la specie *H. nogaicum* - confronto delle intensità di segnale

malattie metaboliche associate all'obesità in seguito alla somministrazione di tilirioside [145, 146]. La presenza di questo composto lascia dunque campo ad interessanti applicazioni. Tra i flavonoidi glicosidi vi è inoltre il composto identificato come luteolin 7-*o*-(6''-malonylglucoside), già ritrovato nel metaboloma di *Chrysanthemum morifolium* Ramat, pianta della famiglia delle Asteraceae, nonché importante ingrediente della medicina orientale [147]. Lo spireside è il 4'-*O*-glucoside della quercetina, flavonoide dalle già note e citate proprietà farmacologiche.

Sono presenti l'acido chinico e alcuni suoi derivati come l'acido criptoclorogenico. Questo è un estere dato dalla condensazione del gruppo carbossilico dell'isomero trans dell'acido caffeico con il gruppo idrossilico in posizione 4 dell'acido chinico; i composti di questo tipo vengono chiamati in genere acidi clorogenici e sono ritrovati in diverse piante e frutti, in particolare caffè e tè. Dette sostanze hanno dimostrato in diversi studi, *in vitro* e *in vivo*, di possedere diverse proprietà farmacologiche tra cui antiossidanti, antimicrobiche, antivirali e antiinfiammatorie; svolgerebbero inoltre attività protettiva contro l'insorgere di diverse patologie [148].

Scortechinone F e G sono due xantoni tetraprenilati isolati in *Garcinia scortechinii* King (famiglia delle Clusiaceae) e specie affini. Gli xantoni (o xantonoidi) sono composti fenolici derivati dalla struttura base dello xantone, costituita da un sistema a tre anelli ( $C_6-C_3-C_6$ , Figura 3.17). A questo possono poi aggiungersi diversi sostituenti e gruppi funzionali quali isoprene e gruppi idrossilici e metossilici. Nel caso degli xantoni preniliati sono state verificate attività biologiche di tipo antimicrobico [149]. Considerando l'abbondanza relativamente bassa di questi composti nel mondo vegetale ed il fatto che la nostra analisi fa emergere come composto specie specifico due xantoni tetraprenilati, è possibile suggerire che questi ultimi possano avere una valenza chemotassonomica anche per le specie di *Helichrysum* e per le



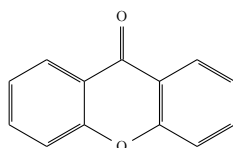


Figura 3.17: Formula di struttura dello xantone

Asteraceae in genere, dove ancora non erano stati identificati.

Altra presenza interessante è quella del medioresinolo, una molecola appartenente alla classe dei lignani, alla quale sono state attribuite attività di protezione nei confronti delle malattie cardiovascolari e fungicide nei confronti di *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout [150]. Anche in questo caso non è nota la distribuzione di questo composto nel genere *Helichrysum*.

Nonostante l'abbondanza dei composti fenolici, un metabolita appartenente alla classe dei terpeni risulta essere particolarmente interessante. Si tratta del phainanoid F, un triterpene che ha dimostrato, insieme a tutta l'omonima serie, di possedere potenti proprietà immunosoppressive [151]. Ancora una volta, sebbene indubbiamente interessante dal punto di vista farmacologico, la presenza di particolari composti pone dei dubbi sull'utilizzo sicuro di queste piante come prodotti erboristici o integratori alimentari in genere.

L'acido leontopodico B è stato isolato insieme al congenere A in piante di *Leontopodium alpinum* Cass., la cosiddetta stella alpina (Asteraceae). Questi derivati dell'acido cinnamico sembrano avere una potente attività antiossidante che può risultare protettiva per il DNA [152] e, ad oggi, non ne era nota la presenza in altre piante della famiglia delle Asteraceae. La presenza praticamente esclusiva in *H. nogaicum*, lo rende un interessante biomarker per questa specie. Un'altro derivato dell'acido cinnamico si rivela essere un possibile marker per questa specie: l'iridoide alboside II, che, a differenza dell'acido leontopodico B, è stato isolato in piante della famiglia delle Rubiaceae, e di cui vi sono pochissimi studi in letteratura.

### Elicriso italiano

La specie *H. italicum*, come si vede dal grafico di figura 3.18 che riporta le intensità di segnale dei composti di Tabella 3.13, si distingue principalmente per la presenza di saponine triterpeniche (e una sapogenina) e acetogenine, categorie quasi assenti nei metaboliti caratteristici delle altre specie.

Le acetogenine fanno parte dei polichetidi, una classe non trattata finora in questo studio, e si ritrovano principalmente in piante della vasta famiglia delle Annonaceae, organismi che crescono solitamente in ambienti tropicali. Non vi sono moltissimi riferimenti in letteratura alla presenza di questi composti nelle Asteraceae ma sono comunque stati ritrovati in alcuni casi [153]. Le acetogenine isolate nel genere *Annona*, sono tutt'ora oggetto di studio per le

Tabella 3.12: Composti caratterizzanti la specie *H. nogaicum*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
2.31	115.0036 (-)	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	acido fumarico o maleico	acido dicarbossilico
25.38	316.2828 (+)	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>3</sub>	deidrofitosfingosina	amminoalcol (lipide)
1.66	191.0560 (-)	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	acido chinico	zucchero acido
22.67	763.1498 (-)	C <sub>37</sub> H <sub>32</sub> O <sub>18</sub>		derivato acido chinico
15.58	353.0869 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	acido criptoclorogenico	derivato acido chinico
36.53	465.1878 (+)	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>		derivato flavonoide
18.27	575.1392 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	chamaemeloside, okanin4'-(2'',4'',6''- triacetylglucoside), 6''-o-(3-hydroxy-3- methylglutaroyl)vitexin	derivato flavonoide
22.51	593.1279 (-)	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	tiliroside	flavonolo glicoside
22.76	593.1288 (-)	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	tiliroside isomero	flavonolo glicoside
18.76	695.1232 (-)	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> O <sub>17</sub>	acido leontopodico	fenilpropanoide (deriva- to acido cinnamico)
20.22	535.1044 (+)	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub>	luteolin 7-o-(6''- malonylglucoside)	flavone glicoside
18.62	463.0866 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	iperoside, spireoside	flavonoide (quercetin) glucoside
22.16	587.1388 (-)	C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	dalmaisone A, C	flavonoide aurone
21.05	489.1021 (-)	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	6''-o-acetylastragalin	flavonoide glicoside
18.41	565.1903 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>13</sub>	alboside II	iridoide glicoside (deri- vato acido cinnamico)
32.96	389.1580 (+)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	medioresinolo	lignano
36.83	433.2358 (-)	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	chabrolonaphthoquinone C	meroterpene
16.93	423.0918 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	equisetumprone	stirilpirone glicoside
17.46	423.0922 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	equisetumprone isome- ro	stirilpirone glicoside
25.69	785.3514 (-)	C <sub>45</sub> H <sub>54</sub> O <sub>12</sub>	phainanoid F	triterpenoide
35.94	473.1508 (+)	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> +Na	broussoflavanolo A, ar- tonina T	xantone o flavonoide
40.14	593.2709 (+)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	scortechinone F	xantone prenilato
43.26	607.2866 (+)	C <sub>35</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	scortechinone G	xantone prenilato

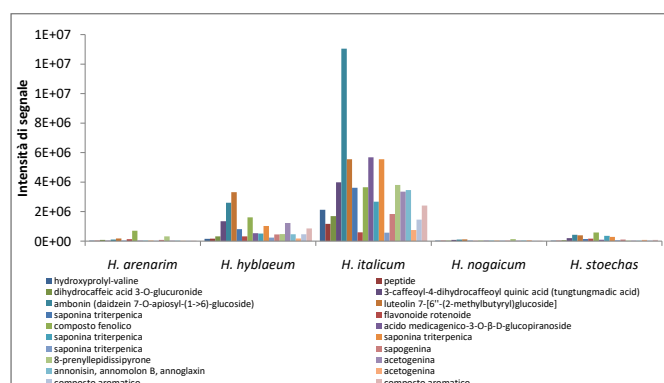
Figura 3.18: Composti caratterizzanti la specie *H. italicum* - confronto delle intensità di segnale

Tabella 3.13: Composti caratterizzanti la specie *H. italicum*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
45.47	609.4339 (-)	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub> O <sub>8</sub>	annonisin, annomolon B, annoglaxin	acetogenina
44.72	611.4495 (-)	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>8</sub>		acetogenina
47.38	629.4703 (+)	C <sub>35</sub> H <sub>64</sub> O <sub>9</sub>		acetogenina
23.76	665.2792 (-)	C <sub>33</sub> H <sub>46</sub> O <sub>14</sub>		composto fenolico
22.02	517.1332 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	3-caffeoyl-4- dihydrocaffeoyl quinic acid (tungtungmadic acid)	derivato acido clorogeni- co
38.64	489.1897 (-)	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	8-prenyllepiddissiprone	flavone prenilato
23.74	353.1223 (+)	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O <sub>16</sub>		flavonoide rotenoide
13.83	357.0813 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	dihydrocaffeic acid 3-O- glucuronide	glicoside fenolico
23.06	531.1493 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub>	luteolin 7-[6''-(2- methylbutyryl)glucoside]	glicoside flavonoide
22.33	547.1447 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	ambonin (daidzein 7-O-apiosyl-(1->6)- glucoside)	glicoside flavonoide
9.47	229.1190 (-)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	hydroxypropyl-valine	peptide
12.96	243.1349 (-)	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		peptide
31.77	471.3463 (-)	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>		sapogenina
24.92	647.3773 (-)	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>10</sub>		saponina triterpenica
27.04	647.3772 (-)	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>10</sub>	quinovic acid $\beta$ -D- glucoside, copteroside B, myrioside B, kochianoside I, tragopogonsaponin A	saponina triterpenica
23.52	663.3721 (-)	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>11</sub>		saponina triterpenica
24.03	663.3724 (-)	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>11</sub>	lacido medicagenico- 3-O- $\beta$ -D- glucopiranoside	saponina triterpenica
29.43	631.3824 (-)	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>9</sub>		saponina triterpenica

loro proprietà antitumorali anche contro cellule resistenti ai comuni farmaci [154, 155, 156] ma è dubbia la loro neurotossicità, evidenziando quindi dei problemi circa la loro assunzione tramite i frutti in cui sono presenti (graviola) [157]. Se queste possibilità dovessero ricevere ulteriori conferme, la presenza di acetogenine in *H. italicum* dovrebbe essere oggetto di attente valutazioni al fine di stabilirne l'utilità e l'eventuale modalità di utilizzo.

