



Università degli Studi di Sassari



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA
Scienze e Tecnologie Chimiche

Ciclo XXXIV

**ISOLAMENTO CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E
BIOLOGICA DI ESTRATTI OTTENUTI DA SPECIE VEGETALI
DELLA FAMIGLIA DELLE ROSACEAE**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

CHIM/10

Presentata da:

Antonella Ibba

Coordinatore Dottorato:

Prof.ssa Carla Cannas
Prof. Stefano Enzo

Tutor:

Prof.ssa Silvia Porcedda
Prof. Massimiliano Arca

Esame finale anno accademico 2021 – 2022

Dedicato alla mia famiglia
che non ha mai e non smetterà mai di credere in me

INDICE

RINGRAZIAMENTI	5
ABSTRACT (INGLESE)	6
ABSTRACT (ITALIANO)	8
1. INTRODUZIONE	10
1.1 Premessa e scopo del lavoro.....	10
1.2 La famiglia delle Rosaceae.....	11
1.2.1 La specie <i>Rosa canina</i> L.	12
1.2.2 La specie <i>Rubus ulmifolius</i> S.	14
1.3 Metodi di estrazione	15
1.3.1 Tecniche di estrazione.....	16
1.3.1.1 Idrodistillazione (HD).....	16
1.3.1.2 Macerazione	17
1.3.1.3 Apparato Soxhlet.....	17
1.3.1.4 Estrazione mediante CO ₂ in fase supercritica.....	17
1.4. Proprietà biologiche delle molecole caratterizzate	19
1.4.1 Polifenoli.....	19
1.4.2 Acidi grassi	23
1.4.3 Carboidrati	24
2. PARTE SPERIMENTALE	27
2.1 Il materiale vegetale	27
2.2 Metodiche estrattive e condizioni operative.....	27
2.3 Caratterizzazione chimica.....	31
2.3.1 Gas cromatografica accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC-MS).....	31
2.3.2 Caratterizzazione qualitativa con spettrometria di massa a bassa e alta risoluzione	33
2.3.3 Analisi Termo Gravimetrica (TGA) e Spettrometria di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).....	33
2.3.4 Caratterizzazione quali-quantitativa degli acidi grassi, esteri metilici e trigliceridi.....	33
2.3.5 Determinazione del contenuto totale di fenoli. Metodo di Folin-Ciocalteu (FC).....	35
2.3.6 Determinazione del contenuto totale di flavonoidi. Metodo del Nitrato di alluminio.....	35
2.4 Saggi biologici.....	35
2.4.1 Test antimicrobici	35
2.4.1.1 Metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer)	36
2.4.1.2 Metodi delle diluizioni. Determinazioni di MIC e MBC.....	37
2.4.1.3 Saggio antibiofilm. Determinazione della MBIC	37
2.4.2 Attività antiossidante.....	38
2.4.3 Attività inibitoria della xantina ossidasi (XO)	39
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	40
3.1 <i>Rosa canina</i>	40
3.1.1 Estratti di semi	40
3.1.1.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40].....	40
3.1.1.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in <i>n</i> -esano con apparato Soxhlet e per macerazione	43
3.1.2 Estratti di polpa	44
3.1.2.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40].....	44

3.1.2.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in <i>n</i> -esano con apparato Soxhlet, macerazione e HD.....	45
3.1.3 Tabelle e figure dei risultati relativi alla <i>R. canina</i>	49
3.2 <i>Rubus ulmifolius</i>	59
3.2.1 Estratti di foglie.....	59
3.2.1.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40].....	59
3.2.1.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in <i>n</i> -esano con apparato Soxhlet, macerazione e HD.....	59
3.2.1.3 Analisi mediante spettrometria di massa a bassa e alta risoluzione.....	61
3.2.2 Estratti dei frutti	62
3.2.2.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40].....	62
3.2.2.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in <i>n</i> -esano con apparato Soxhlet e macerazione	62
3.2.2.3 Analisi mediante spettrometria di massa a bassa e alta risoluzione.....	63
3.2.3 Tabelle e figure dei risultati relativi al <i>R. ulmifolius</i>	65
CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	74

RINGRAZIAMENTI

In primo luogo vorrei ringraziare il mio supervisore la Prof.ssa Silvia Porcedda per avermi dato la possibilità di poter fare questo percorso eccezionale di formazione per il raggiungimento del titolo di dottore di ricerca il quale è stato sempre il mio sogno. Un ringraziamento anche al supervisore Prof.

Massimiliano Arca per il suo supporto durante questi tre anni.

Un ringraziamento speciale alla Dott.ssa Alessandra Piras che con i suoi preziosi insegnamenti e con tanta pazienza è sempre riuscita a darmi il giusto supporto nelle attività sperimentali svolte nel campo estrattivo.

Vorrei, inoltre estendere la mia sincera gratitudine a tutti i collaboratori che mi hanno permesso di poter applicare le varie indagini chimiche e biologiche sulle mie ormai tanto amate piante del mio progetto, le Rosaceae. Pertanto, ringrazio:

Prof. Germano Orrù del Dipartimento di Scienze Chirurgiche di UniCa

Prof. Andrea Maxia del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente di UniCa

Dott.ssa Antonella Rosa del Dipartimento di Scienze Biomediche di UniCa

Prof.ssa Antonella Fais e la Dott.ssa Benedetta Era, del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente di UniCa

Prof. Enzo Cadoni e la Prof.ssa Tiziana Pivetta del Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche di UniCa

Infine un ringraziamento speciale a tutti i dottorandi fantastici del mio corso di dottorato con i quali ho condiviso dei momenti divertenti e di supporto dei quali avrò un bel ricordo di tutti, in particolare a: Giada Mannias, Davide Tocco, Mirko Vacca, Fausto Secci, Monica Mura, Mariangela Oggianu, Noemi Monni, Rosita Cappai e Sebastiano Masuri

ABSTRACT (INGLESE)

According to a recent report issued by the WHO (World Health Organization), the increase in antibiotic resistance of pathogenic microorganisms represents a major public health problem that can affect all people of all ages and countries. The study of the antimicrobial activity of natural extracts could contribute to the adoption of new strategies to support antimicrobial therapies and to the identification of bioactive compounds (or classes of compounds) useful for the design of antibiotic drugs or the preparation of medical-surgical aids, such as toothpastes, mouthwashes and disinfectants.

Therefore, the aim of this research project was to obtain and chemically characterize natural extracts obtained from spp. of plants belonging to the Rosaceae family, having antimicrobial properties against human pathogens, including antibiotic resistant ones. In particular, the study focused on the *Rubus ulmifolius* and *Rosa canina* species. The decision to carry out an antimicrobial investigation on *R. ulmifolius* extracts finds its motivation in the fact that, despite the literature reports their interesting antimicrobial properties and the presence of various bioactive molecules, these are currently still poorly studied and this makes them a source of new resources as yet unknown. The attention to the *R. canina* species originates from its many antimicrobial potentials, already known, which make it a plant that is still the subject of continuous studies on its biological properties by the scientific community. The application of different extraction techniques made it possible to obtain different types of extracts by means of CO₂ in the supercritical phase at 90 bar and 40 °C, SFE [90:40], a volatile liquid fraction was obtained; while extractions carried out at 300 bar and 40 °C, SFE [300:40], gave rise to solid or liquid non-volatile fractions consisting of dyes, triglycerides, free fatty acids and others. Other more traditional techniques have also been applied: hydrodistillation with the Clevenger apparatus; extraction with *n*-hexane by Soxhlet apparatus; maceration with methanol, ethanol and water. The chemical characterization of the extracts was carried out by means of: chromatographic techniques such as gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) or using a flame ionization detector (GC-FID) and high performance liquid chromatography with diode array detector / detector evaporative light dispersion (HPLC-DAD / ELSD) for the qualitative and quantitative determination of the main lipid classes (triacylglycerols) and fatty acids; by means of TGA, thermogravimetric analysis, and Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, NMR, the water content was estimated and the ¹H spectra of the aqueous samples, respectively, were analyzed; spectrophotometric assays with the method using the Folin-Ciocalteu reagent and the aluminum nitrate, adopted

respectively for the evaluation of the total content of phenolic substances and flavonoids. For the extracts obtained from the leaves and fruits of *R. ulmifolius*, the low-resolution mass spectrometry, Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS) was used. On the same samples, the exact molecular mass was experimentally determined using the high-resolution mass spectrometer OrbitrapElite, which allowed the qualitative analysis of different classes of biological compounds: phenols, lipids and carbohydrates. The chromatographic results show that the SFE extracts [300:40] obtained from seeds and pulp of *R. canina* and from fruits of *R. ulmifolius* revealed important nutritional properties due to their high content of essential fatty acids. The extracts obtained by extraction with *n*-hexane showed chemical profiles similar to those obtained by SFE [90:40], but with the disadvantage of presenting undesirable traces of solvent. This multidisciplinary project also contemplated the application of different biological assays such as: the *in vitro* antibiogram – the evaluation process was performed using validated technologies for antibiotics and described in the general protocols at NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) – to evaluate the antimicrobial activity, the spectrophotometric evaluation of the antioxidant activity of phenols and the biological activity of the extracts as inhibitors of xanthine oxidase.

Among the main results obtained is an extract obtained by SFE from seeds of *R. canina* which showed a very high antimicrobial activity against numerous human pathogens (fungi, Gram positive bacteria of the genus *Streptococcus* and *Staphylococcus* and Gram negative such as *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) for which on 22 December 2020 the inventors Alessandra Piras, Antonella Ibba, Germano Orrù and Silvia Porcedda filed an international patent application, pending concession, and transferred the title to UniCa. The extracts obtained by SFE [300:40], using *n*-hexane in a Soxhlet apparatus and by maceration from the leaves of *R. ulmifolius* showed an important antimicrobial activity towards the main pathogens of the oral cavity responsible for the formation of caries or associated to different forms of periodontitis (*Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*). All the formulations obtained from *R. ulmifolius* showed a good reduction of the biofilm at concentrations of the extract between 0.05% and 0.025% and a complete inhibition of the biofilm for concentrations between 0.78% and 1.56%.

ABSTRACT (ITALIANO)

Secondo un recente report emesso dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) l'aumento della resistenza agli antibiotici dei microrganismi patogeni rappresenta un grande problema di sanità pubblica in grado di coinvolgere tutte le persone di ogni età e paese. Lo studio dell'attività antimicrobica di estratti naturali potrebbe contribuire all'adozione di nuove strategie a supporto delle terapie antimicrobiche e all'identificazione di composti (o classi di composti) bioattivi utili per la progettazione di farmaci antibiotici o la preparazione di presidi medico-chirurgici quali dentifrici, collutori e disinfettanti.

Pertanto, scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di ottenere e caratterizzare chimicamente estratti naturali ottenuti da *spp.* di piante appartenenti alla famiglia delle Rosaceae, aventi proprietà antimicrobiche verso i patogeni umani, compresi quelli antibiotico resistenti. In particolare, lo studio si è focalizzato sulle specie *Rubus ulmifolius* e *Rosa canina*. La scelta di svolgere un'indagine antimicrobica sugli estratti di *R. ulmifolius* trova la sua motivazione nel fatto che, nonostante la letteratura riporti le loro interessanti proprietà antimicrobiche e presenza di svariate molecole bioattive, attualmente questi sono ancora poco studiati e questo li rende una fonte di nuove risorse ancora sconosciute. L'attenzione verso la specie *R. canina* prende origine dalle sue numerose potenzialità antimicrobiche, già note, che la rendono per questo una pianta ancora oggetto di continui approfondimenti sulle sue proprietà biologiche, da parte della comunità scientifica. L'applicazione di diverse tecniche estrattive ha consentito di ottenere differenti tipologie di estratti: mediante CO₂ in fase supercritica a 90 bar e 40 °C, SFE[90:40], si è ottenuta una frazione liquida volatile; mentre estrazioni condotte a 300 bar e 40 °C, SFE[300:40], hanno originato frazioni non volatili solide o liquide costituite da coloranti, trigliceridi, acidi grassi liberi ed altri. Sono state applicate anche altre tecniche più tradizionali: idrodistillazione con apparato Clevenger; estrazione con *n*-esano mediante apparato Soxhlet; macerazione con metanolo, etanolo ed acqua. La caratterizzazione chimica degli estratti è avvenuta per mezzo di: tecniche cromatografiche quali gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) o con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID) e cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore a serie di diodi/rivelatore a dispersione di luce evaporativa (HPLC-DAD/ELSD) per la determinazione quali-quantitativa delle principali classi lipidiche (triacilgliceroli) e acidi grassi; mediante TGA analisi termogravimetrica e Spettrometria di Risonanza Magnetica Nucleare, NMR, si è stimato il tenore d'acqua e analizzato gli spettri ¹H dei campioni di natura acquosa, rispettivamente; saggi spettrofotometrici con il metodo

che utilizza il reattivo di Folin-Ciocalteu e il nitrato di alluminio, adottati rispettivamente per la valutazione del contenuto totale di sostanze fenoliche e di flavonoidi. Per gli estratti ottenuti dalle foglie e frutti del *R. ulmifolius* si è ricorso all'utilizzo della spettrometria di massa a bassa risoluzione, mediante Electrospray Ionization-Mass Spectrometry ESI-MS). Sugli stessi campioni la massa molecolare esatta è stata determinata sperimentalmente mediante lo spettrometro di Massa ad alta risoluzione OrbitrapElite, che ha permesso l'analisi qualitativa di diverse classi di composti biologici: fenoli, lipidi e carboidrati. I risultati cromatografici evidenziano che gli estratti SFE[300:40] ottenuti dai semi e polpa della *R. canina* e dai frutti del *R. ulmifolius* rivelano importanti proprietà nutritive dovute al loro alto contenuto di acidi grassi essenziali. Gli estratti ottenuti per estrazione con *n*-esano hanno mostrato profili chimici simili a quelli ottenuti mediante SFE[90:40], ma con lo svantaggio di presentare tracce indesiderate di solvente. Il presente progetto multidisciplinare ha contemplato anche l'applicazione di diversi saggi biologici quali: l'antibiogramma *in vitro* – il processo valutativo è stato eseguito utilizzando tecnologie validate per gli antibiotici e descritte nei protocolli generali presso NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) – per valutare l'attività antimicrobica; la valutazione spettrofotometrica dell'attività antiossidante dei fenoli e attività biologica degli estratti come inibitori della xantina ossidasi. Tra i principali risultati ottenuti si segnala un estratto ottenuto mediante SFE dai semi di *R. canina* che ha mostrato un'attività antimicrobica molto elevata nei confronti di numerosi patogeni umani (funghi, batteri Gram positivi del genere *Streptococcus* e *Staphylococcus* e Gram negativi quali *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli*) per il quale il 22 dicembre 2020 gli inventori Alessandra Piras, Antonella Ibba, Germano Orrù e Silvia Porcedda hanno depositato domanda di brevetto internazionale, in attesa di concessione, cedendo la titolarità a UniCa. Gli estratti ottenuti mediante SFE[300:40], utilizzando *n*-esano in un apparato Soxhlet e per macerazione dalle foglie di *R. ulmifolius* hanno mostrato un'importante attività antimicrobica verso i principali patogeni del cavo orale responsabili della formazione della carie o associati a forme di parodontiti (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus intermedius*). Tutti i formulati ottenuti dal *R. ulmifolius* hanno mostrato una buona riduzione del biofilm a concentrazioni dell'estratto comprese tra 0.05 % e 0.025 % e una completa inibizione del biofilm per concentrazioni comprese tra 0.78 % e 1.56 %.