Tra le saponine è stato possibile identificare l'acido medicagenico-3-O- $\beta$ -D-glucopiranoside, molecola isolata nelle radici dell'erba medica (*Medicago sativa* L.), una pianta delle Fabaceae molto conosciuta e usata commercialmente, dove svolge un'azione antimicotica [50]. Molecole simili sono già state ritrovate nella famiglia delle Asteraceae [158] e in generale, come già visto, la presenza di saponine indica un meccanismo di difesa verso organismi patogeni e, nell'ottica di un utilizzo alimentare/nutraceutico, costituisce un punto interessante per le note attività biologiche di queste molecole.

Non mancano tuttavia i composti fenolici, in particolare in forma di glicosidi. Il composto chiamato tungtungmadic acid, derivato dell'acido dicaffeoilchinico e quindi classificato come acido clorogenico, è stato isolato come antiossidante nella pianta *Salicornia herbacea* L. [159] e sembra svolgere inoltre un'attività epatoprotettiva [160].

Interessanti i due glicosidi flavonoidi: luteolin 7-[6''-(2-methylbutyryl) glucoside] e ambonina. Il primo composto è un glicoside della luteina, flavone molto diffuso e isolato in diverse famiglie tra cui le Asteraceae e abbondantemente e correntemente studiato per la sua varia attività biologica (antivirale, antitumorale, antiossidante, preventiva per le malattie degenerative) [161, 162, 163]. Il glicoside qui ritrovato è stato già isolato in *Arnica chamissonis* [164] ma non vi sono molti altri riferimenti in letteratura. Malgrado la loro maggiore idrofilicità, i glicosidi dei flavonoidi sono generalmente bioattivi. Il secondo è un composto correlato alla daidzeina (per la precisione daidzein 7-O-apiosyl-(1->6)-glucoside), isoflavonoide tipico della soia e altre Fabaceae e già discusso. Anche in questo caso le informazioni circa l'ambonina sono scarse in letteratura: viene indicata in uno studio come presente in una pianta delle Fabaceae [165]. È possibile comunque supporre che condivida almeno in parte le sue proprietà farmacologiche con la daidzeina, rendendola un componente importante di questa pianta in quanto, come noto, gli isoflavonoidi possono esercitare un'attività estrogenica nell'essere umano.

Il flavanone prenilato 8-prenyllepiddissipyrone è stato ritrovato in *Helichrysum lepidissimum* S.Moore, una specie di Elicriso africana [166]. Pur non essendo presenti studi su questa particolare molecola, i già discussi flavonoidi prenilati sono conosciuti per la loro attività biologica, incrementata probabilmente dalla prenilazione stessa.

La specie *H. stoechas* (vedi Tabella 3.14 per l'elenco dei composti caratteristici) mostra in Figura 3.19 la presenza di flavonoidi prenilati come kurarinol, kushenol Q oppure kushenol P, che si ritengono essere importanti per le loro proprietà farmacologiche. È bene porre attenzione sul fatto che

alcuni studi hanno riconosciuto questi (ed altri simili) composti come dei forti inibitori della tirosinasi [167, 168], dunque in grado di inibire la sintesi di melanina, offrendo un aiuto per le terapie nei casi di iperpigmentazione, ma con la possibilità di rivelarsi dannosi se assunti quando non necessario.

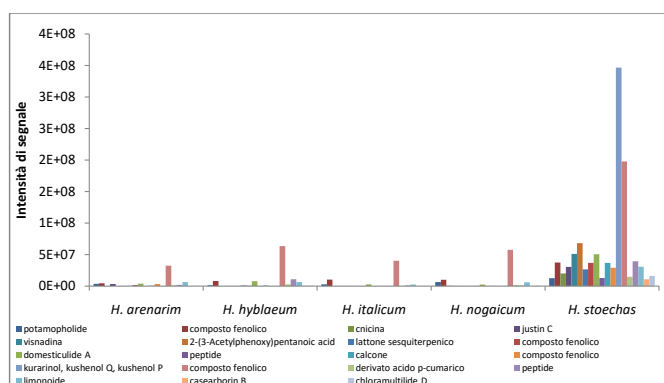


Figura 3.19: Composti caratterizzanti la specie *H. stoechas* - confronto delle intensità di segnale

Come in *H. arenarium*, vi è la presenza di alcuni lattoni sesquiterpenici (diversi in questo caso) per i quali valgono le medesime considerazioni. In particolare la cnicina, molecola appartenente alla sottoclasse dei germacranolidi, è stata già isolata in *Cnicus benedictus* L. detto anche "cardo santo" e altre Asteraceae; in alcune piante pioniere ed infestanti per le colture (*Centaurea diffusa*) è ritenuta l'agente responsabile dell'allelopatia [169], cioè una competizione chimica interspecifica che, attraverso la secrezione di alcune sostanze, causa l'inibizione della germinazione di piante competitive. Il significato ecologico di questa molecola è dunque alto, e per la pianta rappresenta un indubbio vantaggio competitivo. A parte queste proprietà, la cnicina si è dimostrata capace anche di diversi effetti farmacologici tra cui i più interessanti sono quelli contro il mieloma e i protozoi parassiti del genere *Trypanosoma* [170, 171].

Isolata nei frutti di *Ammi visnaga* Lam, una pianta della famiglia delle Apiaceae diffusa nel bacino del mediterraneo e di antico utilizzo medicinale [172], la visnadina è una molecola utilizzata attualmente come farmaco per le sue proprietà vaso-dilatatorie, ed in molti paesi è classificata come antianginosa [173]. Averla ritrovata in questa pianta può suggerire applicazioni in ambito farmaceutico diverse da quanto visto finora, considerando anche la marcata differenza nelle intensità di segnale rispetto agli altri campioni analizzati. Chimicamente la visnadina è una cumarina, in particolare una piranocumarina.

La molecola denominata justin C (lignano) è stata isolata in *Justicia procumbens* L., della famiglia delle Acanthaceae, tradizionale pianta medicinale

Tabella 3.14: Composti caratterizzanti la specie *H. stoechas*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
32.96209	235.0975 (-)	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	2-(3-Acetylphenoxy) pentanoic acid	acido organico
35.78464	425.1950 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	4,2',3',4',6'- Pentahydroxy-5'- neryldihydrochalcone, 3'-Geranyl-4,2',4',5',6'- pentahydroxy- dihydrochalcone	calcone
26.43654	293.1024 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>		composto fenolico
33.91263	471.2000 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>		composto fenolico
36.18129	471.1999 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>		composto fenolico
38.8109	469.2213 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>		composto fenolico
32.5475	389.1583 (+)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	visnadina	cumarina
39.01769	317.1748 (-)	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	acido p-cumarico 2,6- dimethyl-6-hydroxy- oct-7-enylester	derivato acido p-cumarico
37.59452	455.2072 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	kurarinol, kushenol Q, kushenol P	flavonoide prenilato
24.5744	309.0972 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	potamopholide	lattone sesquiterpenico
27.04257	377.1589 (-)	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	cnicina	lattone sesquiterpenico
33.65914	375.1805 (-)	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>		lattone sesquiterpenico
29.87672	489.2110 (-)	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	justin C	lignano
41.4189	523.2684 (-)	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub>		limonoide
35.72984	427.2057 (+)	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>		peptide
39.6105	477.2787 (+)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>8</sub> O <sub>7</sub>		peptide
44.49346	635.2471 (-)	C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> O <sub>11</sub>	chloramultilide D	sesquiterpenoide
42.1038	567.2576 (-)	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	casearborin B	terpenoide
34.46943	485.2159 (-)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	domesticulide A	tetranortriterpenoide

endemica dell'India [174]. Pur non essendoci molti riferimenti bibliografici al composto in questione, è noto che in questo organismo sono presenti diversi composti attivi biologicamente, fra cui appunto i lignani, e numerosi sono gli effetti riportati [175, 176]. Nelle Asteraceae, a nostra conoscenza, non è mai stato ritrovato.

Tre terpenoidi sono presenti come composti significativi: chloramultilide D (sesquiterpenoide), casearborin B, domesticulide A (tetranortriterpenoide). Ad ulteriore dimostrazione della grande varietà di metaboliti che si possono ritrovare in queste piante, il primo è stato isolato in *Chloranthus japonicus* Siebold e finora mai nelle Asteraceae. Le Chloranthaceae comprendono circa 17 specie tropicali e subtropicali distribuite prevalentemente in Asia e le appartenenti al genere *Chloranthus* rientrano nelle piante utilizzate nella medicina tradizionale [177]. Gli altri due composti sono stati identificati con un livello di probabilità più basso rispetto al primo composto, dato che numerose altre molecole erano compatibili con i risultati ottenuti. La casearborin B deve il suo nome alla *Casearia arborea* (Rich.) Urb., un albero sempreverde che cresce a latitudini tropicali, dove è stato isolato e secondo alcuni studi sembra possedere interessanti attività citotossiche nei confronti di alcune cellule tumorali (NCI 60 Human Tumor Cell Lines Screen) [178]. L'ultimo terpenoide (domesticulide A) è stato identificato tra i componenti bioattivi di *Lansium domesticum* Corr., albero tropicale della famiglia delle Meliaceae; è studiato per la sua attività antimalarica [179], che amplia ulteriormente lo spettro di attività potenzialmente esercitate dai metaboliti ritrovati in *Helichrysum*.

*H. hyblaicum*, come già detto, è una specie endemica della Sicilia ed in particolare, come suggerisce il nome, dei monti Iblei. Proprio per il suo endemismo non vi sono molti dati in letteratura per quanto riguarda la sua composizione metabolica; in Tabella 3.15 sono riportati i composti che distinguono questa particolare specie dalle altre. Da quanto ritrovato in questo studio e mostrato in Figura 3.20 i composti che maggiormente caratterizzano questo Elicriso sono flavonoidi e fenoli in genere, ma non mancano i composti terpenici. Osservando Figura 3.12 si può vedere come la specie in esame non si differenzia così nettamente come le altre, rivelandosi molto simile per profilo metabolico alla specie *H. italicum*; è necessario considerare che le due specie condividono in parte l'areale ed è possibile supporre una stretta correlazione tra le due anche dal punto di vista genetico.

Il composto identificato come parthenosin è un glucuronide della quercetina ma non vi sono studi circa la sua funzione o le sue attività biologiche. Si può solamente supporre che dimostri una certa attività biologica vista la presenza della quercetina nella struttura. Un'altro flavonoide, per la precisione un glicoside flavonolico, è stato identificato come composto caratterizzante *H. hyblaicum*. Si è riusciti ad arrivare a due possibili nomi: floramanoside F e quercetagetin 7-(6''-acetyl glucoside). Floramanoside F è stato isolato in *Abelmoschus manihot* (L.) Medic, pianta annua erbacea della famiglia delle

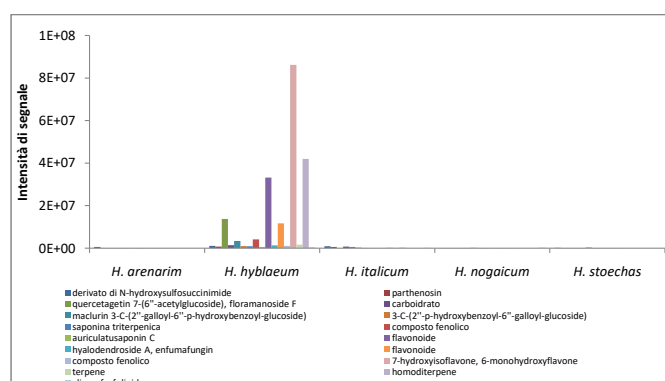


Figura 3.20: Composti caratterizzanti la specie *H. hyblaenum* - confronto delle intensità di segnale

Tabella 3.15: Composti caratterizzanti la specie *H. hyblaenum*

RT	m/z (polarità)	Formula molecolare	Probabile composto	Classe
19.09	191.0562 (-)	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		carboidrato
25.24	257.0816 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>		composto fenolico
27.44	689.3873 (-)	C <sub>45</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>		composto fenolico
01.96	232.0110 (+)	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>8</sub> S		derivato di N-hydroxy-sulfosuccinimide
29.19	239.0706 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	7-hydroxyisoflavone, 6-mono-hydroxyflavone	flavone
26.33	239.0708 (-)	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>		flavonoide
27.23	287.0918 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>		flavonoide
18.19	565.0817 (-)	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub>	quercetagenin (6''-acetylglucoside), floramanoside F	7-flavonoide glicoside
15.43	533.1284 (-)	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	parthenosin	flavonoide glucuronide
39.98	782.5641 (+)	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P		glicerofosfolipide
22.42	697.1354 (+)	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> O <sub>17</sub>	maclurin 3-C-(2''-galloyl-6''-p-hydroxybenzoyl-glucoside) oppure maclurin 3-C-(2''-p-hydroxybenzoyl-6''-galloyl-glucoside)	glicoside fenolico
24.19	697.1354 (+)	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> O <sub>17</sub>	maclurin 3-C-(2''-galloyl-6''-p-hydroxybenzoyl-glucoside) oppure maclurin 3-C-(2''-p-hydroxybenzoyl-6''-galloyl-glucoside)	glicoside fenolico
26.53	705.3834 (-)	C <sub>38</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub>	hyalodendroside A, enfumafungin	glicoside triterpenico
38.13	407.2430 (-)	C <sub>23</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>		homoditerpene
26.09	705.3819 (-)	C <sub>38</sub> H <sub>58</sub> O <sub>12</sub>	auriculatusaponin C	saponina triterpenica
25.22	943.5196 (+)	C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>18</sub>		saponina triterpenica
30.67	271.0973 (-)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>		terpene



Malvaceae diffusa in Cina ed utilizzata dalla medicina tradizionale cinese per curare patologie renali croniche [180]. Il secondo è un derivato del flavonolo detto quercetagetina.

Sono presenti due glicosidi fenolici: maclurin 3-C-(2''-galloyl-6'' p-hydroxy-benzoyl glucoside) e maclurin 3-C-(2'' p-hydroxy-benzoyl 6''-galloyl glucoside). Entrambi sono coniugati del maclurin, composto appartenente alla classe dei benzofenoni, presente in numerose piante tra cui *Morus alba* e *Maclura pomifera* (Raf.) C.K. Schneid. a cui deve il nome, entrambe della famiglia delle Moraceae. Uno studio condotto su diverse cultivar di mango (in cui si ritrovano anche i composti qui identificati) ha portato ad associare la presenza di questa ed altre molecole nelle foglie alla resistenza a funghi del genere *Fusarium* [181]. Data la vastità di questo genere e dell'impatto economico che ha sulle coltivazioni di tutto il mondo, la presenza di questi metaboliti può considerarsi di grande interesse.

Tra i composti che maggiormente permettono di distinguere *H. hyblaenum* da *H. italicum* vi è un glicoside triterpenico a cui è stato possibile attribuire due probabili nomi: hyalodendroside A ed enfumafungin. In entrambi i casi si tratta di metaboliti di origine fungina che hanno dimostrato un forte attività antimicotica verso parecchi patogeni. Ad esempio nel caso del genere di funghi endofiti del genere *Hormonema*, la molecola enfumafungin si è rivelata attiva in test *in vitro* contro funghi del genere *Candida Aspergillus* [182]. Per hyalodendroside A la situazione è simile, essendo stato isolato in funghi del genere *Hyalodendron* [183]. I funghi epifiti vivono all'interno della pianta, colonizzandone i tessuti senza manifestare effetti patogeni stabilendo quindi una relazione simbiotica. In questo caso offrono alla pianta la possibilità di difendersi da altri organismi patogeni (funghi, batteri, insetti. . .) e costituiscono dunque un vantaggio competitivo. Ritrovare questi metaboliti come componenti significativi di una sola specie di Elicriso, può significare che questo tipo di simbiosi non è presente, o lo è in modo differente, nelle altre specie.

La saponina triterpenica auriculatusaponin C è stata isolata nelle radici di *Aster auriculatus* Franch., pianta delle Asteraceae già nota nella medicina orientale; i glicosidi totali estratti da questa pianta hanno dimostrato essere efficaci contro l'ulcera oltre ad una forte attività inibitoria su collagenasi ed elastasi (enzimi proteolitici) [184]. Anche se non vi sono studi specifici sulla molecola, è noto che le saponine manifestino attività antibatterica ed è probabile dunque che gli effetti antiulcera di *A. auriculatus* siano dovuti a queste molecole. Anche questo composto può rivelarsi un utile marker chemotassonomico per la caratterizzazione di *H. hyblaenum*.



## Capitolo 4

# Conclusioni

In questo studio sono state effettuate delle analisi metabolomiche di tipo untargeted su differenti matrici (radici di liquirizia, foglie di vite e fiori di elicriso) con l'obiettivo principale di caratterizzare i profili metabolici delle piante ed evidenziare e spiegare le differenze che intercorrono tra specie diverse. In tutti e tre i casi è stato possibile identificare diversi composti a nota azione farmacologica, che rendono queste piante molto interessanti nella ricerca di nuovi farmaci. Attraverso le analisi multivariate, sono state inoltre individuate diverse molecole in grado di fungere da marker per la distinzione delle diverse specie, alcune già note in letteratura, altre non ancora riportate. Il numero totale delle molecole identificate è molto alto, dimostrando la grande potenza ed affidabilità del metodo utilizzato; per molte molecole sono infatti disponibili informazioni dettagliate (massa esatta, composizione elementare, percorsi di frammentazione) che saranno utili a studi futuri di caratterizzazione metabolica anche di matrici diverse da quelle studiate.

Per quanto concerne le analisi delle radici di liquirizia, la maggior parte dei composti identificati era appartenente alle classi delle saponine e dei flavonoidi, entrambe studiate da molti autori per le diverse proprietà farmacologiche che sono in grado di esercitare. Le analisi qui effettuate hanno comunque dimostrato importanti differenze nella composizione metabolica delle tre specie analizzate. Particolarmente interessante la presenza esclusiva di composti solitamente ritrovati in piante appartenenti alla famiglia delle Moraceae nella specie *Glycyrrhiza glabra*, mai proposti finora in letteratura. Di notevole importanza anche la presenza significativa di calconi prenilati in *G. inflata*. Entrambe le specie cinesi si possono caratterizzare inoltre dalla marcata presenza di flavonoidi coniugati con il solfato. Questo studio ha permesso di evidenziare diverse differenze del metaboloma degli organismi studiati, le quali sono state attribuite principalmente a differenze genetiche, in accordo con altri studi; rimane ancora poco chiaro il ruolo della provenienza geografica, probabilmente a causa dell'altissimo numero di variabili che in questo caso potrebbero influenzare la produzione di metaboliti secondari.