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa e scopo del lavoro

Oggi una delle principali minacce per la salute della popolazione mondiale, secondo l'OMS è rappresentata dall'antimicrobico resistenza. Quest'ultima si verifica quando batteri, virus, funghi o parassiti a causa di una serie di mutazioni adattative non rispondono più ai farmaci. Pertanto, le infezioni diventando più difficili da trattare, i farmaci diventano inefficaci ed aumenta la probabilità di diffusione di malattie gravi e talvolta mortali. La continua evoluzione della resistenza microbica agli attuali farmaci antimicrobici ha reso necessaria la ricerca di nuovi composti efficaci. A riguardo, l'OMS nel 2017 ha emesso un report in cui segnala la presenza, in ambito sanitario, di super-batteri divenuti refrattari ai trattamenti correnti, tra i quali: *Pseudomonas aeruginosa* e diverse specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Nonostante le piante siano ricche di metaboliti secondari ad attività antimicrobica come alcuni appartenenti alle classi dei tannini, terpenoidi, alcaloidi e flavonoidi (Sateriale et al. 2020; Othman et al. 2019; Gutiérrez-del-Río et al. 2018), solo pochi prodotti farmaceutici di origine vegetale sono entrati in commercio come disinfettanti contro le infezioni o come farmaci ad uso umano. Il rapido diffondersi di ceppi patogeni pericolosi ha determinato negli ultimi anni un aumento dell'interesse sullo studio di prodotti naturali come fonte di nuovi antimicrobici, in particolare di antibiotici.

Fin dai tempi antichi, molte preparazioni medicinali sono state ottenute da sostanze naturali e adottate come rimedi contro numerose patologie. La prima testimonianza scritta dell'utilizzo delle piante per le loro proprietà curative è riportata nell'Erbario di Shen Nung, proveniente dalla Cina e datato 2700 a.C., relativo all'uso e alle proprietà di medicamenti e veleni. Anche in India l'uso delle piante è antichissimo. Infatti, sembrerebbe che circa diecimila anni fa fosse già diffuso l'uso di piante ed erbe in medicina. Ayurveda rappresenta il termine tradizionale per indicare la medicina indiana è deriva dal sanscrito ayur (vita) e veda (conoscenza). Essa risale dai Veda i quattro libri indiani della saggezza risalenti a 3000 ÷ 4500 anni fa, i quali illustrano formule per medicamenti di numerose erbe, tra cui la cannella (*Cinnamomum sp*) e zenzero (*Zingiber officinale*). Le tavolette sumeriche di Nippur del 3000 a.C. che riportano i nomi di droghe vegetali ed un antico papiro egiziano del 1600 a.C. riportano 876 formule erboristiche, di cui quasi un terzo a base di specie che ancora compaiono nelle farmacopee occidentali. Ancora oggi l'uso delle piante come medicinali rappresenta un importante settore

di ricerca nell'ambito dell'industria farmaceutica, cosmetica, nutraceutica e alimentare. Il grande interesse verso queste sostanze è legato sia alla possibilità di assumerle tramite la dieta, sia alla minore comparsa di effetti collaterali dovuta ad una più bassa tossicità verso le cellule sane. Considerando solo il mondo vegetale, attualmente oltre 35000 specie vegetali sono impiegate in tutti paesi per scopi medicinali (Mondello et al. 2020). E' stato stimato dall'OMS che i farmaci a base di erbe permettono supporto sanitario per 3.5 – 4 miliardi di persone in tutto il globo e che circa l'85 % della medicina tradizionale utilizza gli estratti ottenuti dalle piante (Mondello et al. 2020). Oggetto di indagine della presente ricerca è rappresentato dallo studio di estratti con proprietà antimicrobiche ottenuti da *spp.* di piante appartenenti alla famiglia delle Rosaceae.

Nonostante la letteratura corrente riporti diversi lavori in cui sono descritte le varie proprietà biologiche degli estratti come antimicrobica, antiossidante, antitumorale (Bailly et al. 2020; Couto et al. 2020; Panizzi et al. 2002), per molte specie lo studio sull'attività antimicrobica è ancora carente e spesso assente. Pertanto, con il presente studio si sono voluti intraprendere principalmente degli studi sulla composizione chimica e antimicrobica degli estratti isolati dalle specie *Rubus ulmifolius* e *Rosa canina*.

1.2 La famiglia delle Rosaceae

Le Rosaceae sono una famiglia di Angiosperme e Dicotiledoni, pressoché cosmopolita, comprende circa 100 generi e 3000 specie per lo più presenti nell'emisfero boreale come alberi, erbe o arbusti spesso spinosi. La grande varietà morfologica delle diverse *spp* – presenti in diversi tipi di habitat che vanno dalle foreste temperate, alla tundra artica, alle paludi, ai campi abbandonati – comprende foglie alterne, semplici o composte, in genere con stipole sviluppate e fiori regolari, bisessuali, attinomorfi, spesso pentameri, con sepali e petali liberi. Le Rosaceae sono suddivise in 4 sottofamiglie: le *Maloideae* (o *Pomoideae*) sono prevalentemente alberi con pomo (falso frutto) come il *Crateagus* e il *Pyrus*; le *Prunoideae* (o *Amygdaloideae*) il cui frutto è una drupa e di cui fanno parte le specie del genere *Prunus*; le *Rosoideae* sono arbusti o erbe che normalmente sviluppano falsi frutti come i cinorrodi di *Rosa canina*; le *Spiraeoideae* sono piante erbe o arbusti ornamentali con frutti a capsule il cui genere principale è la *Spiraea*. Le specie di questa famiglia oltre ad essere note e coltivate per i loro frutti (ad esempio nespole, prugne, fragole), per il legname di qualità (ad esempio il legno di ciliegio) o per il loro valore ornamentale (come le rose), sono utilizzate anche in campo farmaceutico in quanto costituite da composti biologici attivi. Fin dai tempi

antichi molte specie venivano utilizzate per la cura di diverse malattie attraverso la preparazione di infusi e decotti. Infatti, nei frutti, foglie e fiori in genere sono presenti dei principi farmacologici interessanti che hanno attirato ad oggi l'attenzione della comunità scientifica per lo sviluppo di farmaci antimicrobici.

1.2.1 La specie *Rosa canina* L.



La *Rosa canina* L., nota comunemente come rosa di macchia o rosa selvatica, rappresenta una delle innumerevoli specie di rose spontanee comuni nelle campagne italiane ed in tutta Europa, Europa, Asia occidentale ed Africa del Nord.

È un fitto arbusto, latifoglie e caducifoglie, spinoso e alto circa (1.5 ÷ 2.5) m con fusti legnosi, glabri, e sistema radicale costituito da lunghe radici ramificate (Selahvarzian et al. 2018). È dotata di spine rosse, robuste, arcuate e foglie caduche composte da (5 ÷ 7) foglioline, ovali o ellittiche, con (17 ÷ 22) denti sul margine. I fiori, poco profumati, sono costituiti da 5 petali di colore rosa pallido e possono crescere isolati o riuniti in corimbi di piccoli gruppi. Il falso frutto (cinorrodo) di *R. canina* è caratterizzato da un colore rosso e da una consistenza carnosa contenente gli acheni, i veri frutti della pianta provvisti di peluria sericea. Il termine “*canina*” – dal latino “*caninus*” che significa canino – deriverebbe dall’antica credenza che la radice venisse utilizzata per curare la rabbia nei cani e negli esseri umani (Canuti et al.). Fonte di ispirazione di molte leggende (si narra ad esempio che la corona di spine di Gesù fosse fatta con i rami di *R. canina*) è una pianta antichissima risalente secondo alcuni reperti fossili a circa 60 milioni di anni fa. È considerata da secoli la pianta che cura tutti i mali, infatti secondo gli usi tradizionali della Germania, veniva mangiata per preservarsi dalle infezioni, durante la notte di fine anno. Da sempre foglie, cinorrodi, fiori e radici sono stati utilizzati dalla medicina

popolare per le loro svariate proprietà benefiche e curative come quelle antiinfiammatorie, contro i calcoli renali, astringenti, toniche, rinfrescanti e leggermente lassative. La *R. canina* è utilizzata anche in campo alimentare e cosmetico. In cucina è impiegata per la preparazione di confetture, zuppe, gelatine, tisane, grappe aromatiche e per la formulazione di integratori alimentari, mentre in campo cosmetico è utilizzata per la preparazione dell'olio dai semi – ricco di proprietà nutrienti, antiossidanti e cicatrizzanti – creme anti-rughe e saponi. I cinorrodi rappresentano la principale fonte da cui hanno origine la maggior parte dei prodotti derivati – cosmetici e alimentari – in virtù del fatto che sono ricchi di composti biologici benefici per la nostra salute. Infatti, la letteratura corrente riporta tra i suoi costituenti numerosi nutrienti e fitochimici come le vitamine C, B3 e D insieme a flavonoidi, carotenoidi, beta-sitosterolo, fruttosio, acido malico, galattolipidi, tannini, magnesio, zinco e rame contenuti nelle bacche (Cohen et al. 2012). I cinorrodi rappresentano una fonte preziosa di vitamina C che rendono la *R. canina* una pianta medicinale ottima nel trattamento di gengiviti e gengive gonfie o sanguinanti (Selahvarzian et al. 2018). Inoltre, in essi sono stati identificati sei carotenoidi: il licopene, β -carotene, luteina, zeaxantina, rubixantina ed epimeri di neocromo (Horváth et al. 2012). L'attività antiinfiammatoria, antiossidante e antiobesogenica (Fan et al. 2014) viene genericamente attribuita ad un elevato tenore di composti bioattivi. L'attività antitumorale e antimicrobica di estratti di *R. canina* (Rovonà et al. 2020 Selahvarzian et al. 2018), potrebbero essere correlate alla presenza di molecole antiossidanti come la vitamina C, tannini e flavonoidi (Gorniak et al. 2019; Mousavi et al. 2019; Mailoa et al. 2014).

1.2.2 La specie *Rubus ulmifolius* S.



Il *Rubus ulmifolius* S. chiamato comunemente rovo – noto anche come mora selvatica o mora a foglia di olmo – è un arbusto sempreverde originario dell'Europa e del Nord America distribuito ampiamente in molte aree del mondo sia in suoli selvatici che coltivati. Questa pianta in Italia vegeta, dal livello del mare fino a 1100 m d'altitudine, distribuendosi in svariati ambienti in cui vi sia terreno da invadere come nelle aree abbandonate, nel folto bosco o coltivi dismessi. Avendo la capacità di diffondersi velocemente sviluppando resistenza all'eradicazione è considerata come infestante. Né il taglio né l'incendio risultano efficaci e spesso anche con gli erbicidi si ottengono scarsi risultati. Per queste caratteristiche viene utilizzata da tempo per delimitare proprietà e poderi con funzione difensiva. Le siepi a rovo sono utili anche nella fornitura di nettare per la produzione del miele, nell'associazione di specie antagoniste di parassiti delle colture e nella formazione di corridoi ecologici per specie animali. I fusti aerei del rovo sono lunghi circa 6 m e provvisti di spine arcuate. Le foglie imparipennate sono costituite da 3 a 5 foglioline a margine seghettato e la nervatura principale è caratterizzata dalla presenza di spine. A seconda dell'altitudine e delle condizioni climatiche i fiori bianchi o rosa dotati di cinque petali e sepali, fioriscono tra maggio e giugno. La fioritura è seguita dalla maturazione e sviluppo del frutto commestibile, chiamato mora, caratterizzato da numerose drupe carnose, verdi al principio che diventano rosse a metà fase di crescita e nere a completo sviluppo. Il nome *R. ulmifolius* è composto dal termine *Rubus* che proviene dal latino *ruber*, rosso, che potrebbe far riferimento al colore dei frutti maturi di altre specie dello stesso genere o alla forma immatura del frutto stesso. Il termine specifico *ulmifolius* scaturisce sempre dal latino (*ulmus*, olmo e *folia*, foglia) e questo deriva dalla similitudine con le foglie dell'albero. Questa pianta veniva utilizzata dalla medicina popolare tradizionale per le sue delicate e svariate proprietà benefiche. I giovani germogli schiacciati

rappresentano un ottimo rimedio se applicati su ferite, punture di insetti infetti e brufoli. Insieme alle foglie sono conosciuti per le loro proprietà antinfiammatorie, antidolorifiche e spasmolitiche gastrointestinali (Akkari et al. 2016). In letteratura, gli estratti di foglie sono noti anche per le proprietà antimicrobiche, antivirali, antiossidanti e antiproliferative contro le cellule tumorali (Martini et al. 2009). I frutti del *R. ulmifolius* vengono utilizzati nella preparazione di confetture, sciroppi, succhi, gelatine, e vari prodotti di pasticceria, mentre in campo cosmetico si prestano per la produzione di prodotti per il corpo (come creme, bagnoschiuma e profumi) e per l'ambiente.