Le analisi delle foglie di portainnesto hanno portato alla caratterizzazione sulla base della composizione parentale delle varie selezioni, le quali si sono dimostrate piuttosto omogenee internamente. L'identificazione dei composti presenti con intensità strumentale maggiore individua nella michelianina e nel kaempferol-O-glucuronide i metaboliti principali di tutte le piante. Questi composti possono essere molto importanti come sostanze per limitare la tossicità di alcuni farmaci. Altri flavonoidi quali catechina, epicatechina e quercitrina costituiscono gli altri metaboliti rilevabili con intensità maggiori nelle foglie di vite. Le tecniche di analisi multivariata portano a considerare particolarmente interessante il gruppo *V. candicans* × *V. rupestris* per la marcata presenza di resveratrolo e suoi oligomeri, presenti ad intensità significativamente superiori agli altri gruppi, che potrebbero conferire una maggiore resistenza ad alcuni funghi. Altrettanto notevole è la presenza di vescalina in *V. riparia* × *V. rupestris* che sembra relazionata alla resistenza alla peronospora.

In generale l'analisi sulle foglie di vite ha permesso la caratterizzazione chimica di organismi non ancora studiati, anche se alcuni molto utilizzati come portainnesto in viticoltura, contribuendo in modo sostanziale allo studio del metabolismo di queste piante, rivelando un notevole potenziale anche per l'utilizzo alimentare-erboristico.

Per quanto riguarda le piante dei elicriso, è stato possibile studiare sempre dal punto di vista metabolico specie diverse ed in particolare due piante sconosciute dal punto di vista chimico: *H. nogaicum* ed *H. hyblaicum*. Queste sono state messe a confronto con le specie a loro geneticamente e geograficamente più vicine rivelandone le differenze. In particolare *H. nogaicum* presenta una certa ricchezza in composti fenolici tra cui tilirosidi ed i glucosidi della luteolina e della quercetina, noti flavonoidi. Sono stati individuati i composti scortechinone F e G come possibili marker molecolari. *H. italicum* si distingue per la presenza di acetogenine, composti finora ritrovati nelle Annonaceae dalle interessanti ma controverse proprietà farmacologiche. *H. stoechas* presenta composti altrettanto particolari come un flavonoide prenilato identificato come kurarinol, kushenol Q oppure kushenol P, inibitori della tirosinasi.

In generale è possibile affermare che le analisi multivariate hanno evidenziato per le piante di elicriso delle differenze molto marcate tra specie diverse, con l'eccezione di *H. hyblaicum* che, pur mantenendosi distinto, risulta molto "vicino" a *H. italicum*.

Quanto visto in questo studio porta ad affermare che le diversità di composizione metabolica riscontrate si possono riflettere in una più o meno evidente differenza negli effetti farmacologici che tali piante possono esercitare anche se molto simili morfologicamente, evidenziando ancora una volta la necessità di controllo e standardizzazione della composizione di prodotti di erboristeria, integratori e prodotti naturali in genere.

# Bibliografia

- [1] O. Fiehn. «Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks». In: *Comparative and Functional Genomics* 2.3 (2001), pp. 155–168. ISSN: 15316912. DOI: 10.1002/cfg.82.
- [2] Oliver Fiehn. «Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes». In: *Plant molecular biology* 48.1-2 (2002), pp. 155–171. ISSN: 0167-4412. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860207>.
- [3] Gaetan Glauser et al. «Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: a systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers». In: *Journal of chromatography A* 1292 (2013), pp. 151–159. ISSN: 1873-3778. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.009. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.009> %20<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274073>.
- [4] Elisa Scalabrin et al. «Metabolomic analysis of wild and transgenic *Nicotiana glauca* plants exposed to abiotic stresses: unraveling metabolic responses». In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (mag. 2015). ISSN: 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-015-8770-7. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-015-8770-7>.
- [5] V. P. Emerenciano et al. «Flavonoids as chemotaxonomic markers for asteraceae». In: *Biochemical Systematics and Ecology* 29.9 (2001), pp. 947–957. ISSN: 03051978. DOI: 10.1016/S0305-1978(01)00033-3. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197801000333>.
- [6] Yuni Wahyuni et al. «Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum sp.*) biodiversity». In: *Metabolomics* 9 (2013), pp. 130–144. DOI: 10.1007/s11306-012-0432-6.
- [7] Giovanni Rizzato et al. «A new exploration of licorice metabolome». In: *Food Chemistry* 221 (2017), pp. 959–968. ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.068. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.068>.

- [8] Xiao-Fei Chen et al. «Liquid chromatography coupled with time-of-flight and ion trap mass spectrometry for qualitative analysis of herbal medicines». In: *Journal of Pharmaceutical Analysis* 1.4 (nov. 2011), pp. 235–245. ISSN: 20951779. DOI: 10.1016/j.jpha.2011.09.008. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177911000359>.
- [9] Anna Vallverdú-Queralt et al. «A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay.» In: *Food chemistry* 154 (lug. 2014), pp. 299–307. ISSN: 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.106. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614000041>.
- [10] María Castro-Puyana e Miguel Herrero. «Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability». In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 52 (dic. 2013), pp. 74–87. ISSN: 01659936. DOI: 10.1016/j.trac.2013.05.016. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993613001830>.
- [11] Diane M Beckles e Ute Roessner. «Plant metabolomics: applications and opportunities for agricultural biotechnology». In: *Plant Biotechnology and Agriculture*. A cura di Arie Altman e Paul Michael Hasegawa. First Edit. Elsevier Inc., 2012. Cap. 5, pp. 67–82. ISBN: 9780123814661. DOI: 10.1016/B978-0-12-381466-1.00005-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00005-5>.
- [12] Lincoln Taiz e Eduardo Zeiger. *Plant physiology*. Sinauer Associates, 2010. ISBN: 9780878938667.
- [13] J Degenhardt e J Gershenzon. «Terpenoids». In: *Encyclopedia of Applied Plant Science*. A cura di Thomas Brau. Academic Press Elsevier, 2003, pp. 500–504. ISBN: 978-0-12-227050-5.
- [14] Azadeh Manayi et al. «Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases». In: *Pharmacological Reports* 68.4 (2016), pp. 671–679. ISSN: 17341140. DOI: 10.1016/j.pharep.2016.03.014. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.014>.
- [15] Ramona Barbieri et al. «Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity». In: *Microbiological Research* 196 (2017), pp. 44–68. ISSN: 09445013. DOI: 10.1016/j.micres.2016.12.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.003>.

- [16] Ritesh Mewalal et al. «Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels». In: *Trends in Biotechnology* 35.3 (2017), pp. 227–240. ISSN: 18793096. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.08.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.003>.
- [17] Wilfred Vermerris e Ralph Nicholson. «Families of Phenolic Compounds and Means of Classification». In: *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, pp. 1–34. DOI: 10.1007/978-1-4020-5164-7\_1. URL: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-5164-7%7B%5C\\_%7D1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-5164-7%7B%5C_%7D1).
- [18] Ze-Nai Chen. «Coumarins». In: *Introduction to natural products chemistry*. A cura di Rensheng Xu, Yang Ye e Weimin Zhao. CRC Press Taylor & Francis group, 2012. Cap. 11, pp. 205–224.
- [19] David M. Pereira et al. «Phenolics: From chemistry to biology». In: *Molecules* 14.6 (2009), pp. 2202–2211. ISSN: 14203049. DOI: 10.3390/molecules14062202.
- [20] Sabrina Schläger e Birgit Dräger. «Exploiting plant alkaloids». In: *Current Opinion in Biotechnology* 37 (2016), pp. 155–164. ISSN: 18790429. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.12.003.
- [21] Ren-Sheng Xu e Yang Ye. «Alkaloids». In: *Introduction to natural products chemistry*. A cura di Rensheng Xu, Yang Ye e Weimin Zhao. CRC Press Taylor & Francis group, 2012. Cap. 4, pp. 55–79.
- [22] Laura Bravo. «Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance». In: *Nutrition Reviews* 56.11 (2009), pp. 317–333. ISSN: 00296643. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x. URL: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>.
- [23] De-Yun Kong. «Flavonoids». In: *Introduction to natural products chemistry*. A cura di Rensheng Xu, Yang Ye e Weimin Zhao. CRC Press Taylor & Francis group, 2012. Cap. 9, pp. 169–188. ISBN: 9781437723335. DOI: 10.1016/B978-1-4377-2333-5.00092-4.
- [24] D. Treutter. «Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis». In: *Plant Biology* 7.6 (2005), pp. 581–591. ISSN: 14358603. DOI: 10.1055/s-2005-873009.
- [25] Diane F. Birt, Suzanne Hendrich e Weiqun Wang. «Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids». In: *Pharmacology and Therapeutics* 90.2-3 (2001), pp. 157–177. ISSN: 01637258. DOI: 10.1016/S0163-7258(01)00137-1.
- [26] Toshio Aoki, Tomoyoshi Akashi e Shin-ichi Ayabe. «Flavonoids of Leguminous Plants: Structure, Biological Activity, and Biosynthesis». In: *Journal of Plant Research* 113.4 (2000), pp. 475–488. ISSN: 0918-9440. DOI: 10.1007/PL00013958.

- [27] Jakub Tremel e Karel Smejkal. «Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals». In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15.4 (2016), pp. 720–738. ISSN: 15414337. DOI: 10.1111/1541-4337.12204.
- [28] Gerard M Boland e Dervilla M X Donnelly. «Isoflavonoids and related compounds». In: *Natural Products Report* 15 (1998), pp. 241–260.
- [29] B J Boersma et al. «Soy isoflavonoids and cancer – metabolism at the target site.» In: *Mutation research* 480-481 (2001), pp. 121–127. ISSN: 00275107. DOI: 10.1016/S0027-5107(01)00175-0.
- [30] Barbara Romano et al. «Novel insights into the pharmacology of flavonoids». In: *Phytotherapy Research* 27.11 (2013), pp. 1588–1596. ISSN: 0951418X. DOI: 10.1002/ptr.5023.
- [31] Oyvind M Andersen e Kenneth R Markham. *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. Vol. 45. 41. 2006, p. 1237. ISBN: 0-8493-2021-6. DOI: 0-8493-2021-6.
- [32] Edmon Wong. «The role of chalcones and flavanones in flavonoid biosynthesis». In: *Phytochemistry* 7.1964 (1968), pp. 1751–1758.
- [33] Manjinder Singh, Maninder Kaur e Om Silakari. «Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry». In: *European Journal of Medicinal Chemistry* 84 (2014), pp. 206–239. ISSN: 17683254. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.07.013. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.013>.
- [34] Pravin Vasant Rao Gadkari e Manohar Balaraman. «Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review». In: *Food and Bioprocess Technology* 93.August 2013 (2015), pp. 122–138. ISSN: 09603085. DOI: 10.1016/j.fbp.2013.12.004. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.004>.
- [35] H Mehansho, L G Butler e D M Carlson. «Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Induction, and Defense Mechanisms». In: *Annual Review of Nutrition* 7.1 (lug. 1987), pp. 423–440. ISSN: 0199-9885. DOI: 10.1146/annurev.nu.07.070187.002231. URL: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nu.07.070187.002231>.
- [36] Raymond V. Barbehenn e C. Peter Constabel. «Tannins in plant-herbivore interactions». In: *Phytochemistry* 72.13 (2011), pp. 1551–1565. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040.
- [37] De Yu Xie e Richard A. Dixon. «Proanthocyanidin biosynthesis - Still more questions than answers?» In: *Phytochemistry* 66.18 SPEC. ISS. (2005), pp. 2127–2144. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.01.008.



- [38] J.-P Salminen et al. «Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry». In: *Journal of Chromatography A* 864 (1999), pp. 283–291. URL: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com).
- [39] Patrizia Comandini et al. «Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC-DAD-MS». In: *Food Chemistry* 157 (2014), pp. 290–295. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.003. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.003>.
- [40] Jörg M. Augustin et al. «Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins». In: *Phytochemistry* 72.6 (2011), pp. 435–457. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>.
- [41] Yadollah Bahrami, Wei Zhang e Chris Franco. «Discovery of novel saponins from the viscera of the sea cucumber *Holothuria lessona*». In: *Marine drugs* 12.5 (mag. 2014), pp. 2633–67. ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md12052633. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4052309%7B%5C%7Dtool=pmcentrez%7B%5C%7Drendertype=abstract>.
- [42] J B Harborne. «Phytoalexins, Natural Plant Protection». In: *Encyclopedia of Applied Plant Science*. A cura di Thomas Brau. Academic Press Elsevier, 2003, pp. 1152–1159. ISBN: 978-0-12-227050-5.
- [43] Peng Wu et al. «Triterpenoid saponins with anti-inflammatory activities from *Ilex pubescens* roots». In: *Phytochemistry* 134 (2017), pp. 122–132. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.11.012. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.11.012>.
- [44] Gerardo Magela et al. «New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L .». In: 186 (2015), pp. 160–167. ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.005.
- [45] Hilal Top et al. «Immunomodulatory, hemolytic properties and cytotoxic activity potent of triterpenoid saponins from *Cephalaria balansae*». In: *Phytochemistry* 137 (2017), pp. 139–147. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.02.015. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.015>.
- [46] Xiaoming Song e Songhua Hu. «Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs». In: *Vaccine* 27.36 (2009), pp. 4883–4890. ISSN: 0264410X. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.033.

- [47] Zhan Zhi Xie et al. «Paris saponin-induced autophagy promotes breast cancer cell apoptosis via the Akt/mTOR signaling pathway». In: *Chemico-Biological Interactions* 264 (2017), pp. 1–9. ISSN: 18727786. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.01.004. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.01.004>.
- [48] S G Sparg et al. «Biological activities and distribution of plant saponins». In: *Journal of Ethnopharmacology* 94.2-3 (ott. 2004), pp. 219–243. ISSN: 0378-8741. DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.016. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104002557>.
- [49] Özlem Güçlü-Üstündağ e Giuseppe Mazza. «Saponins: Properties, Applications and Processing». In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47.3 (mar. 2007), pp. 231–258. ISSN: 1040-8398. DOI: 10.1080/10408390600698197. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390600698197>.
- [50] Biswanath Dinda et al. «Naturally Occurring Triterpenoid Saponins». In: *Chemistry and Biodiversity* 7 (2010), pp. 2327–2580.
- [51] Irma Podolak, Agnieszka Galanty e Danuta Sobolewska. «Saponins as cytotoxic agents: a review.» In: *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe* 9.3 (set. 2010), pp. 425–474. ISSN: 1568-7767. DOI: 10.1007/s11101-010-9183-z. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2928447%7B%5C%7Dtool=pmcentrez%7B%5C%7Drendertype=abstract>.
- [52] Weiwei Tao et al. «Comparison of three officinal Chinese pharmacopoeia species of Glycyrrhiza based on separation and quantification of triterpene saponins and chemometrics analysis.» In: *Food chemistry* 141.3 (dic. 2013), pp. 1681–9. ISSN: 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.073. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870878>.
- [53] Young-Won Chin et al. «Antioxidant constituents of licorice roots and stolons (*Glycyrrhiza glabra*)». In: *Journal of agricultural and food chemistry* 55 (2007), pp. 4691–4697. DOI: 10.1021/jf0703553.
- [54] J. A. Douglas et al. «Effect of plant density and depth of harvest on the production and quality of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) root harvested over 3 years». In: *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 32.4 (2004), pp. 363–373. ISSN: 0114-0671. DOI: 10.1080/01140671.2004.9514317.
- [55] R A Isbrucker e G A Burdock. «Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root ( *Glycyrrhiza* sp .), its extract and powder as a food ingredient , with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin». In: *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 46.3 (dic. 2006), pp. 167–192. ISSN: 0273-2300. DOI:

- 10.1016/j.yrtph.2006.06.002. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230006001127>.
- [56] Cristina Fiore et al. «A history of the therapeutic use of liquorice in Europe.» In: *Journal of ethnopharmacology* 99.3 (lug. 2005), pp. 317–24. ISSN: 0378-8741. DOI: 10.1016/j.jep.2005.04.015. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15978760>.
- [57] Xiaoying Wang et al. «Liquorice, a unique "guide drug" of traditional Chinese medicine: a review of its role in drug interactions.» In: *Journal of ethnopharmacology* 150.3 (dic. 2013), pp. 781–90. ISSN: 1872-7573. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.055. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201019>.
- [58] Taro Nomura, Toshio Fukai e Toshiyuki Akiyama. «Chemistry of phenolic compounds of licorice (*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cytotoxic activities». In: *Pure and Applied Chemistry* 74.7 (gen. 2002), pp. 1199–1206. ISSN: 1365-3075. DOI: 10.1351/pac200274071199. URL: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2002.74.issue-7/pac200274071199/pac200274071199.xml>.
- [59] Qingying Zhang e Min Ye. «Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice).» In: *Journal of chromatography. A* 1216.11 (mar. 2009), pp. 1954–69. ISSN: 1873-3778. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.07.072. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703197> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308011369>.
- [60] Mohamed a Farag, Andrea Porzel e Ludger a Wessjohann. «Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques.» In: *Phytochemistry* 76 (apr. 2012), pp. 60–72. ISSN: 1873-3700. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.12.010. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22336263>.
- [61] Paola Montoro et al. «Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS.» In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 54.3 (feb. 2011), pp. 535–44. ISSN: 1873-264X. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.10.004. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041055>.
- [62] Liqiang Wang et al. «The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb». In: *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5.4 (2015), pp. 310–315. ISSN: 22113843. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.05.005. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.005>.

- [63] Cristina Fiore et al. «Antiviral Effects of Glycyrrhiza species». In: *Phytotherapy research* 22 (2008), pp. 141–148. DOI: 10.1002/ptr.
- [64] Toshio Fukai et al. «Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract». In: *Life Sciences* 71.12 (ago. 2002), pp. 1449–1463. ISSN: 00243205. DOI: 10.1016/S0024-3205(02)01864-7. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320502018647>.
- [65] Marjan Nassiri Asl e Hossein Hosseinzadeh. «Review of Pharmacological Effects of Glycyrrhiza sp. and its Bioactive Compounds». In: *Phytotherapy research* 22 (2008), pp. 709–724. DOI: 10.1002/ptr.
- [66] Kumar Anil e Dora Jyotsna. «Review on Glycyrrhiza glabra (Licorice)». In: *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* 1.2 (2012), pp. 1–4. DOI: 10.1056/NEJMra1313875.
- [67] Jean Frédéric Terral et al. «Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars.» In: *Annals of botany* 105.3 (2010), pp. 443–455. ISSN: 10958290. DOI: 10.1093/aob/mcp298.
- [68] Markus Keller. «Botany and Anatomy». In: *The Science of Grapevines*. 2015, pp. 1–57. ISBN: 978-0-12-374881-2. DOI: 10.1016/B978-0-12-419987-3.00001-7. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124199873000017>.
- [69] Andreia Figueiredo et al. «Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi». In: *Journal of Experimental Botany* 59.12 (2008), pp. 3371–3381. ISSN: 00220957. DOI: 10.1093/jxb/ern187.
- [70] Fabrizio Mattia et al. «Study of genetic relationships between wild and domesticated grapevine distributed from Middle East Regions to European countries». In: *Rendiconti Lincei* 19.3 (2008), pp. 223–240. ISSN: 1120-6349. DOI: 10.1007/s12210-008-0016-6.
- [71] Melané A. Vivier e Isak S. Pretorius. «Genetically tailored grapevines for the wine industry». In: *Trends in Biotechnology* 20.11 (2002), pp. 472–478. ISSN: 01677799. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)02058-9.
- [72] Michaela Griesser et al. «Phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) alters the carbohydrate metabolism in root galls to allowing the compatible interaction with grapevine (*Vitis* spp.) roots.» In: *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 234 (mag. 2015), pp. 38–49. ISSN: 1873-2259. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.02.002. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945215000382>.