Essi hanno mostrato proprietà antiossidante, antitumorale, antiinfiammatoria, anti-neurodegenerative e antimicrobiche (da Silva et al. 2019; Akkari et al. 2016). L'attività biologica del *R. ulmifolius* è legata alla presenza di diversi composti come la vitamina C, i minerali K, Ca, Mg e Zn di cui sono ricchi i frutti e fenoli e flavonoidi contenuti anche in altre parti della pianta (foglie, fiori e germogli) (Schulz et al. 2019; Ali et al. 2017; Rodríguez et al. 2014).

1.3 Metodi di estrazione

Fin dai tempi antichi l'utilizzo delle piante per gli scopi medicinali avveniva sulla base di esperienze empiriche maturate impiegando la pianta stessa, fresca o essiccata (droga), oppure destinata a procedimenti semplici di estrazione, quali gli infusi e i decotti con acqua o i macerati con alcool o liquidi alcoolici (tinture). Il metodo di estrazione svolge un ruolo importante nella separazione e caratterizzazione delle diverse sostanze fitochimiche presenti nelle piante medicinali. Molti fattori come la specie botanica, le diverse parti che si intendono usare (es. radici, corteccia, foglie, frutti) ed il particolare utilizzo dell'estratto influenzano la scelta della tecnica di estrazione. Dalla stessa matrice vegetale, sottoposta a differenti processi di estrazione, si ottengono estratti che possono differire per aspetto, composizione chimica ed attività biologica (Marongiu et al. 2012). La spremitura a freddo, l'estrazione con solventi e la distillazione rappresentano le tecniche di estrazione tradizionalmente impiegate. Queste tecniche, nonostante siano ampiamente utilizzate spesso comportano degli svantaggi come la degradazione chimica dei componenti ad opera del calore (distillazione ed estrazione con solventi a caldo) la solubilizzazione in acqua o l'idrolisi di alcuni componenti (idrodistillazione e macerazione acquosa), o la presenza di residui di solvente nell'estratto come nel caso dell'estrazione con solventi organici. Al fine di ridurre gli inconvenienti delle tecniche tradizionali e di ottimizzare gli aspetti relativi ai costi energetici e all'impatto

ambientale, sono state sviluppate moderne tecniche estrattive – applicabili sia su scala di laboratorio che industriale – suddivisibili in tre categorie: distillazioni modificate, estrazioni con solvente modificate, estrazioni ad alta pressione. In considerazione del fatto che le matrici oggetto di questo progetto di ricerca erano prive di essenze, la scelta per le tecniche tradizionali si è focalizzata principalmente sull'utilizzo di solventi organici mediante l'utilizzo dell'apparato Soxhlet e processi di macerazione. Mentre per le tecniche moderne a basso impatto ambientale è stata adottata l'estrazione con CO₂ supercritico che grazie alla possibilità di modulare il potere solvente, consente di ottenere estratti con differente composizione chimica. Le tecniche di spazio di testa, importanti limitatamente al campo analitico, non sono state prese in considerazione.

1.3.1 Tecniche di estrazione

1.3.1.1 Idrodistillazione (HD)

L'idrodistillazione o distillazione in acqua (e sue varianti quali distillazione in corrente di vapore) rappresenta uno dei processi più utilizzati per la produzione di oli essenziali i cui componenti hanno con temperature di ebollizione comprese tra (150 e 250) °C. La procedura comporta l'immersione della matrice vegetale di partenza (intatta o sminuzzata) in un pallone di vetro contenente acqua che viene portato ad una temperatura di circa 100 °C. L'acqua in questo processo svolge tre funzioni importanti: l'acqua calda ammorbidisce il materiale penetrando al suo interno e favorendo la fuoriuscita dei componenti di interesse; il vapore d'acqua ricondensando sulla superficie del materiale fornisce il calore di vaporizzazione ai componenti volatili e grazie alla sua pressione di vapore contribuisce alla pressione totale. La condensazione dei vapori è seguita da successiva separazione della miscela di acqua e olio, tra loro praticamente insolubili, che si stratificano in funzione della loro densità nella sezione di raccolta. Usualmente l'olio essenziale è meno denso dell'acqua e si accumula sulla superficie libera mentre l'acqua può fare ritorno nel pallone attraverso un sifone. Per mezzo di un rubinetto, a fine esperimento, l'acqua aromatica può essere allontanata e l'olio recuperato.

1.3.1.2 Macerazione

La macerazione è un'operazione di solubilizzazione che consiste nel trattare con acqua o con altri solventi a temperatura ambiente alcune matrici al fine di estrarre i suoi componenti. Il processo di macerazione rappresenta il metodo più semplice per ottenere un estratto chiamato macerato. Di solito viene eseguita a temperatura ambiente, miscelando la matrice tal quale, sminuzzata o polverizzata con il solvente e lasciandola per un determinato periodo di tempo al buio con o senza agitazione. Successivamente, si procede alla filtrazione dell'estratto. Dopo filtrazione, per i macerati ottenuti mediante solventi organici, si procede con l'eliminazione del solvente utilizzando un evaporatore rotante a pressione ridotta.

1.3.1.3 Apparato Soxhlet

L'estrazione mediante solventi organici può essere realizzata mediante l'impiego dell'apparato Soxhlet. È composto da tre parti principali: un pallone, un corpo centrale, il "soxhlet" propriamente detto (in cui viene inserito il cartocchetto contenente la matrice vegetale) e un refrigerante che ha lo scopo di condensare i vapori del solvente che si generano nel pallone e di farli ricadere nell'estrattore. L'estrazione avviene per percolazione del solvente nella matrice vegetale; quando il solvente saturo d'estratto raggiunge un determinato livello, per sifonamento ricade nel pallone. Pertanto, l'estrazione diventa continua, automatica ed autosufficiente. La matrice vegetale nella camera di estrazione viene sottoposta a diversi passaggi di solvente puro. Di conseguenza, il processo diviene molto più efficiente di una macerazione statica in un solvente in cui la concentrazione dei composti estratti aumenta costantemente, raggiungendo uno stato di equilibrio che pone fine al processo di migrazione dei composti verso la superficie della matrice e alla loro solubilizzazione. A fine estrazione si procede con l'eliminazione del solvente utilizzando un evaporatore rotante a pressione ridotta.

1.3.1.4 Estrazione mediante CO₂ in fase supercritica

L'estrazione mediante diossido di carbonio in fase supercritica (SFE) rappresenta un'alternativa ai processi di estrazione tradizionali che spesso richiedono condizioni di esercizio incompatibili con la stabilità termica delle sostanze da estrarre, oppure comportano la ritenzione di tracce indesiderate di solvente. I fluidi supercritici (FS) sono sostanze in condizioni di pressione e temperatura superiori ai valori critici. Un FS presenta un'elevata densità come un liquido, ed è dotato di alta diffusività e una bassa viscosità e tensione superficiale (Gupta et al. 2012). Il principio su cui si fonda la SFE è la diretta correlazione tra

potere solvente e densità del FS, rilevato sperimentalmente. In prossimità del punto critico, un aeriforme presenta un forte aumento di densità per piccoli incrementi di pressione e una elevata compressibilità. Di conseguenza, diviene FS e al tempo stesso un ottimo solvente per i soluti compatibili per polarità molecolare. Se dopo il passaggio attraverso la matrice il FS viene riportato a pressioni inferiori alla sua P_c (pressione critica) perde il suo potere solubilizzante e le sostanze estratte si separano nello stato fisico stabile (liquido o solido) alle nuove condizioni di temperatura e pressione. In funzione delle condizioni operative impiegate (come pressione, temperatura, e tempo di contatto), il processo estrattivo risulta più o meno selettivo per una determinata sostanza rispetto a tutte le altre co-estratte dal FS. A differenza dei solventi liquidi tradizionali, il FS possiede una elevata capacità di diffondere profondamente nei pori della matrice permettendo una più efficiente estrazione delle sostanze dalle cellule vegetali. La scelta nell'utilizzo del CO_2 in questo lavoro di ricerca non è causale dal momento che presenta diversi vantaggi: condizioni critiche facili da raggiungere ($31.1\text{ }^\circ\text{C}$ e 73.8 bar), inerte chimicamente, atossico, non infiammabile, non esplosivo, non corrosivo, facilmente reperibile ed economico. L'estrazione con un FS implica due stadi principali: l'estrazione propriamente detta dove si cerca la massima solubilità del soluto, e la separazione dove al contrario questa solubilità deve essere molto piccola in modo da recuperare totalmente l'estratto. Variando la polarità del solvente supercritico è possibile modificare la selettività dell'estrazione. Nel caso del diossido di carbonio, è possibile accrescere la polarità complessiva della fase supercritica dissolvendo in essa alcoli a basso peso molecolare o acqua. I soluti disciolti nella fase supercritica sono dei composti sub-critici chiamati cosolventi. Il trasporto di materia avviene in diversi stadi nel corso del processo estrattivo. Nella prima fase la matrice solida fissa (letto) è attraversata da una fase fluida in movimento (solvente) che trasferisce uno o più composti dalla matrice solida al solvente. Nella seconda fase il solvente deve attraversare sia il film fluido che si forma intorno alle particelle di solido, sia la matrice solida sino al sito in cui si trova il composto da estrarre e solubilizzare. La soluzione ottenuta deve poi riattraversare la matrice solida ed il film esterno per raggiungere la fase fluida in movimento verso l'uscita dell'estrattore. La forza motrice del processo è proporzionale alla differenza di concentrazione del soluto nelle due fasi che a sua volta dipende dalla diffusività e dal coefficiente di trasporto di materia. Nel caso di matrici solide è necessario, anche, valutare le resistenze al trasporto di materia all'interno della fase solida.

1.4. Proprietà biologiche delle molecole caratterizzate

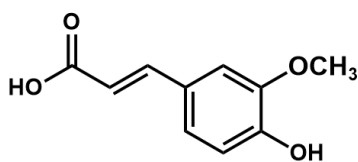
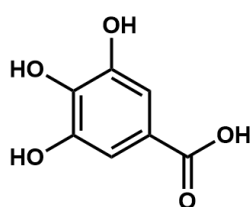
Tutti gli organismi del Regno Vegetale, nonostante siano diversi per forma, organizzazione ed adattabilità all'ambiente, per i loro processi biochimici impiegano un limitato numero di sostanze appartenenti, principalmente, alle classi dei carboidrati, lipidi e proteine. Il metabolismo primario si realizza attraverso quelle vie metaboliche che permettono la biosintesi e la degradazione di questi composti. Invece il metabolismo secondario si esplica attraverso tutte quelle vie che necessitano dell'utilizzo di prodotti intermedi del metabolismo primario per sviluppare una grande varietà di composti organici che si accumulano nelle cellule vegetali. È noto che il metabolismo secondario è influenzato da fattori sia ecologici che genetici e può variare da specie a specie vegetale dando luogo ai metaboliti secondari (fenoli, terpeni, alcaloidi) principalmente durante il periodo di accrescimento del vegetale, cioè quando le trasformazioni metaboliche raggiungono la massima attività (Carpasso et al. 2006). Mentre i metaboliti primari esplicano funzioni indispensabili per l'organismo, quali la nutrizione e i processi metabolici di base, i metaboliti secondari sono, invece, implicati in meccanismi di natura ecologica, in quanto sono usati o come meccanismi di difesa contro predatori, per la competizione interspecifica o per facilitare i processi riproduttivi. Tra i metaboliti primari, intermedi e secondari dei vegetali, si possono trovare dei principi attivi. In particolare, i costituenti chimici delle piante responsabili dell'attività biologica più interessanti da un punto di vista farmacologico appartengono ai metaboliti secondari. In questo lavoro di ricerca sia metaboliti primari (carboidrati e acidi grassi) che secondari (polifenoli e flavonoidi) presenti nei diversi estratti isolati, sono stati oggetto di indagine chimica.

1.4.1 Polifenoli

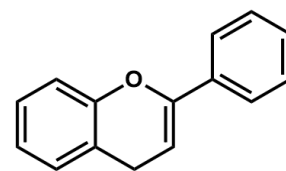
I polifenoli rappresentano una vasta ed eterogena classe di sostanze organiche derivati dal metabolismo secondario delle piante. Questa famiglia comprende circa 5000 molecole fitochimiche caratterizzate dalla presenza di uno o più gruppi idrossilici, associati all'anello aromatico, che può essere presente o nella forma ossidata (chinone) o nella forma ridotta (fenolo). La grande variabilità strutturale dei polifenoli ne determina le loro peculiari proprietà fisiche, chimiche e biologiche. La loro struttura consente a tali composti di funzionare da *scavenger* per stabilizzare i radicali liberi, agenti riducenti, chelanti di metalli pro-ossidanti e *quencher* della formazione di ossigeno singoletto (Carratù, et al. 2005). La biosintesi dei polifenoli segue due vie: la via dell'acido malonico e quella dell'acido shikimico.