- [73] M. De Rosso et al. «Identification of new flavonols in hybrid grapes by combined liquid chromatography-mass spectrometry approaches». In: *Food Chemistry* 163 (2014), pp. 244–251. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.110. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.110>.
- [74] Emily J. Warschefsky et al. «Rootstocks: Diversity, Domestication, and Impacts on Shoot Phenotypes». In: *Trends in Plant Science* 21.5 (2016), pp. 418–437. ISSN: 13601385. DOI: 10.1016/j.tplants.2015.11.008. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>.
- [75] Rachel S Meyer, Ashley E DuVal e Helen R Jensen. «Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops.» In: *The New Phytologist* 196.1 (2012), pp. 29–48. ISSN: 1469-8137. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04253.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889076>.
- [76] J. Cambrollé et al. «Physiological responses to soil lime in wild grapevine (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*)». In: *Environmental and Experimental Botany* 105 (set. 2014), pp. 25–31. ISSN: 00988472. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.04.004. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847214001002>.
- [77] I. Serra et al. «Review: The interaction between rootstocks and cultivars (*Vitis vinifera* L.) to enhance drought tolerance in grapevine». In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20.1 (2014), pp. 1–14. ISSN: 17550238. DOI: 10.1111/ajgw.12054.
- [78] Southey Jm e Jooste Jh. «The effect of grapevine rootstock on the performance of *Vitis vinifera* L. (cv. Colombard) on a relatively saline soil». In: *South African Journal of Enology and Viticulture* 12.1 (1991), pp. 32–41.
- [79] Maurizio Zamboni et al. «Vegetative, physiological and nutritional behavior of new grapevine rootstocks in response to different nitrogen supply». In: *Scientia Horticulturae* 202 (apr. 2016), pp. 99–106. ISSN: 03044238. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.02.032. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423816300796>.
- [80] C Dani et al. «Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage.» In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24.1 (feb. 2010), pp. 148–53. ISSN: 1879-3177. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.08.006. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233309002252>.

- [81] Peter Langcake e Robert J. Pryce. «The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation». In: *Phytochemistry* 16.8 (gen. 1977), pp. 1193–1196. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94358-9. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942200943589>.
- [82] W. Dercks e L. L. Creasy. «The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction». In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34.3 (1989), pp. 189–202. ISSN: 10961178. DOI: 10.1016/0885-5765(89)90043-X.
- [83] George J. Soleas, Eleftherios P. Diamandis e David M. Goldberg. «Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?». In: *Clinical Biochemistry* 30.2 (1997), pp. 91–113. ISSN: 00099120. DOI: 10.1016/S0009-9120(96)00155-5.
- [84] Stéphane Bastianetto, Caroline Ménard e Rémi Quirion. «Neuroprotective action of resveratrol». In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1852.6 (giu. 2015), pp. 1195–1201. ISSN: 1879260X. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.09.011. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443914002920>.
- [85] Khushwant S. Bhullar e Chibuike C. Udenigwe. «Clinical evidence of resveratrol bioactivity in cardiovascular disease». In: *Current Opinion in Food Science* 8 (apr. 2016), pp. 68–73. ISSN: 22147993. DOI: 10.1016/j.cofs.2016.03.005. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799316300510>.
- [86] Mary Ndiaye et al. «The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: Promise, prospects, and challenges». In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 508.2 (2011), pp. 164–170. ISSN: 00039861. DOI: 10.1016/j.abb.2010.12.030. arXiv: NIHMS150003.
- [87] Tamaro S. Hudson et al. «Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms». In: *Cancer Research* 67.17 (2007), pp. 8396–8405. ISSN: 00085472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4069.
- [88] Jin Hu et al. «Polyphenols isolated from leaves of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* regulate APP related pathway». In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26.2 (gen. 2016), pp. 505–11. ISSN: 1464-3405. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.11.085. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X15302936>.
- [89] Daniel Antunes Viegas et al. «*Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data». In: *Journal of Ethnopharmacology* 151.1 (2014), pp. 54–65. ISSN: 03788741. DOI: 10.1016/j.jep.2013.11.005.

- [90] E. Czinner et al. «In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench». In: *Journal of Ethnopharmacology* 73.3 (2000), pp. 437–443. ISSN: 03788741. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00304-4.
- [91] Marisa R. Barroso et al. «Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer». In: *Industrial Crops and Products* 53 (2014), pp. 330–336. ISSN: 09266690. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.01.004.
- [92] Daniela Rigano et al. «Intestinal antispasmodic effects of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *italicum* and chemical identification of the active ingredients». In: *Journal of Ethnopharmacology* 150.3 (2013), pp. 901–906. ISSN: 03788741. DOI: 10.1016/j.jep.2013.09.034. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.034>.
- [93] Marina Carini et al. «LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*». In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24.3 (2001), pp. 517–526. ISSN: 07317085. DOI: 10.1016/S0731-7085(00)00431-3.
- [94] Angela Mari et al. «Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements». In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 96 (2014), pp. 249–255. ISSN: 1873264X. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.005. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.005>.
- [95] Vassilios Roussis et al. «Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece». In: *Biochemical Systematics and Ecology* 28.2 (2000), pp. 163–175. ISSN: 03051978. DOI: 10.1016/S0305-1978(99)00046-0.
- [96] Ric C H De Vos et al. «Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry». In: *Nature protocols* 2.4 (2007), pp. 778–791. ISSN: 1750-2799. DOI: 10.1038/nprot.2007.95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446877>.
- [97] Arjen Lommen et al. «metAlignID: a high-throughput software tool set for automated detection of trace level contaminants in comprehensive LECO two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry data.» In: *Journal of chromatography. A* 1263 (2012), pp. 169–178. ISSN: 1873-3778. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.056. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046623>.
- [98] J. Xia et al. «MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful». In: *Nucleic Acids Research* (2015), pp. 1–7. ISSN: 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gkv380.

- [99] Lloyd W Sumner et al. «Proposed minimum reporting standards for chemical analysis». In: *Metabolomics* 3.3 (2007), pp. 211–221. ISSN: 1573-3882. DOI: 10.1007/s11306-007-0082-2. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s11306-007-0082-2>.
- [100] Charlotte Simmler, Guido F Pauli e Shao-Nong Chen. «Phytochemistry and biological properties of glabridin.» en. In: *Fitoterapia* 90 (ott. 2013), pp. 160–84. ISSN: 1873-6971. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.07.003. URL: <http://europepmc.org/articles/PMC3795865?report=abstract>.
- [101] Jun-ichi Furusawa et al. «Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 in LPS signaling pathway». In: *International Immunopharmacology* 9.4 (apr. 2009), pp. 499–507. ISSN: 15675769. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.01.031. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576909000502>.
- [102] Trong Tuan Dao et al. «Chalcones as novel influenza A (H1N1) neuraminidase inhibitors from Glycyrrhiza inflata.» In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 21.1 (gen. 2011), pp. 294–8. ISSN: 1464-3405. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.11.016. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X10016288>.
- [103] Toshio Fukai, Qing-Hua Wang e Taro Nomura. *Four New Prenylated Flavonoids from Aerial Parts of Glycyrrhiza uralensis*. 1989. DOI: 10.3987/COM-89-4998. URL: <https://www.heterocycles.jp/newlibrary/payments/form/03748/PDF> (visitato il 07/03/2016).
- [104] Nguyen Tuan Hiep et al. «Isoflavones with neuroprotective activities from fruits of Cudrania tricuspidata». In: *Phytochemistry* 111 (2015), pp. 141–148. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.10.021. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.021>.
- [105] Sheng-Jun Dai et al. «Guangsangons F-J, anti-oxidant and anti-inflammatory Diels-Alder type adducts, from Morus macroura Miq.» In: *Phytochemistry* 65.23 (dic. 2004), pp. 3135–41. ISSN: 0031-9422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.07.010. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204003498>.
- [106] Toshio Fukai et al. «Isoprenylated flavanones from Morus cathayana». In: *Phytochemistry* 47.2 (1998), pp. 273–280.
- [107] Shigeru Matsuyama, Yasumasa Kuwahara e Takahisa Suzuki. «A New 2-Arylbenzofuran,  $\omega$ -Hydroxy Moracin N, from Mulberry Leaves». In: *Agric Biol Chem* 55.5 (1991), pp. 1409–1410. DOI: 10.1080/00021369.1991.10870752.



- [108] T Fukai et al. «Antimicrobial activity of isoprenoid-substituted xanthenes from *Cudrania cochinchinensis* against vancomycin-resistant enterococci.» In: *Phytochemistry : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 12.6-7 (giu. 2005), pp. 510–3. ISSN: 0944-7113. DOI: 10.1016/j.phymed.2004.03.010. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711305000309>.
- [109] Toshio Miyase et al. «Antioxidants from *Lespedeza homoloba*. (I)». In: *Phytochemistry* 52.2 (1999), pp. 303–310. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/S0031-9422(99)00195-8.
- [110] G. A. Herbin e W. A. Wolstenholme. «The biflavonoids of *Garcinia volkensii* (Guttiferae)». In: *Phytochemistry* 9.1967 (1970), pp. 221–226.
- [111] Wayne C. Liao et al. «Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components». In: *Food Chemistry* 132.4 (giu. 2012), pp. 2188–2193. ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.12.051. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611018206> <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.051> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611018206>.
- [112] Weiyu Wang et al. «The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review». In: *Trends in Food Science and Technology* 56 (2016), pp. 21–38. ISSN: 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.07.004. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.004>.
- [113] Denis Barron et al. «Sulphated flavonoids—an update». In: *Phytochemistry* 27.8 (gen. 1988), pp. 2375–2395. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/0031-9422(88)87003-1. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942288870031>.
- [114] Gerald Rimbach et al. «Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function.» In: *Biochimica et biophysica acta* 1670.3 (feb. 2004), pp. 229–37. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbagen.2003.12.008. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416503002721>.
- [115] Lenka Roubalová et al. «Sulfation modulates the cell uptake, antiradical activity and biological effects of flavonoids in vitro: An examination of quercetin, isoquercitrin and taxifolin.» In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 23.17 (set. 2015), pp. 5402–9. ISSN: 1464-3391. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.055. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089615006392>.