Quest'ultima rappresenta la via principale che permette di ottenere fenilpropanoidi, come gli acidi idrossicinnamici, convertendo precursori derivati dalla glicolisi in vari aminoacidi aromatici tra i quali la fenilalanina. In base alle caratteristiche strutturali i polifenoli possono essere suddivisi in tre diverse classi (**Figura 1**):

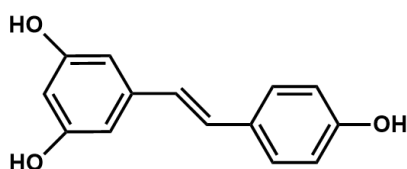
- 1) **acidi fenolici o fenolcarbossilici** che includono gli acidi benzoici (ad es. acido gallico) e gli acidi idrossicinnamici (come l'acido caffeico e ferulico);
- 2) **flavonoidi** di cui fanno parte le antocianidine, flavanoli, flavandioli, flavanoni, flavanonoli, flavoni, isoflavoni, flavonoli, antociani e calconi;
- 3) **polifenoli a struttura non flavonoica** come gli stilbeni il cui rappresentante più famoso è certamente il *trans*-resveratrolo



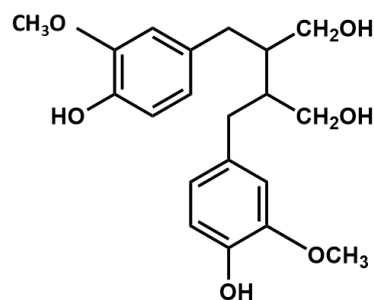
Acidi fenolici (acido gallico e acido ferulico)



Struttura base dei flavonoidi



Stilbeni

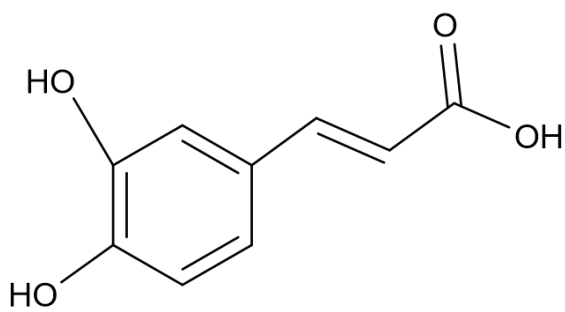


Lignani

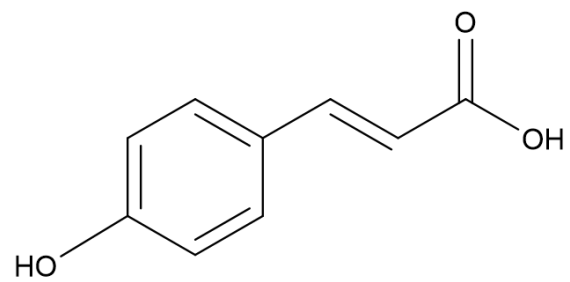
Figura 1. Classi di polifenoli

Le proprietà curative delle piante si basano principalmente sull'azione dei polifenoli, tra cui i flavonoidi hanno un posto speciale. Negli ultimi dieci anni i polifenoli hanno riscosso molta attenzione da parte della comunità scientifica in virtù delle loro varie e note proprietà biologiche come quelle antiossidanti, antitumorali, antivirali, antimicrobiche,

antiinfiammatorie ed altre (Chojnacka et al. 2021; Coșarcă et al. 2019). Inoltre, studi epidemiologici indicano che cibi e bevande ricche di polifenoli rappresentano un importante fattore di prevenzione delle malattie come quelle cardiovascolari e neoplastiche. Pertanto, comportano la diminuzione della mortalità e rallentamento dei processi di invecchiamento (Gramza et al. 2005). L'interesse verso i polifenoli, come principi attivi contro i microorganismi patogeni, potrebbe essere riconducibile sia per i loro ampio spettro d'azione, come dimostrano sperimentalmente *in vitro* i flavan-3-oli, flavonol e tannini, sia alla soppressione dei fattori di virulenza microbica, come l'inibizione della formazione del biofilm, la riduzione dell'adesione dei ligandi dell'ospite e la neutralizzazione di tossine batteriche. Recenti studi evidenziano che queste molecole mostrano un sinergismo con gli antibiotici (Daglia et al. 2012). Di conseguenza, al fine di sostituire conservanti e farmaci di sintesi, alcune classe di polifenoli sono stati proposti per lo sviluppo di nuovi conservanti naturali e terapie innovative contro le diverse infezioni microbiche conseguenza del continuo aumento dell'antimicrobico resistenza (Jayaraman et al. 2010; Rodriguez et al. 2010). L'attività antimicrobica dei polifenoli è strettamente correlata alla struttura della molecola. Si ritiene che l'azione inibitoria sia provocata dai gruppi OH, che interagendo con la membrana cellulare dei batteri possono distruggerne le strutture della membrana e determinare la fuoriuscita dei componenti cellulari. Sia la posizione che il numero di gruppi OH aumentano l'efficacia dell'azione antimicrobica della molecola (Gyawali et al. 2014). A titolo di esempio come riportato da (Stojković et al. 2013) si può citare che l'acido caffeico ha un potere antimicrobico superiore rispetto all'acido p-cumarico dovuto all'aggiunta di un altro gruppo OH (**Figura 2**). Nonostante la notorietà di cui i polifenoli godono in campo medico, ad oggi i meccanismi d'azione responsabili della loro attività farmacologica non sono ancora completamente conosciuti.



Acido caffeico



Acido p-cumarico

Figura 2. Acidi fenolici la cui attività antimicrobica è influenzata dalla posizione del gruppo ossidrilico

Tra i fenoli i flavonoidi costituiscono il più grande gruppo a basso peso molecolare ampiamente distribuiti nelle piante vascolari sotto forma soprattutto di glicosidi piuttosto che agliconi e derivati metilati. Oltre ad esplicare un ruolo chiave nel processo della fotosintesi, rappresentano i pigmenti più facilmente individuabili nei fiori, frutti e foglie di varie specie vegetali, responsabili dei più vivaci colori ed implicati in altre svariate funzioni. La struttura chimica di base è uno scheletro di difenilpropano indicata, anche, come C6-C3-C6, è costituita da quindici atomi di carbonio nel loro nucleo primario: due anelli a sei membri collegati con un'unità a tre atomi di carbonio che può o meno far parte di un terzo anello, anello piramico o anello C, (Karak et al. 2019).

Il precursore di tutti i composti fenolici è la fenilalanina: mediante la via dei fenil-propanoidi questo amminoacido viene convertito prima ad acido cinnamico e successivamente ad acido cumarico, da cui inizia la sintesi dei flavonoidi e della lignina. I flavonoidi, in base alle modificazioni che possono insorgere sulla struttura di base mediante l'aggiunta o la rimozione di sostituenti, vengono suddivisi in diverse classi. Principalmente, le modifiche riguardano la formazione di doppi legami e l'aggiunta di gruppi carbonili e idrossili sull'anello C. Flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli e antocianidine sono tra i gruppi di flavonoidi maggiormente studiati e dotati di importanti proprietà biologiche, come quella antiinfiammatoria, anticancerogena, antimicrobica, antivirale, antiossidante e antidiabetica (Gandhi et al. 2020; Batiha et al. 2020; Rajeshkanna et al. 2020; Wu et al. 2014).

1.4.2 Acidi grassi

Gli acidi grassi sono acidi organici alifatici costituiti da catene lineari di atomi di carbonio la cui struttura di base è $\text{CH}_3(-\text{CH}_2)_u-\text{COOH}$. Sono molecole anfipatiche la cui parte idrofobica è rappresentata dalla catena idrocarburica mentre il gruppo carbossilico terminale è la parte idrofilica. In base alla lunghezza della catena carboniosa vengono classificati in: acidi grassi a catena corta con numero di atomi di carbonio da 1 a 4; acidi grassi a catena media con numero di atomi di carbonio da 8 a 14; acidi grassi a catena lunga con numero di carbonio superiore 16. Inoltre, per la presenza o assenza di doppi legami vengono ulteriormente suddivisi in saturi ed insaturi (**Figura. 3**). Gli acidi grassi insaturi spesso possiedono configurazione *cis* in tutti i doppi legami e possono essere monoinsaturi (MUFA, *MonoUnsaturated Fatty Acid*) o poliinsaturi (PUFA, *PolyUnsaturated Fatty Acid*). I MUFA più diffusi in natura sono l'acido oleico (18:1 *n*-9) e l'acido palmitoleico (16:1 *n*-7) mentre gli acidi grassi essenziali linoleico (18:2 *n*-6) e α -linolenico (18:3 *n*-3) rappresentano i principali PUFA. La sintesi degli acidi grassi avviene per condensazione del malonil coenzima A mediante l'azione di un complesso multi-enzimatico chiamato *Fatty Acid Synthetase* (FAS). Queste molecole rappresentano i "mattoni" di partenza per la sintesi della maggior parte dei lipidi. Sia nelle cellule animali che vegetali svolgono azione strutturale e funzionale. In natura possono trovarsi sia in forma esterificata in trigliceridi (TG), fosfolipidi e negli esteri del colesterolo o come acidi grassi liberi. Diversi studi dimostrano le diverse proprietà benefiche che risiedono negli acidi grassi come quella di prevenire le malattie cardiovascolari, attività antimicrobica, antiinfiammatoria e antitumorale (Yoon et al. 2018; Rodriguez-Leyva et al. 2010; Hardman et al. 2004). Lo sviluppo della resistenza dei microbi, verso agenti antimicrobici già in uso, ha reso necessaria la ricerca di antimicrobici alternativi, compresi gli acidi grassi e i loro derivati (ad es. acidi grassi metilati e idrossilici). A riguardo, ad oggi sono stati condotti ampi studi microbiologici sia sugli acidi grassi saturi che insaturi, che mostrano una stretta correlazione tra la loro struttura e attività antimicrobica, ad esempio la diversa lunghezza della catena influisce sull'efficacia d'azione verso diverse tipologie di ceppi batterici. Infatti, come indica Yoon et al. 2018 nei confronti dei batteri gram-positivi gli acidi grassi con catene medie o lunghe possiedono un'azione antibatterica maggiore rispetto ai gram-negativi.

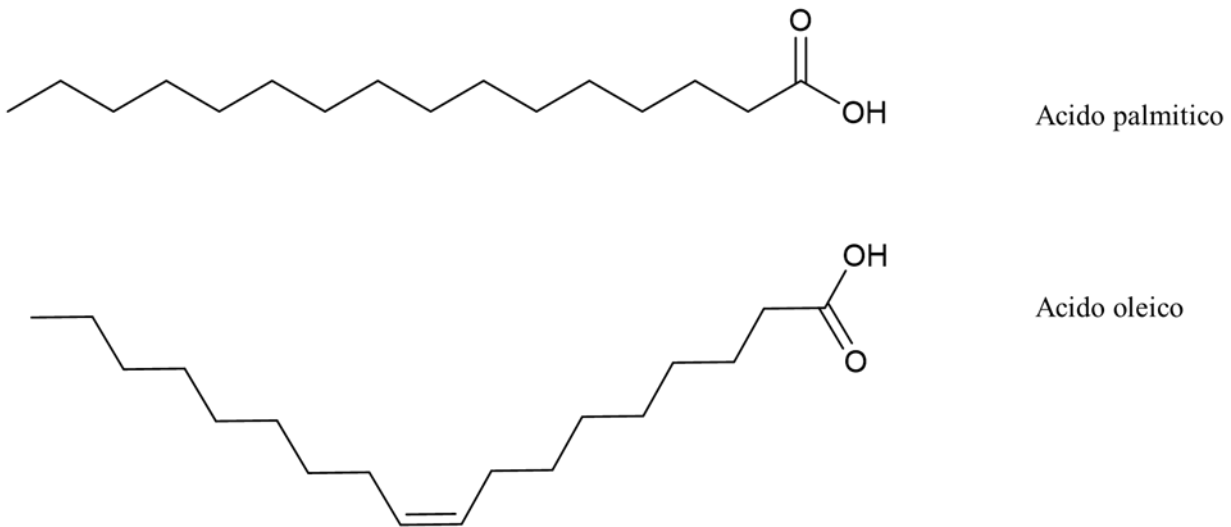


Figura 3. Acidi grassi

1.4.3 Carboidrati

I carboidrati chiamati anche glucidi o glicidi sono i costituenti più abbondanti di cereali, frutta, verdure e legumi rappresentando la principale fonte energetica nella nutrizione umana. Essi sono composti organici ternari costituiti da carbonio, idrogeno e ossigeno con formula di struttura generale $(CH_2O)_n$. Possono essere considerati composti poliossidrilati alifatici e per la presenza di un gruppo carbonilico si distinguono in aldosi (gruppo aldeidico) o chetosi (gruppo chetonico) poliossidrilati (Colonna et al. 2013). La biomassa vegetale è soprattutto costituita da carboidrati che oltre alla funzione energetica hanno anche funzione plastica. Infatti, prendendo origine dalla fotosintesi intervengono in diversi processi fisiologici: si accumulano come materiali di riserva; vanno a costituire l'impalcatura delle pareti cellulari; liberano energia con la respirazione e fermentazione. In base alla struttura chimica e al grado di polimerizzazione vengono suddivisi in monosaccaridi, disaccaridi, oligosaccaridi, polisaccaridi (**Figura. 4**). I carboidrati ingeriti dall'organismo umano sono principalmente l'amido e disaccaridi come il saccarosio e il lattosio. Glucosio, fruttosio e saccarosio rappresentano gli zuccheri fondamentali delle piante, la cui proporzione varia da specie a specie, dalle condizioni ecologiche e dalle diverse parti della pianta. L'elemento strutturale fondamentale è rappresentato da un polimero del β -glucopiranosio chiamato cellulosa che è il principale componente dei fusti legnosi, delle fibre e della maggior parte delle pareti cellulari.

L'amido – un polisaccaride costituito da lunghe catene di residui di α -glucosio uniti da legami 1-4 (amilosio) e in parte con catene con legami 1-6 (amilopectina) – rappresenta il materiale di riserva con cui le piante conservano l'energia solare sotto forma di energia chimica (Capasso et al. 2011). Da millenni lo zucchero viene utilizzato come rimedio nella medicina tradizionale per realizzare impacchi antisettici e disinfettare ferite, piaghe e lesioni di ogni tipo. Ancora oggi nei paesi in via di sviluppo, questi rimedi rappresentano delle alternative preziose, in quanto i farmaci moderni sono spesso fuori portata per la popolazione. I carboidrati ed alcuni loro derivati sono biomolecole interessanti, in quanto costituiscono dei principi attivi che rendono alcuni vegetali importanti oggetto di studio per le loro potenzialità in campo farmaceutico, in particolare come antimicrobici. Le loro diverse promettenti proprietà biologiche: antiossidanti, antimicrobiche, antivirali e antitumorali (Li et al. 2018; Mazarei et al. 2017) sono state recentemente accertate. A titolo di esempio il polisaccaride galattomannano e i suoi derivati sono tra i biopolimeri oggetto di diversi studi in virtù delle loro proprietà utili non solo in campo farmaceutico ma anche cosmetico e alimentare (Geronço et al. 2021). Anche alcuni monosaccaridi vegetali stanno conquistando l'attenzione dei microbiologi come alternativa terapeutica antibiotica in caso di infezioni. A titolo d'esempio studi sul D-mannosio stanno dimostrando che potrebbe essere un'alternativa terapeutica alla terapia antibiotica in caso di infezioni alle vie urinarie causate da enterobacteriaceae o pseudomonadaceae (Graziottin et al. 2014).