- [116] Stanislav Kopriva. «Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond». In: *Annals of Botany* 97.4 (2006), pp. 479–495. ISSN: 03057364. DOI: 10.1093/aob/mcl006.
- [117] Hiroaki Hayashi, Etsuko Miwa e Kenichiro Inoue. «Phylogenetic relationship of Glycyrrhiza lepidota, American licorice, in genus Glycyrrhiza based on rbcL sequences and chemical constituents.» In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 28.1 (2005), pp. 161–4. ISSN: 0918-6158. DOI: 10.1248/bpb.28.161. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635184>.
- [118] Bruno Botta et al. «Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology.» In: *Current medicinal chemistry* 12.6 (2005), pp. 717–739. ISSN: 09298673. DOI: 10.2174/0929867053202241.
- [119] Xiaoman Yang et al. «Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities». In: *Trends in Food Science & Technology* 44.1 (lug. 2015), pp. 93–104. ISSN: 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.03.007. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224415000710>.
- [120] Maya Mori-Hongo et al. «Melanin Synthesis Inhibitors from *Lespedeza floribunda*». In: *Journal of Natural Products* 72.1 (2009), pp. 194–203. ISSN: 0163-3864. DOI: 10.1021/np800535g. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np800535g>.
- [121] F Mattivi et al. «Metabolite profiling of grapes: flavonols and anthocyanins». In: *J Agric Food Chem* 54 (2006), pp. 7692–7702. DOI: 10.1021/jf061538c.
- [122] Kasi Pandima Devi et al. «Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine». In: *Pharmacological Research* 99 (2015), pp. 1–10. ISSN: 10961186. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.05.002. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002>.
- [123] P Limtrakul, O Khantamat e K Pintha. «Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin.» In: *Journal of chemotherapy* 17.1 (2005), pp. 86–95. ISSN: 1120-009X. DOI: 10.1179/joc.2005.17.1.86. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15828450>.
- [124] Chi Chun Wong et al. «Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6)». In: *Biochemical Pharmacology* 81.7 (apr. 2011), pp. 942–949. ISSN: 00062952. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.01.004. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295211000372>.

- [125] Daniela Ilieva Batovska et al. «Preliminary study on biomarkers for the fungal resistance in *Vitis vinifera* leaves». In: *Journal of Plant Physiology* 165.8 (2008), pp. 791–795. ISSN: 01761617. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.09.005.
- [126] Loïc Becker et al. «Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using negative ion electrospray–Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.» In: *Analytica chimica acta* 795 (set. 2013), pp. 44–51. ISSN: 1873-4324. DOI: 10.1016/j.aca.2013.07.068. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267013010441>.
- [127] Xiaomeng Zhang et al. «Anti-genotoxic activity of *Vitis coignetiae* Pulliat towards heterocyclic amines and isolation and identification of caftaric acid as an antimutagenic component from the juice». In: *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 723.2 (2011), pp. 182–189. ISSN: 13835718. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.05.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.001>.
- [128] Merton Sandler e Roger Pinder. *Wine A Scientific Exploration*. A cura di Merton Sandler e Roger Pinder. Taylor e Francis group, 2003, p. 336. ISBN: 0415247349.
- [129] Maria J. Kruger et al. «Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases». In: *Food Research International* 59 (2014), pp. 41–52. ISSN: 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.046. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.046>.
- [130] Sudheer K. Mantena, Manjeshwar S. Baliga e Santosh K. Katiyar. «Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells». In: *Carcinogenesis* 27.8 (dic. 2006), pp. 1682–1691. ISSN: 01433334. DOI: 10.1093/carcin/bgl1030. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597645> %20https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgl1030.
- [131] Miao He et al. «A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin». In: *Fitoterapia* 115 (2016), pp. 74–85. ISSN: 18736971. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.09.011. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.011>.
- [132] M. Antónia Nunes et al. «Cardioprotective properties of grape seed proanthocyanidins: An update». In: *Trends in Food Science and Technology* 57 (2016), pp. 31–39. ISSN: 09242244. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.08.017.

- [133] Hiroyuki Sakakibara et al. «Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas». In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003), pp. 571–581.
- [134] Venkatesh Bollina et al. «Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry». In: *Plant Molecular Biology* 77.4-5 (2011), pp. 355–370. ISSN: 01674412. DOI: 10.1007/s11103-011-9815-8.
- [135] L.P. Christensen. «Rootstock Selection». In: *Wine grape varieties in California* (2003), pp. 12–15.
- [136] Fadi Qa'dan et al. «Cinchonain Ib isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo». In: *Journal of Ethnopharmacology* 124.2 (2009), pp. 224–227. ISSN: 03788741. DOI: 10.1016/j.jep.2009.04.023.
- [137] Alberto Palliotti, Stefano Poni e Oriana Silvestroni. *La nuova viticoltura - Innovazioni tecniche per modelli produttivi efficienti e sostenibili*. A cura di Edagricole - New Business Media. 2015, p. 544. ISBN: 978-88-506-5453-6.
- [138] Bin Zhang et al. «Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: Towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug». In: *European Journal of Pharmacology* 530.1-2 (2006), pp. 166–171. ISSN: 00142999. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.11.030.
- [139] Youyou Tu e Youyou Tu. «Chapter 3 – Research on *Artemisia annua* L. for the Treatment of Malaria». In: *From Artemisia Annuua L. to Artemisininins*. 2017, pp. 51–84. ISBN: 9780128116555. DOI: 10.1016/B978-0-12-811655-5.00003-9. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128116555000039>.
- [140] Anna K. Picman. «Biological activities of sesquiterpene lactones». In: *Biochemical Systematics and Ecology* 14.3 (1986), pp. 255–281. ISSN: 03051978. DOI: 10.1016/0305-1978(86)90101-8. arXiv: 0305-1978(86)90101-8 [10.1016].
- [141] Ali Esmail Al-Snafi. «Medical importance of *Anthemis nobilis* - a review». In: *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 6.2 (2016), pp. 89–95.
- [142] Xiangqing Pan e Xuemin Wang. «Profiling of plant hormones by mass spectrometry.» In: *Journal of chromatography. B*, 877.26 (2009), pp. 2806–2813. ISSN: 1873-376X. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.04.024. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19427277>.
- [143] Chunhui Ma et al. «Two new antioxidant malonated caffeoylquinic acid isomers in fruits of wild eggplant relatives». In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59.17 (2011), pp. 9645–9651. ISSN: 00218561. DOI: 10.1021/jf202028y.

- [144] José Antonio Del Rio et al. *Furanocoumarins: Biomolecules of therapeutic interest*. Vol. 43. 2014, pp. 145–195. ISBN: 9780444634306. DOI: 10.1016/B978-0-444-63430-6.00005-9.
- [145] Tsuyoshi Goto et al. «Tiliroside, a glycosidic flavonoid, inhibits carbohydrate digestion and glucose absorption in the gastrointestinal tract». In: *Molecular Nutrition and Food Research* 56.3 (2012), pp. 435–445. ISSN: 16134125. DOI: 10.1002/mnfr.201100458.
- [146] Tsuyoshi Goto et al. «Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice». In: *Journal of Nutritional Biochemistry* 23.7 (2012), pp. 768–776. ISSN: 09552863. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2011.04.001. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.04.001>.
- [147] Long Ze Lin e James M. Harnly. «Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)». In: *Food Chemistry* 120.1 (2010), pp. 319–326. ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.083. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.083>.
- [148] Adriana Dillenburg Meinhart et al. «Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil». In: *Food Research International* 99 (2017), pp. 522–530. ISSN: 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.06.017. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917302697>.
- [149] Sunit Suksamrarn et al. «Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*.» In: *Chemical & pharmaceutical bulletin* 51.7 (2003), pp. 857–9. ISSN: 0009-2363. DOI: 10.1248/cpb.51.857. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991497>.
- [150] Ji Hong Hwang et al. «(+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*.» In: *Biochimie* 94.8 (2012), pp. 1784–1793. ISSN: 03009084. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.04.010. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.010>.
- [151] Yao Yue Fan et al. «Phainanoids A-F, A new class of potent immunosuppressive triterpenoids with an unprecedented carbon skeleton from *Phyllanthus hainanensis*.» In: *Journal of the American Chemical Society* 137.1 (2015), pp. 138–141. ISSN: 15205126. DOI: 10.1021/ja511813g.