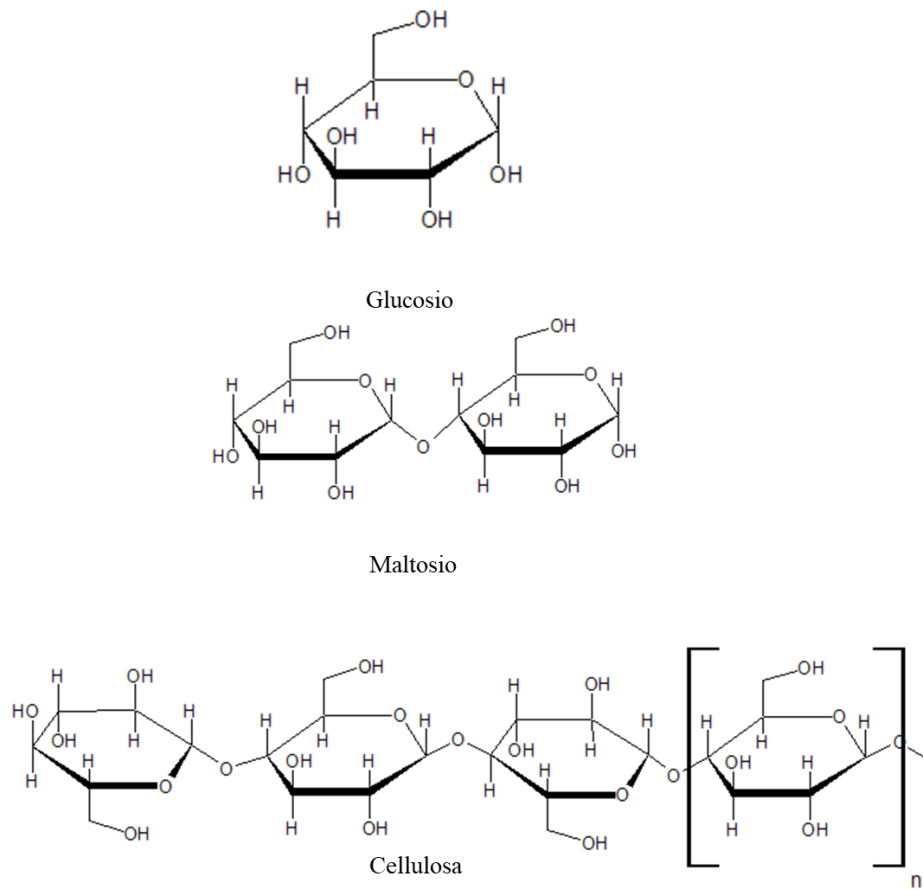


Figura 4. Esempi di monosaccaride, disaccaride e polisaccaride

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 Il materiale vegetale

- I cinorrodi essiccati di *R. canina* sono stati acquistati dall'azienda Minardi (Bagnacavallo, RA). La matrice è stata trattata per separare i semi dalla polpa. Porzioni di materiale vegetale sono stati destinati alla fase di estrazione.
- Per la specie *R. ulmifolius*, identificata dal Prof. Andrea Maxia (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università di Cagliari), è stata attuata una campagna di raccolta dallo spontaneo nell'area di Masullas (OR) (39.7089 N, 8.7739 E) nel maggio 2019 per le foglie e settembre per i frutti. Normalmente il materiale vegetale appena raccolto ha un elevato grado di umidità (frazioni in massa di acqua dal 60 % al 90 %) che pone grossi problemi di conservazione e non consente l'immediato utilizzo nelle estrazioni come in quella SFE. Di conseguenza è stato necessario adottare delle procedure che hanno consentito di ridurre il tenore di acqua fino circa al 10 %; pertanto, le foglie sono state essiccate mentre le more sono state liofilizzate. Il processo di essiccazione è stato eseguito a temperatura ambiente in locali con ventilazione naturale per circa sette giorni. Mentre per la liofilizzazione si è ricorsi all'utilizzo di un liofilizzatore sottovuoto Lio 5P. Dopo trattamento le matrici sono state triturate mediante l'utilizzo di un robot da cucina, avendo cura di non provocare surriscaldamenti che potrebbero alterare la composizione chimica e causare la perdita – in toto o in parte – dei componenti volatili.

2.2 Metodiche estrattive e condizioni operative

Per l'ottenimento degli estratti dalle matrici investigate ci si è avvalsi delle seguenti tecniche estrattive.

L'estrazione mediante idrodistillazione è stata eseguita con apparato Clevenger (**Figura. 5**) secondo la normativa della Farmacopea Europea (European Pharmacopoeia 1997).

- 1) L'estrazione è stata realizzata utilizzando un pallone da 5.0 L contenente 2.5 L di acqua mantenuta all'ebollizione da un mantello riscaldante (potenza massima, 250 W). In ogni esperimento, della durata di 4 h, sono stati trattati 100 g di matrice vegetale. I campioni ottenuti sono stati conservati ad una temperatura di +4 °C fino al loro utilizzo.

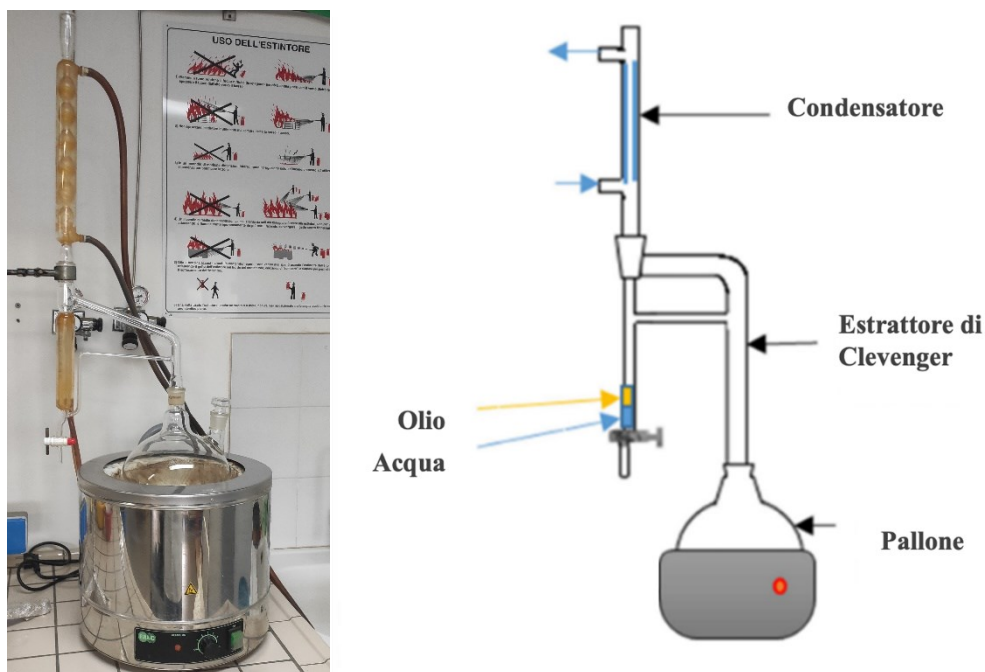


Figura 5. Apparato Clevenger; allestimento sperimentale e schema

2) Mediante il processo di **macerazione** i materiali vegetali di *R. canina* (20 g) e *R. ulmifolius* (10 g) sono stati macerati in (100 o 120) mL di metanolo, etanolo o acqua per 48 h a temperatura ambiente ($T \cong 25 \text{ }^\circ\text{C}$) e successivamente filtrati.

I macerati alcolici sono stati concentrati allontanando il solvente mediante un evaporatore rotante a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

3) L'**estrazione** mediante l'uso del ***n*-esano** come solvente è stata realizzata in un **apparato Soxhlet (Figura 6)**. Tipicamente, in ogni esperimento 10 g di matrice in polvere è stata trasferita in un ditale di cellulosa inserito in un sistema Soxhlet munito di un pallone da 100 mL contenente 60 mL di *n*-esano. Il solvente è stato riscaldato per 6 h alla temperatura di ebollizione ($T^*_{\text{cb},n\text{-esano}} = 69 \text{ }^\circ\text{C}$); I campioni sono stati concentrati allontanando il solvente mediante un evaporatore rotante a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Gli estratti isolati a partire dalla soluzione in *n*-esano ed i macerati alcolici, destinati alla caratterizzazione chimica e biologica, sono stati conservati a $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ fino al loro utilizzo, mentre gli estratti acquosi sono stati stoccati in congelatore a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, per evitare la proliferazione di muffe ed altri microorganismi.

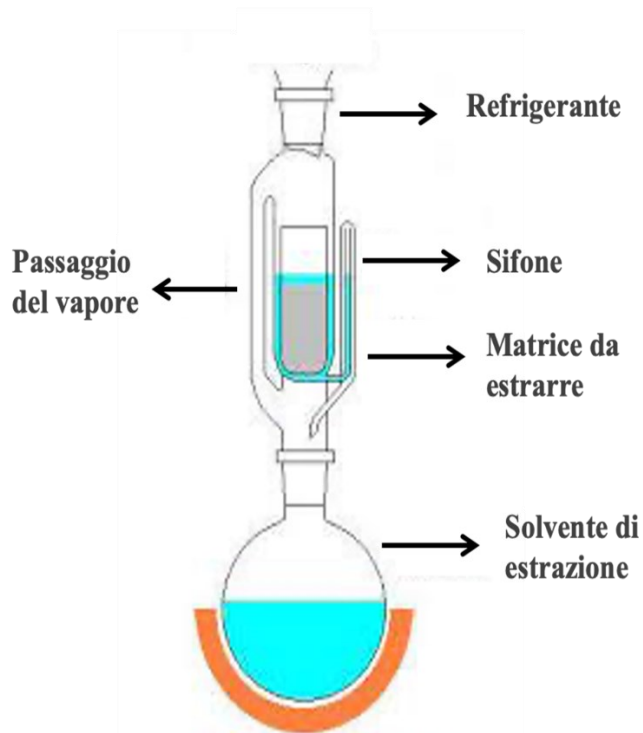


Figura 6. Apparato Soxhlet; allestimento sperimentale e schema

- 4) **Estrazione mediante CO₂ in fase supercritica** è stata eseguita utilizzando l'impianto del Laboratorio di Fluidi Supercritici (Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche Università di Cagliari) (**Figura. 7**). L'apparecchiatura, costruita dalla ditta LA-ME (Bergamo) su progetto dell'Università degli Studi di Cagliari e Milano, è munita di un estrattore di capacità 0.32 dm³ e di due separatori in serie di volume rispettivamente di (0.40 e 0.30) dm³ con una pressione massima di esercizio di 350 bar. Sul fondo, il secondo separatore è dotato di una valvola micrometrica dalla quale è possibile prelevare, per spillamento, gli estratti allo stato liquido che vi si accumulano durante l'esperimento. Mediante l'utilizzo di una pompa per liquidi ad alta pressione (LEWA) il CO₂ viene fatto circolare nell'impianto, mentre la regolazione fine della pressione è effettuata con valvole micrometriche e di regolazione. Il controllo delle pressioni avviene per mezzo di manometri, mentre le temperature sono misurate da termocoppie Fe/Const da 1/8". La portata istantanea di CO₂ è rilevata mediante rotametro calibrato situato a valle dell'impianto mentre la quantità totale è valutata mediante un contatore ELSTER

HANDEL. Gli estratti sono stati ottenuti mediante l'impianto appena descritto con allestimento a singolo separatore.

Dopo aver subito la fase di pretrattamento la matrice finemente sminuzzata (massa generalmente compresa tra (130 e 300) g viene inserita all'interno dell'estrattore adeguatamente assemblato. Le condizioni operative adottate per l'ottenimento di una frazione liquida volatile sono state: 90 bar 40 °C nella sezione di estrazione e 20 bar e 40 °C nella sezione di separazione con una portata del CO₂ pari a 1.0 kg h⁻¹ per una durata di 4 h. Mentre, per ottenere una frazione contenente composti con più alto peso molecolare, la pressione di esercizio viene fissata su un valore compreso tra (200 e 300) bar. I valori di pressione, P/bar , e temperatura, $T/^\circ\text{C}$, adottati nella sezione di estrazione vengono sinteticamente indicati come, SFE[$P/\text{bar};T/^\circ\text{C}$]. All'interno di una bombola con tubo pescante è presente il CO₂ liquido in equilibrio con la sua fase vapore. Il CO₂, grazie ad un sistema di termostatazione, regolato a -4 °C, che assicura che si mantenga allo stato liquido, viene pressurizzato dalla pompa a membrana. Dopo pressurizzazione ad un valore superiore a quello della pressione critica (P_c), il CO₂ passa attraverso un preriscaldatore dove viene portato ad una temperatura superiore alla temperatura critica, T_c , raggiungendo la condizione di fluido supercritico. Allo scopo di attenuare le pulsazioni di flusso della pompa, il CO₂ passa in un polmone contenente il materiale inerte. Sia il polmone che l'estrattore sono contenuti in un forno riscaldato mediante resistenze; la temperatura di esercizio in genere tra (40 e 50) °C viene controllata da una centralina programmabile. Termostati e forno vengono accesi almeno un'ora prima dell'esperimento che inizia quando nelle diverse sezioni dell'impianto si raggiungono le condizioni di pressione e temperature prestabilite.

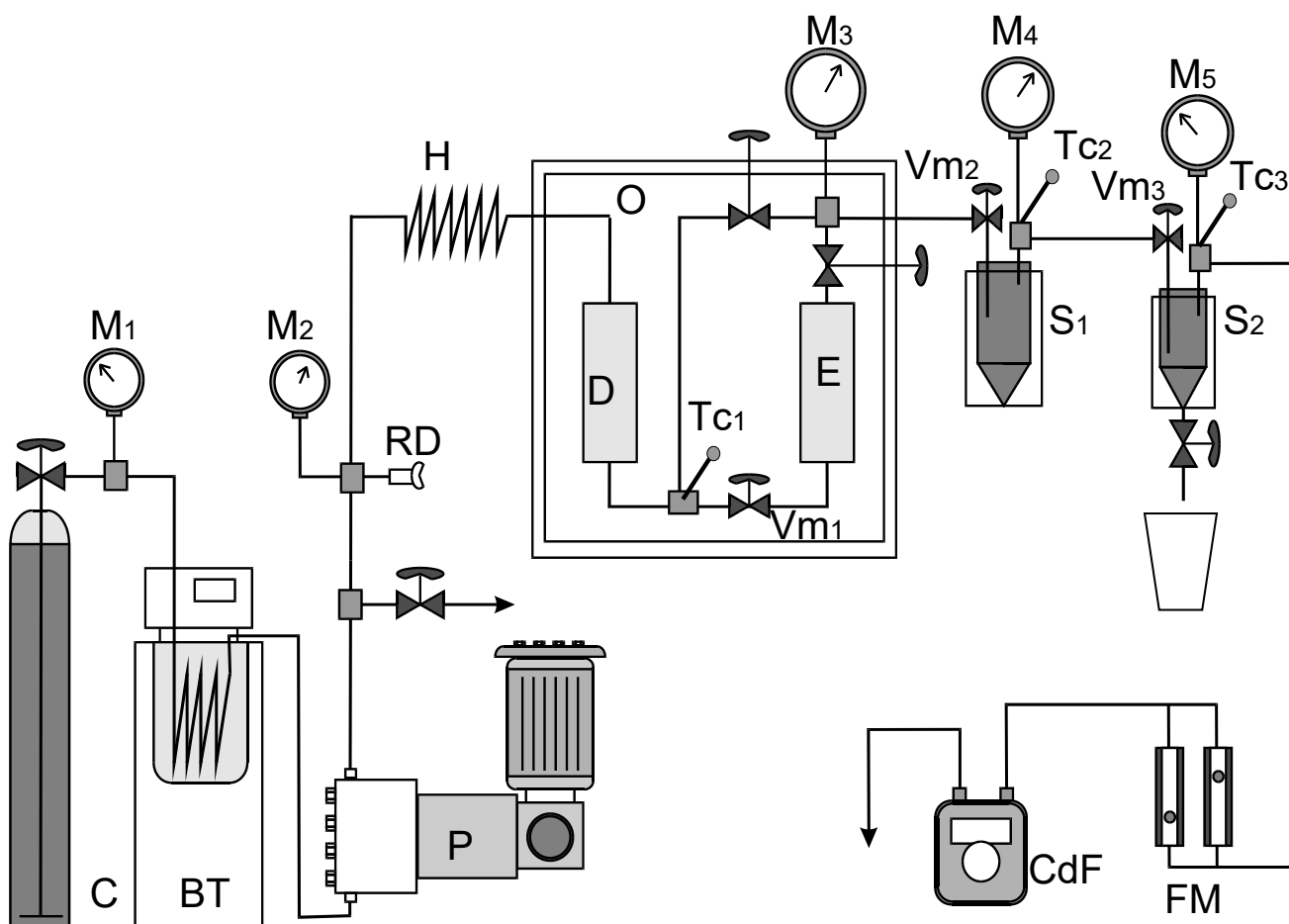


Figura 7. Schema dell'impianto di estrazione supercritica

C bombola di CO₂ con tubo pescante; **BT** bagno termostatico; **P** pompa a diaframma; **RD** disco di rottura; **H** pre-riscaldatore; **O** forno; **D** smorzatore di pulsazioni; **E** estrattore; **S₁**, **S₂**, separatori; **FM** rotametro; **CdF**, misuratore gas; **M₁** ÷ **M₅**, manometri; **Tc₁** ÷ **Tc₃**, termocoppie; **Vm₁** ÷ **Vm₃**, valvole.

2.3 Caratterizzazione chimica

2.3.1 Gas cromatografica accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC-MS)

Con questa tecnica è possibile identificare e quantificare i componenti volatili di miscele complesse aventi una massa molare inferiore approssimativamente a 500 g mol⁻¹. È stato utilizzato un Gascromatografo Agilent 6890N dotato di: autocampionatore 7683 e iniettore split/splitless. Colonne capillari Agilent HP5-MS (5 % phenyl-95 % methylpolysiloxane) o HP1 (polydimethylsiloxane), entrambe 30 m × 0.25 mm i.d., spessore film 0.25 mm. Le condizioni cromatografiche impiegate sono state le seguenti: temperatura da 60 °C, rampa 3

°C/min fino a 250 °C seguita da 20 min in isoterma, temperatura iniettore 250 °C, gas carrier He con flusso di 1.0 mL/min; volume campione (costituito da una soluzione dell'estratto in *n*-esano, frazione in massa 1 %), 1 µL in modalità split (1:10). Il rivelatore utilizzato è uno spettrometro di massa quadrupolare Agilent 5973 MSD detector su cui sono state impostate le seguenti condizioni operative: energia di ionizzazione, 70 eV; corrente di ionizzazione, 60 mA; temperatura sorgente ionizzazione impatto elettronico, 230 °C; temperatura quadrupolo, 150 °C; scan range, (35 ÷ 350) u; 4.51 scans/s. Software Agilent MSD ChemStation E.01.00.237. L'elaborazione dei dati consiste nell'identificazione dei composti mediante confronto dei relativi spettri di massa con quelli presenti nella banca dati generale NIST02 e in quelle specifiche per gli oli essenziali LIBR (TP) Adams (Adams R. P. 2007) e FLAVOUR. Una corretta attribuzione comporta il confronto aggiuntivo tra i tempi di ritenzione, t_r , (o quantità ad essi correlate) dei composti incogniti con quelli di composti noti – ottenuti sperimentalmente o presenti in letteratura/banche dati (Adams R. P. 2007). Poiché il tempo di ritenzione dipende dal tipo di colonna e dai parametri operativi impiegati per la separazione cromatografica è possibile convertire tali dati in indici Kovats (I_k), dipendenti dalla fase stazionaria apolare utilizzata ma, indipendenti dalle caratteristiche geometriche della colonna e, se si usano fasi stazionarie apolari, anche dalla temperatura. I valori di I_k sperimentali vengono calcolati sulla base dei t_r , ottenuti nelle stesse condizioni sperimentali, di un composto sconosciuto *x* e degli alcani normali, secondo la formula:

$$I_k = \frac{\log(t_r)_x - \log(t_r)_z}{\log(t_r)_{z+1} - \log(t_r)_z} \times 100 + 100 \times z \quad (1)$$

dove *z* e *z*+1 rappresentano il numero di atomi di carbonio degli alcani che eluiscono rispettivamente prima e dopo il componente *x*.

La quantificazione dei componenti è solitamente ottenuta mediante il metodo della normalizzazione assumendo fattore di risposta unitario per tutti i componenti. Le aree di ciascun picco, ottenute con un'accurata scelta dei parametri di integrazione del cromatogramma e assumendo che il detector abbia una risposta lineare, sono rappresentative della percentuale in massa associata a quel determinato componente la miscela.

2.3.2 Caratterizzazione qualitativa con spettrometria di massa a bassa e alta risoluzione

Le determinazioni analitiche che utilizzano queste tecniche sono state eseguite sotto la supervisione del Prof. Enzo Cadoni e della Prof.ssa Tiziana Pivetta (Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche, Università Di Cagliari). Mediante spettrometria di massa a bassa risoluzione gli spettri di massa sono stati acquisiti con uno spettrometro di massa 310-MS Varian con triplo quadrupolo QqQ con ionizzazione elettrospray a pressione atmosferica (ESI-API). Le condizioni sperimentali per le modalità di rilevazione degli ioni positivi e negativi erano le seguenti: tensione dell'ago, 3500 V e -3500 V; tensione di schermatura, 600 V e -600 V; temperatura dell'alloggiamento, 60 °C; temperatura del gas di essiccazione, 150 °C; pressione del gas nebulizzatore, 20 psi (1 psi = 0.06895 bar); pressione del gas di essiccazione, 20 psi. L'identificazione dei composti responsabili dello spettro di massa della miscela è stata ottenuta attribuendo a ciascun picco i corrispondenti rapporti m/z. Per la determinazione sperimentale della massa molecolare esatta si è ricorsi all'utilizzo dello spettrometro di massa ad alta risoluzione (HPLC-ESI) OrbitrapElite, Thermo Fisher Scientific, in cui vi è la possibilità di monitorare la sorgente nano ESI.

2.3.3 Analisi Termo Gravimetrica (TGA) e Spettrometria di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

Le analisi TGA dei campioni sono state condotte con un analizzatore termico Perkin-Elmer (UK) modello Simultaneous Thermal Analysis 6000). I campioni, di massa compresa tra (10 e 12) mg, contenuti in crogioli di allumina sono stati sottoposti a trattamento termico tra (25 e 850) °C (velocità di riscaldamento di 10 °C/min) in flusso d'azoto (40 mL/min).

Gli spettri ¹H-NMR (600 MHz) sono stati determinati con uno spettrometro Bruker Avance III HD 600 MHz, dotato di una sonda SmartProbe BBFO da 5 mm. Tutti gli spettri sono stati acquisiti a 300 K. Gli spostamenti chimici sono riportati in parti per milione (ppm), calibrati sul set di picchi del solvente residuo, con costanti di accoppiamento riportate in hertz (Hz).

2.3.4 Caratterizzazione quali-quantitativa degli acidi grassi, esteri metilici e trigliceridi

Tutte le analisi della componente lipidica degli estratti sono state seguite in collaborazione con la Dott.ssa Antonella Rosa (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Cagliari). I campioni (2 mg, in soluzione di EtOH), prima delle analisi strumentali, sono stati sottoposti a blanda saponificazione come descritto in (Rosa et al., 2017). L'analisi totale degli acidi grassi è stata effettuata utilizzando un HPLC Agilent Technologies 1100 (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA) dotato di un rivelatore a serie di diodi (DAD) e un rivelatore a dispersione di luce evaporativa Infinity 1260 (ELSD). Gli acidi grassi insaturi, rilevati ad una lunghezza d'onda, λ , di 200 nm, e gli acidi grassi saturi sono stati eluiti con CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (75/25/0.12, v/v/v) come fase mobile ad una portata di 2.3 mL/min, utilizzando una colonna XDB-C18 Eclipse. La registrazione e l'integrazione dei dati del cromatogramma sono state effettuate tramite un sistema di dati Agilent OpenLAB Chromatography. L'identificazione è stata eseguita utilizzando composti standard e spettri UV (per gli acidi grassi insaturi). Le curve di calibrazione per tutti gli acidi grassi sono state costruite utilizzando i composti standard. Oltre all'analisi degli acidi grassi eseguita con il procedimento strumentale precedentemente descritto, su alcuni campioni sono state eseguite anche le analisi degli esteri metilici e dei triacilgliceroli (TAG). Mediante un gascromatografo HP-6890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID) e dotato di una colonna di cianopropilmetil-polisilossano HP-23 FAME (Rosa et al. 2017) sono state attuate le misurazioni degli esteri metilici. Questi ultimi sono stati identificati per confronto con composti standard e quantificati come percentuale in massa rispetto alla massa totale del campione. Per l'analisi dei TAG di campioni disciolti in MeOH (1 mg/mL), è stato utilizzato un HPLC Agilent Technologies 1100 dotato di un rivelatore a dispersione di luce evaporativa 1260 Infinity (HPLC-ELSD). La separazione dei TAG è stata effettuata con una colonna Inertsil ODS-2 e MeOH come fase mobile, ad una velocità di flusso di 2 mL/min. Le soluzioni standard dei TAG: LnLnLn, LLL, LLO, LLP, OOL, OOO e PPP (dove L, acido linoleico; Ln, acido linolenico; O, acido oleico; P, acido palmitico) sono state preparate in MeOH. I TAG sono stati separati in base al numero di carbonio equivalente (ECN), calcolato secondo l'equazione seguente e riportata in (Rosa et al. 2019; Rosa et al. 2017):

$$ECN = CN - 2 DB \quad (2)$$

dove CN è il numero di atomi di carbonio e DB è il numero di doppi legami presenti nell'acido grasso in esame.

La quantificazione del TAG si è basata sul metodo di normalizzazione interna, assumendo che la risposta del rivelatore fosse la stessa per tutti i composti; l'uso dei valori ECN ha consentito l'identificazione di composti di cui non erano disponibili gli standard analitici.

2.3.5 Determinazione del contenuto totale di fenoli. Metodo di Folin-Ciocalteu (FC)

La quantificazione di fenoli e flavonoidi, la determinazione dell'attività antiossidante e di inibizione enzimatica sono state realizzate in collaborazione con la Prof.ssa Antonella Fais e la Dott.ssa Benedetta Era (Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università di Cagliari).

Il saggio di Folin-Ciocalteu (FC), utilizza come reattivo specifico una miscela in soluzione acquosa di fosfomolibdato di sodio ($\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfotungstato di sodio ($\text{Na}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$). Esso sfrutta la capacità del reattivo di FC di reagire con i fenoli contenuti negli estratti vegetali. La reazione fra il reattivo di FC e i fenoli avviene in condizioni basiche a $\text{pH} = 10$ (ottenuto con l'aggiunta di una soluzione di Na_2CO_3). In ambiente basico si verifica la deprotonazione dell'ossidrile con formazione dell'anione fenolato. Questo ione riduce il reattivo di FC che, una volta ridotto, presenta un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda, λ , di 750 nm. L'incremento dell'assorbanza a $\lambda = 750$ nm è una conseguenza della presenza di composti fenolici. La concentrazione di polifenoli è stata quindi espressa in mg/g come equivalenti di acido gallico (GAE) rispetto alla massa del campione secco.