- [152] Stefan Schwaiger et al. «Leontopodic acid - A novel highly substituted glucaric acid derivative from Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) and its antioxidative and DNA protecting properties». In: *Tetrahedron* 61.19 (2005), pp. 4621–4630. ISSN: 00404020. DOI: 10.1016/j.tet.2005.03.002.
- [153] Shivanand D. Jolad et al. «Diterpenoids and acetogenins of *Blepharizonza plumosa*». In: *Phytochemistry* 29.3 (1990), pp. 905–910. ISSN: 00319422. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80043-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80043-G). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003194229080043G><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917302697>.
- [154] Shi Sun et al. «Novel Annonaceous acetogenins from *Graviola* (*Annona muricata*) fruits with strong anti-proliferative activity». In: *Tetrahedron Letters* 58.19 (mag. 2017), pp. 1895–1899. ISSN: 00404039. DOI: 10.1016/j.tetlet.2017.04.016. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403917304458>.
- [155] Yun-Jie Miao et al. «Three cytotoxic Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*». In: *Phytochemistry Letters* 16 (giu. 2016), pp. 92–96. ISSN: 18743900. DOI: 10.1016/j.phyto.2016.03.006. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390016300325>.
- [156] Shi Sun et al. «Isolation of three new annonaceous acetogenins from *Graviola* fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3». 2016. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X15006319>.
- [157] Natacha Bonneau et al. «The fruit of *Annona squamosa* L. as a source of environmental neurotoxins: From quantification of squamocin to annotation of Annonaceous acetogenins by LC-MS/MS analysis». In: *Food Chemistry* 226 (lug. 2017), pp. 32–40. ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.042. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617300420>.
- [158] Yu Shao et al. «Medicagenic acid saponins from *Aster batangensis*». In: *Phytochemistry* 39.4 (lug. 1995), pp. 875–881. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00016-Z. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003194229500016Z>.
- [159] Jin Young Kim et al. «Dicaffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity». In: *Food Chemistry* 125.1 (2011), pp. 55–62. ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.035. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.035>.

- [160] Yong Pil Hwang et al. «Protective mechanisms of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from *Salicornia herbacea* against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage». In: *Chemico-Biological Interactions* 181.3 (2009), pp. 366–376. ISSN: 00092797. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.07.017.
- [161] Youngjoo Kwon. «Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer’s disease». In: *Experimental Gerontology* 95 (set. 2017), pp. 39–43. ISSN: 05315565. DOI: 10.1016/j.exger.2017.05.014. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556517302140>.
- [162] Mingde Zang et al. «Luteolin suppresses angiogenesis and vasculogenic mimicry formation through inhibiting Notch1-VEGF signaling in gastric cancer». 2017. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17312718>.
- [163] Minhua Peng et al. «Luteolin restricts dengue virus replication through inhibition of the proprotein convertase furin». In: *Antiviral Research* 143 (lug. 2017), pp. 176–185. ISSN: 01663542. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.03.026. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354216306635>.
- [164] I Merfort e D Wendisch. «New Flavonoid Glycosides from *Arnicae Flos* DAB 91.» In: *Planta medica* 58.4 (1992), pp. 355–357. ISSN: 0032-0943 (Print). DOI: 10.1055/s-2006-961484.
- [165] Jaco C. Breytenbach. «Isoflavones glycosides from *Neorautanenia amboensis*». In: *Journal of Natural Products* 49.6 (1986), pp. 1003–1009. DOI: 10.1021/np50048a006.
- [166] A.C.U. Lourens, A.M. Viljoen e F.R. van Heerden. «South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry». In: *Journal of Ethnopharmacology* 119.3 (ott. 2008), pp. 630–652. ISSN: 03788741. DOI: 10.1016/j.jep.2008.06.011. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108003292>.
- [167] Nan Kyoung Lee et al. «Prenylated Flavonoids as Tyrosinase Inhibitors». In: *Arch Pharm Res* 27.11 (2004), pp. 1132–1135. ISSN: 0253-6269. DOI: 10.1007/BF02975118.
- [168] Sook Kyung Hyun et al. «Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis.» In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 31.1 (2008), pp. 154–158. ISSN: 0918-6158. DOI: 10.1248/bpb.31.154.

- [169] Fanny I. Schabes e E. Elizabeth Sigstad. «A calorimetric study of the allelopathic effect of cnicin isolated from *Centaurea diffusa* Lam. on the germination of soybean (*Glicine max*) and radish (*Raphanus sativus*)». In: *Thermochimica Acta* 458.1-2 (2007), pp. 84–87. ISSN: 00406031. DOI: 10.1016/j.tca.2007.01.017.
- [170] Karin Johrer et al. «Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: Impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target». In: *Journal of Molecular Medicine* 90.6 (2012), pp. 681–693. ISSN: 09462716. DOI: 10.1007/s00109-011-0848-x.
- [171] Manami Kurita et al. «Synthetic study of cnicin: Synthesis of the side chain and its esterification». In: *Tetrahedron Letters* 57.52 (2016), pp. 5899–5901. ISSN: 18733581. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.11.067. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.11.067>.
- [172] Ahmed Ashour et al. «Melanin Biosynthesis Inhibitory Activity of Compounds Isolated from Unused Parts of *Ammi visinaga*». In: *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 3.3B (2013), pp. 40–43. DOI: 10.4236/jcdsa.2013.33A2010.
- [173] Juan Duarte et al. «Effects of visnadina on rat isolated vasculr smooth muscles». In: *Planta Medica*, 63.3 (1997), pp. 233–236. DOI: 10.1055/s-2006-957660.
- [174] Chien Chih Chen, Wen Chi Hsin e Yu Lin Huang. «Six new diarylbutane lignans from *Justicia procumbens*». In: *Journal of Natural Products* 61.2 (1998), pp. 227–229. ISSN: 01633864. DOI: 10.1021/np9703860.
- [175] Hong Jin et al. «Cytotoxic activity of lignans from *Justicia procumbens*». In: *Fitoterapia* 94 (apr. 2014), pp. 70–76. ISSN: 0367326X. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.01.025. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X14000318>.
- [176] Jun Asano et al. «Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*». In: *Phytochemistry* 42.3 (giu. 1996), pp. 713–717. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/0031-9422(96)00024-6. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942296000246>.
- [177] Chunjie Liu et al. «Chemotaxonomic significance of sesquiterpenes and amide derivatives from *Chloranthus angustifolius* Oliv.» In: *Biochemical Systematics and Ecology* 58 (2015), pp. 30–33. ISSN: 03051978. DOI: 10.1016/j.bse.2014.10.011. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2014.10.011>.
- [178] John A. Beutler et al. «Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*». In: *Journal of Natural Products* 63.5 (2000), pp. 657–661. ISSN: 01633864. DOI: 10.1021/np990553r. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np990553r?journalCode=jnprdf>.



- [179] Nisakorn Saewan, John D. Sutherland e Kan Chantrapromma. «Antimalarial tetranortriterpenoids from the seeds of *Lansium domesticum* Corr.» In: *Phytochemistry* 67.20 (ott. 2006), pp. 2288–2293. ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.07.005. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206004092>.
- [180] Yi Zhang et al. «Antioxidative flavonol glycosides from the flowers of *Abelmoschus manihot*». In: *Journal of Natural Medicines* 67.1 (2013), pp. 78–85. ISSN: 13403443. DOI: 10.1007/s11418-012-0651-1.
- [181] Wilma A. Augustyn et al. «Metabolic profiling of mango cultivars to identify biomarkers for resistance against *Fusarium* infection». In: *Phytochemistry Letters* 10 (dic. 2014), pp. civ–cx. ISSN: 18767486. DOI: 10.1016/j.phyto1.2014.05.014. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390014000974>.
- [182] Fernando Pelaez et al. «The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms». In: *Systematic and Applied Microbiology* 23.3 (2000), pp. 333–343. ISSN: 07232020. DOI: 10.1016/S0723-2020(00)80062-4.
- [183] Gerald Bills et al. «Hyalodendrosides A and B, antifungal triterpenoid glycosides from a lignicolous hyphomycete, *Hyalodendron* species». In: *Journal of Natural Products* 63.1 (2000), pp. 90–94. ISSN: 01633864. DOI: 10.1021/np9903898.
- [184] Chang Zeng Wang e De Quan Yu. «Triterpenoid saponins from *Aster auriculatus*». In: *Planta Medica* 64.1 (1998), pp. 50–53. ISSN: 00320943. DOI: 10.1055/s-2006-957365.

## Estratto per riassunto della tesi di dottorato

L'estratto (max. 1000 battute) deve essere redatto sia in lingua italiana che in lingua inglese e nella lingua straniera eventualmente indicata dal Collegio dei docenti.

L'estratto va firmato e rilegato come ultimo foglio della tesi.

Studente: Giovanni Rizzato

matricola: 805776

Dottorato: Scienze Ambientali

Ciclo: 30°

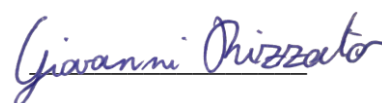
Titolo della tesi<sup>1</sup>: Valutazione della qualità e sicurezza in prodotti di interesse alimentare attraverso metodi di indagine metabolomica

Abstract:

Nell'elaborato vengono presentate le valutazioni della qualità e della sicurezza di tre diverse matrici di interesse alimentare e farmaceutico: radici di liquirizia, foglie di vite e fiori di elicriso. Per poter caratterizzare il profilo metabolico dei prodotti studiati è stato utilizzato un cromatografo liquido abbinato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (LTQ Orbitrap XL). I dati così ottenuti sono stati elaborati tramite specifici software dedicati alla metabolomica e sottoposti ad analisi multivariata per valutare le differenze tra specie diverse dello stesso genere. I risultati ottenuti hanno permesso di identificare e proporre diversi nuovi marker molecolari per differenziare prodotti anche molto simili tra loro, offrendo nuovi strumenti chimici per il controllo di sicurezza, qualità e tracciabilità.

In the current work we presented the qualitative analysis of three different matrices of pharmaceutical and alimentary usage: licorice roots, grapevine leaves and everlasting flowers. In order to characterize the metabolic profile of the studied products, a liquid chromatographer coupled with a high resolution mass spectrometer (LTQ Orbitrap XL) have been used. Data obtained from the analyses were processed with dedicated software. In order to better elucidate the differences among the samples of the same species, a multivariate analysis has been performed. By means of these techniques it was possible to highlight numerous molecular markers to differentiate similar products. Finally, the current study provided new chemical tools for the evaluation of safety, quality and traceability.

Firma dello studente



---

<sup>1</sup> Il titolo deve essere quello definitivo, uguale a quello che risulta stampato sulla copertina dell'elaborato consegnato.