2.3.6 Determinazione del contenuto totale di flavonoidi. Metodo del Nitrato di alluminio

Il contenuto totale in flavonoidi viene determinato mediante il metodo del nitrato di alluminio. Questo metodo colorimetrico sfrutta la capacità del nitrato d'alluminio di formare dei complessi cromofori con i flavonoidi presenti all'interno del campione in modo da poterli distinguere da altri composti polifenolici. I complessi cromofori hanno un picco di assorbimento a $\lambda = 415$ nm; l'incremento dell'assorbanza indica che nel campione considerato sono presenti dei flavonoidi. La quantificazione dei flavonoidi totali è stata effettuata facendo riferimento ad una curva di calibrazione ottenuta a partire da una soluzione standard di quercetina in etanolo; ed i risultati sono stati espressi in mg/g, come equivalenti di quercetina, QE, rispetto alla massa del campione secco.

2.4 Saggi biologici

2.4.1 Test antimicrobici

Tutti i test antimicrobici e loro valutazione sono stati eseguiti nei laboratori coordinati dal Prof. Germano Orrù (Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Cagliari), sotto la sua supervisione.

Per le prove antimicrobiche ciascuna specie (batterica o fungina) è stata coltivata secondo condizioni di crescita standard in specifici terreni di coltura.

- 1) Il terreno Mueller-Hinton Agar (Microbiol, Uta, Cagliari), è stato impiegato per la crescita di *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Le condizioni di sviluppo sono state: in aria a 37 °C.
- 2) Il terreno Schaedler Agar e Broth (Microbiol) è stato impiegato per la crescita di *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus intermedius* e *S. mutans*. Le condizioni di sviluppo: in aria contenente CO₂ al 5 % a 37 °C.
- 3) Sabouraud Dextrose Agar e Broth (Microbiol), utilizzato per *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*. Le condizioni di sviluppo: in aria a 37 °C.

Tutti i ceppi sono stati conservati a -80 °C in microprovette eppendorf da 2.5 mL, nei rispettivi terreni di coltura liquidi arricchiti in glicerolo, fino ad una concentrazione (w/w) del 15 %. Ciascun patogeno era contenuto nelle provette in fase esponenziale di crescita, ad un titolo pari a 10⁸ CFU/mL (CFU: Unità Formanti Colonia). Da queste provette sono stati preparati gli inoculi per i saggi di crescita. Sono stati eseguiti i metodi *in vitro* di diffusione (Kirby-Bauer) e di diluizione. Quest'ultimo ha consentito di determinare la Minima Concentrazione Inibente (MIC) e la Minima Concentrazione Battericida (MBC); indici quantitativi della sensibilità dei microorganismi agli antibiotici o agli agenti antimicrobici. Con le stesse piastre utilizzate per la valutazione della MIC dopo (3 o 4) giorni di incubazione è stato possibile valutare la Minima Concentrazione Inibente del Biofilm (MBIC).

2.4.1.1 Metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer)

Una prima valutazione antimicrobica è stata effettuata utilizzando il test di diffusione in agar (Kirby-Bauer) seguendo le procedure EUCAST (<http://www.eucast.org>) (Barberis et al. 2020). In pratica per ciascun formulato, sono stati depositi (0.100 o 0.0500) mL di campione in un pozzetto presente in 15 mL di terreno di coltura agarizzato, a 55 °C, posizionato in una piastra di Petri di 90 mm di diametro, previamente seminata con il patogeno in esame. Dopo un'incubazione, di 24 h per i batteri e di 48 h per i funghi, è stato valutato il possibile alone di inibizione della crescita sulla superficie del terreno (**Figura 8**).

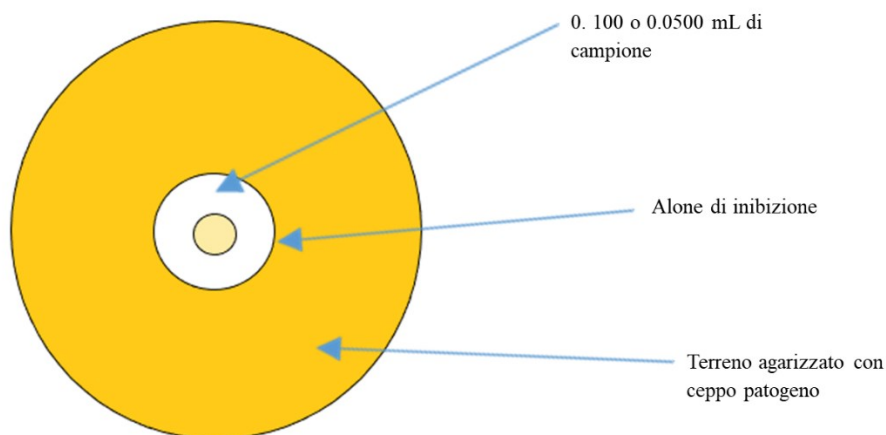


Figura 8. Schema del test di Kirby-Bauer utilizzato per testare i ceppi batterici e fungini

2.4.1.2 Metodi delle diluizioni. Determinazioni di MIC e MBC

La Concentrazione Minima Inibente e (MIC) e la Concentrazione Minima di Battericida (MBC) sono state valutate mediante una procedura descritta nei protocolli del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (Orrù et al. 2017). A tal scopo sono state saggiate concentrazioni scalari di ciascun preparato su una sospensione pari a 10^6 CFU/mL per i batteri e 10^5 CFU/mL per i funghi. Dopo un'incubazione in piastra multiwell di 96 pozzetti per (24 ÷ 48) h a 37 °C, nei terreni liquidi, precedentemente descritti nel par. 2.4.1, per i vari ceppi è stata valutata la presenza/assenza della crescita microbica sulla base della torbidità/limpidezza del mezzo di crescita, tramite lettura spettrofotometrica (SLT-Spectra II™, SLT Instruments, Germany). Dalle sospensioni in cui si osservava completa inibizione della crescita sono state allestite delle subcolture in terreno agarizzato per valutare l'eventuale vitalità residua del microorganismo (MBC). L'MBC era la concentrazione più bassa in grado di ridurre la crescita batterica del 99.9 % in CFU/mL, rispetto alla diluizione MIC.

2.4.1.3 Saggio antibiofilm. Determinazione della MBIC

La Concentrazione Minima di Inibizione del Biofilm (MBIC), che rappresenta la più bassa concentrazione di antimicrobico o sostanza antimicrobica in grado di inibire la strutturazione a biofilm, è stata valutata seguendo il metodo descritto nel "protocollo di colorazione del cristal-violetto" pubblicato dal Montana University Center for Biofilm Engineering <http://www.biofilm.montana.edu/>. L'inibizione del biofilm, per ogni ceppo, da parte dei preparati è stata valutata dopo (3 o 4) giorni di incubazione in piastre multiwell da 96 pozzetti,

utilizzando la stessa procedura di crescita per le prove in sospensione per la valutazione della MIC. La quantità del biofilm presente in ciascun pozzetto è stata valutata tramite la misurazione dell'assorbanza a $\lambda = 620$ nm mediante un lettore multipiastra (Multiskan™ FC Microplate Photometer Thermo Scientific™).

2.4.2 Attività antiossidante

Il metodo spettrofotometrico dell'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonico) (ABTS) permette di valutare il potere antiossidante *in vitro* di un estratto vegetale, sfruttando la riduzione del radicale cationico ABTS^{•+}. Il radicale monocationico si genera facendo reagire una soluzione acquosa di ABTS 7 mM con potassio persolfato (K₂S₂O₈) 2.45 mM. (**Figura 9**). La miscela viene lasciata a incubare a temperatura ambiente e al buio per 24 h prima dell'utilizzo. La concentrazione della soluzione viene aggiustata a (0.70 ± 0.02) mM. Il radicale ABTS^{•+} è caratterizzato da un colore blu-verde con un picco di assorbimento a $\lambda = 734$ nm. I campioni di estratti (10 μ L), a diversa concentrazione, sono stati aggiunti a 1 mL di soluzione diluita di ABTS^{•+} e miscelati vigorosamente. Dopo la reazione a temperatura ambiente per 1 min, è stata misurata l'assorbanza a lunghezza d'onda $\lambda = 734$ nm. La riduzione del radicale cationico in seguito all'aggiunta di uno o più molecole antiossidanti provoca un decremento del valore iniziale dell'assorbanza alla suddetta lunghezza d'onda. Pertanto, si calcola la diminuzione di assorbanza rispetto alla curva standard dell'acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetra-metilcroman-2-carbossilico (Trolox) considerato come controllo positivo. Per ogni concentrazione di estratto è stata calcolata la riduzione percentuale dell'assorbanza (decolorazione della soluzione) a $\lambda = 734$ nm e la capacità antiossidante è stata espressa come inibizione, I_{ABTS} , in percentuale, calcolata secondo la formula:

$$I_{ABTS} / \% = (A_x - A_0) 100 / A_0 \quad (3)$$

A_x e A_0 rappresentano rispettivamente l'assorbanza, a $\lambda = 734$ nm, dei campioni contenenti l'estratto e del controllo. L'attività antiossidante viene espressa come concentrazione dell'estratto che determina una riduzione di assorbanza pari al 50 % dell'assorbanza del Trolox (EC₅₀).

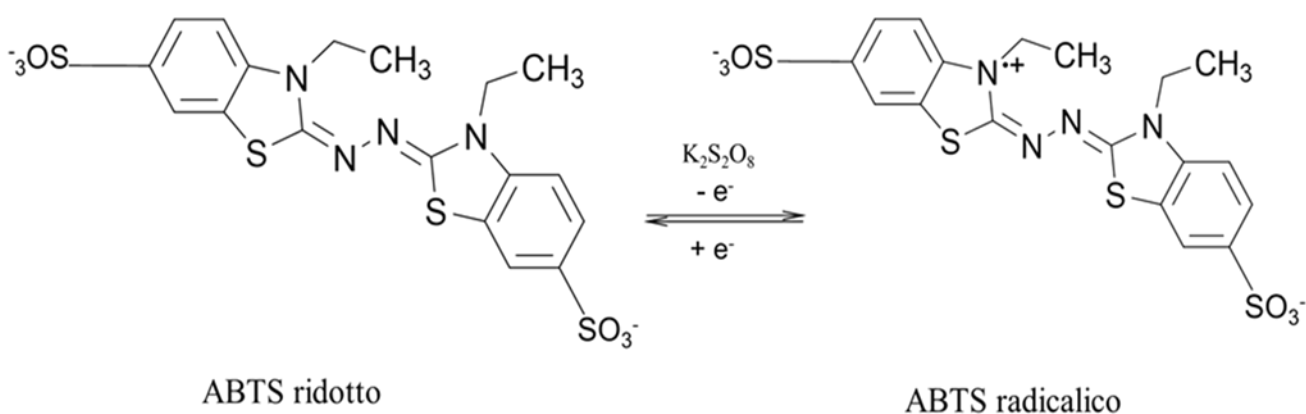


Figura 9. Ossidazione dell'ABTS in presenza di potassio persolfato

2.4.3 Attività inibitoria della xantina ossidasi (XO)

L'attività inibitoria sull'enzima xantina ossidasi (XO) è stata determinata mediante spettrofotometria, monitorando la formazione di acido urico che si origina per degradazione della xantina. La soluzione di XO è stata preparata diluendo la XO da latte bovino (Sigma-Aldrich) a una concentrazione finale di 0.5 U mL^{-1} in tampone fosfato 100 mM $\text{pH} = 7.5$. La miscela di reazione è costituita da $869 \mu\text{L}$ di tampone fosfato 100 mM $\text{pH} = 7.5$, $50 \mu\text{L}$ della soluzione di XO e $20 \mu\text{L}$ di estratto vegetale o DMSO puro (controllo). Dopo un'incubazione di 10 min , a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, viene aggiunta la soluzione di xantina 0.82 mM .

L'attività enzimatica viene determinata dalle misure di assorbanza registrate a $\lambda = 295 \text{ nm}$ per 3 min . Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. L'attività della XO è stata espressa come inibizione della XO, I_{XO} , in percentuale, calcolata secondo la formula:

$$I_{\text{XO}} / \% = [1 - (B/A)] 100 \quad (4)$$

dove A è la differenza in assorbanza del controllo a (0.0 e 3.0) min e B rappresenta la differenza in assorbanza tra il campione e l'estratto a (0.0 e 3.0) min. Il valore di IC_{50} pari alla concentrazione di estratto che determina il 50 % di inibizione dell'attività enzimatica è stata calcolato dall'interpolazione delle curve dose-risposta.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I campioni analizzati sono stati etichettati specificando, ordinatamente: • la metodica di ottenimento, • la specie botanica (*Rosa canina*, Rc o *Rubus ulmifolius*, Ru) • il particolare organo vegetale utilizzato (semi, s, polpa dei cinorrodi/frutti, p e foglie, f) e, da ultimo, solo se l'estratto è eterogeneo • la natura acquosa, W, o oleosa, O, dell'estratto. Le metodiche estrattive sono state indicate secondo la seguente legenda: HD, idrodistillazione; M_{H₂O}, macerazione in acqua; M_{MeOH}, macerazione in metanolo; M_{EtOH}, macerazione in etanolo; Sx, estrazione con *n*-esano in Soxhlet; SFE[*P*/bar:*T*/°C], estrazione supercritica alle condizioni specificate.

La caratterizzazione chimica è stata pianificata tenendo conto della natura degli estratti. L'analisi GC-MS è stata utilizzata su campioni che si presumeva potessero contenere composti appartenenti alle famiglie di terpeni, terpenoidi, cumarine; alcani saturi e insaturi, alcoli ed acidi a lunga catena e simili. L'identificazione e quantificazione di TAG e derivati è stata eseguita solo sugli estratti supercritici ad alta pressione, sugli estratti in *n*-esano e sui macerati in alcol. La TGA è stata utilizzata per quantificare la frazione organica presente negli estratti tal quali, a base acquosa. I fenoli totali sono stati quantificati negli estratti etichettati SFE[300:40], in quelli ottenuti con *n*-esano in Soxhlet, e nei macerati. La quantificazione dei flavonoidi è stata eseguita solo sugli estratti acquosi etichettati SFE[90:40]RcsW e M_{H₂O}Ruf. La determinazione qualitativa dei fenoli, carboidrati e lipidi con spettrometria a bassa e alta risoluzione è stata effettuata sui campioni ottenuti in SFE[90:40], SFE[300:40], in *n*-esano con Soxhlet, e nei macerati alcolici delle foglie e dei frutti di *R. ulmifolius*.

I risultati organizzati in tabelle e figure sono riportati nei paragrafi 3.1.3 e 3.2. 3

3.1 *Rosa canina*

3.1.1 Estratti di semi

3.1.1.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40]

Le estrazioni mediante SFE[90:40] hanno permesso di ottenere un estratto eterogeneo costituito da una fase acquosa, SFE[90:40]RcsW e una oleosa, SFE[90:40]RcsO. Sono state effettuate prove di estrazione di durata variabile dalle 4 h alle 18 h per arrivare al completo esaurimento della matrice. Per l'estratto oleoso dopo 4 h di estrazione si è calcolata una resa, *Y*, espressa come percentuale del rapporto massa di estratto/massa della matrice, pari a 0.18 %. Le rese percentuali della fase acquosa in funzione del tempo (h) sono riportate nella **Figura 10**. La resa massima, ottenuta dopo 18 h di estrazione, per l'estratto acquoso è stata del 5.8 %.

- L'analisi dell'estratto a base acquosa, SFE[90:40]RcsW, è stata eseguita mediante GC-MS. I campioni da analizzare sono stati preparati secondo due modalità. In un caso (metodo I) si è preparata una soluzione in *n*-esano dell'estratto acquoso approssimativamente al 50 % (w/w); la soluzione risultante, limpida, appariva omogenea. Nell'altro caso (metodo II) l'estratto acquoso è stato liofilizzato e da questo è stata preparata una soluzione all'1 % in *n*-esano (w/w). Tra i componenti identificati nel campione, preparato secondo il metodo I, si rileva la presenza di apiolo e di esteri metilici o etilici degli acidi grassi palmitico, oleico, stearico e linoleico (**Tabella 1**). I composti organici principali sono i seguenti: metil linoleato (31.4 %), metil oleato (25.1 %), metil palmitato (7.5 %), etil linoleato (4.7 %) ed etil linolenato (3.3 %). L'analisi GC-MS effettuata sul campione, preparato secondo il metodo II, mostra che la vanillina (27.1 %) è il composto principale (**Tabella 2**). Queste due analisi – eseguite con diversi strumenti impostati in maniera equivalente – hanno fornito risultati complementari con due componenti in comune: metil palmitato e metil linoleato. I campioni da analizzare mediante Spettrometria di Risonanza Magnetica Nucleare sono stati preparati ad una concentrazione pari al 10 % (w/w) di estratto SFE[90:40]RcsW in acqua deuterata. L'analisi NMR mostra gli spettri ¹H dei campioni che risultano coerenti, confermando la buona riproducibilità della tecnica estrattiva adottata. Gli spettri mostrano numerosi segnali nella zona alifatica tra (1 e 3) ppm; segnali imputabili a gruppi aromatici, tra (7 e 8) ppm, che potrebbero far pensare alla presenza di flavonoidi; segnali tipici dei gruppi aldeidici, tra (9 e 10) ppm. I segnali caratteristici degli esteri, tra (4 e 5) ppm, che fanno supporre la presenza di insaturazioni di tipo non aromatico, sono mascherati dal largo picco dell'acqua a 4.7 ppm. Tali indicazioni confermano le identificazioni conseguite mediante la tecnica precedentemente citata. Infatti, per esempio, l'apiolo (un fenilpropanoide) contiene un anello aromatico mentre i gruppi alchilici costituiscono lo scheletro degli acidi e degli esteri, come pure i sostituenti di alcuni composti aromatici. Mediante TGA analisi termogravimetrica si è stimato il tenore d'acqua. Dall'analisi dei tracciati è stata ricavata la frazione, in massa, di sostanza secca presente nell'estratto acquoso, compresa tra (0.1 e 10) % (w/w).

- L'attività antimicrobica dell'estratto SFE[90;40]RcsW è stata valutata sui seguenti ceppi batterici (Gram positivi e Gram negativi) o fungini (lieviti) isolati da campioni biologici provenienti da pazienti ospedalizzati o di collezione: *P. aeruginosa* ATCC 15442 (American Type Culture Collection), *K. pneumoniae* isolato clinico NC5, *S. aureus* ATCC BAA-811 meticillino-resistente (MRSA), *E. coli* ATCC 7075, *S. pyogenes* isolato clinico NC4, *S. mutans* CIP103220 (Institut Pasteur Collection), *C. albicans* isolato clinico BF1, *C. krusei* isolato clinico BF2, *C. glabrata* isolato clinico BF3. Il campione mediante il test di sensibilità antimicrobica su terreno di coltura agarizzato (Kirby-Bauer) presenta un ampio spettro d'azione sia verso i batteri Gram positivi, Gram negativi che blastomiceti (*C. albicans.*) con aloni di inibizioni compresi tra (50 a 23) mm di diametro (**Figura 11**).
- L'inibizione batterica e l'attività battericida risultano altamente significative con valori (relativi alle concentrazioni di estratto nelle sospensioni acquose) compresi fra (6.25 e 1.5) % (w/v) per le MIC, e in un intervallo tra il (12.5 e 3.125 % (w/v) per la MBC (**Tabella 3**).
Al pari dei valori di MIC e MBC, l'estratto in esame ha dimostrato una forte capacità di inibire i biofilm batterici e fungini, con valori di MBIC comprese tra (12.5 e 6.25) % (w/v) di estratto (**Figure 12-14**). I sopracitati risultati microbiologici poiché rivelano che l'estratto acquoso possiede un'elevatissima attività antimicrobica, sono stati la base di un deposito brevettuale.

I risultati completi relativi all'estratto acquoso sono riportati nella domanda di brevetto internazionale.

Brevetto dal titolo: Estratto naturale da semi di *Rosa canina* con elevata attività antimicrobica

Titolarità: UniCa

Area: Sanità e Biomedicale

Inventori: Alessandra Piras, Antonella Ibba, Germano Orrù, Silvia Porcedda

Data di deposito: 22/12/2020

Stato: in attesa di concessione

Ambito territoriale: PCT

L'analisi antimicrobica dell'estratto oleoso, SFE[90:40]RcsO, eseguita mediante il metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer), sui ceppi *K. pneumoniae* isolato clinico NC5 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 mostra la totale assenza di aloni di inibizione.

3.1.1.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in *n*-esano con apparato Soxhlet e per macerazione

Sulle stesse matrici, costituite dai semi di *R. canina*, precedentemente sottoposte ad estrazione SFE[90:40] è stata eseguita una prova ad alta pressione SFE[300:40]. La resa in olio (dopo 4 h di estrazione) è stata di 7.1 %; per confronto si è eseguita un'estrazione con *n*-esano in apparato Soxhlet (6 h di estrazione) ottenendo una resa in olio del 13.7 % (*w/w*). Le informazioni quali-quantitative sugli acidi grassi presenti nei succitati estratti mediante analisi HPLC-DAD e GC-FID sono descritte nel seguito.

- Il campione SFE[300:40]Rcs mostra una concentrazione di circa 7.07 % di acidi grassi saturi (SFA), principalmente acido palmitico 16:0 (3.73 %) e acido stearico 18:0 (2.39 %), 17.61 % di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) (principalmente acido oleico 18:1 *n*-9 e gondoico 20:1, 17 % e 0.40 %, rispettivamente), e 74.5 % di acidi grassi polinsaturi (PUFA), costituiti principalmente dall'acido linoleico (18:2 *n*-6) e acido α -linolenico (18:3 *n*-3), che rappresentavano, rispettivamente, il 54.66 % e il 19.83 % del contenuto di acidi grassi (**Tabella 4**). Gli acidi laurico (12:0) e miristico (14:0) erano presenti in tracce nell'olio rispetto agli altri acidi grassi. Degli acidi grassi più rappresentativi sono state determinate le concentrazioni espresse come frazione in massa: 18:2 *n*-6 (400 ± 13) mg/g di peso secco, 18:3 *n*-3 (177 ± 7) mg/g e 18:1 *n*-9 (113 ± 9) mg/g (**Tabella 5**).
- L'estratto ottenuto utilizzando *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcs, ha mostrato profili chimici praticamente identici a quelli ottenuti mediante SFE[300:40] nonostante le diverse caratteristiche delle tecniche estrattive e dei solventi utilizzati, dal punto di vista chimico e di salubrità.
- Per la valutazione dei TAG è stato utilizzato una modalità cromatografica (HPLC-ELSD) che ha permesso di separare i TAG in base al numero di carbonio equivalente ECN e TAG contenenti acidi grassi con lo stesso ECN co-eluito (Rosa et al., 2019, 2017). Nella **Tabella 6** sono riportati i principali TAG presenti nell'olio di semi di *R. canina* ottenuto mediante SFE[300:40]: trilinoleina (LLL/OLLn, 38 %), dilinoleina (LLLn 23.9 %, OLL/PLL, 20.1 %) e (LnLLn, 7.1 %). La **Tabella 6** mostra anche alcuni dei possibili componenti minori dei TAG. Gli oli di semi ottenuti per estrazione col solvente *n*-esano hanno mostrato

un contenuto di TAG simile a quelli ottenuti con SFE[300:40] nonostante quest'ultima estrazione sia stata condotta su una matrice precedentemente sottoposta ad estrazione in condizioni più blande, SFE[90:40] (**Tabella 6**). Questa constatazione conferma che l'ottenimento degli oli fissi mediante SFE è significativa solo ad alte pressioni.

Per tutti gli estratti ottenuti mediante SFE[300:40], *n*-esano con apparato Soxhlet e macerazione è stata eseguita l'analisi quantitativa dei polifenoli totali (**Tabella 7**). I risultati mostrano un range che varia da 16.0 mg GAE/g secco a 144.0 mg GAE/g secco. Tra questi gli estratti ottenuti per macerazione in etanolo e metanolo possiedono la concentrazione di polifenoli maggiore, mentre il campione SFE[300:40]Rcs presenta il minor valore.

I risultati sull'attività biologica ottenuta attraverso i test: antimicrobici, antiossidanti e inibitori della XO sono descritti nel seguito.

- I dati sperimentali ottenuti con il saggio ABTS mostrano che gli estratti possiedono una capacità antiossidante con un range che varia da EC₅₀ di 0.025 mg/mL a 0.337 mg/mL. L'estratto etanolicò è quello con una maggiore attività antiossidante attribuibile al maggior contenuto di polifenoli (**Tabella 7**).
- Come mostrato in **Tabella 7** gli estratti alcolici sono quelli che nel complesso possiedono una più alta attività inibitoria nei confronti dell'enzima XO, con il picco massimo rappresentato dai valori di inibizione superiore al 50 % dell'estratto dei semi ottenuto mediante macerazione in etanolo. Gli estratti che hanno mostrato assenza di inibizione sono stati i macerati acquosi.
- Il test di sensibilità microbica di Kirby-Bauer ha mostrato che solamente l'estratto SxRcs manifestava un alone di inibizione di 14 mm verso *S. aureus* (MRSA) ATCC BAA-811. Tutti gli altri estratti ottenuti dai semi mostrano assenza di alone di inibizione verso i seguenti patogeni: *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 7075, *C. albicans* BF1, *S. aureus* (MRSA) ATCC BAA-811 e *S. pyogenes* NC4.

3.1.2 Estratti di polpa

3.1.2.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40]

Anche in questo caso l'estrazione SFE[90:40] ha permesso di ottenere un estratto eterogeneo costituito da una fase acquosa, SFE[90:40]RcpW, ed una oleosa, SFE[90:40]RcpO, che sono

state separate. Le rese sono state di 0.972 % (w/w) per l'estratto acquoso e di 0.084 % (w/w) per l'olio, dopo 4 h di estrazione. L'analisi GC-MS dei due campioni non ha permesso di identificare nessun composto. L'analisi antimicrobica degli estratti eseguita mediante il metodo del Kirby-Bauer, sul ceppo *P. aeruginosa* ATCC 15442 ha mostrato assenza di attività antibatterica. Inoltre, i risultati del su citato test sul ceppo fungino *C. albicans* BF1 con l'estratto oleoso mostrano assenza di attività antimicotica.

3.1.2.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in *n*-esano con apparato Soxhlet, macerazione e HD

Sulle stesse matrici esauste di polpa di *R. canina* sottoposte ad estrazione SFE[90:40] è stata eseguita una prova ad alta pressione SFE[300:40]. La resa in olio (dopo 4 h di estrazione) è stata di 0.3 % (w/w) e per confronto si è eseguita un' estrazione con *n*-esano in apparato Soxhlet (6 h di estrazione) ottenendo una resa in olio di 0.76 % (w/w). Mediante analisi in HPLC-DAD e GC-FID sono state ottenuti i seguenti risultati quali-quantitative relativi agli acidi grassi presenti in queste due tipologie di campioni.

- Il campione SFE[300:40]Rcp ha mostrato una composizione caratterizzata da un livello di 18:3 *n*-3 pari al 28.37 % degli acidi grassi totali (**Tabella 8**). Gli acidi grassi principali identificati e quantificati sono: 18:3 *n*-3, (121 ± 3) mg/g di peso secco; 18:2 *n*-6, (102 ± 3) mg/g e 18:1 *n*-9, (50 ± 3) mg/g (**Tabella 9**).
- Gli estratti di polpa ottenuti per estrazione in *n*-esano con apparato Soxhlet hanno mostrato profili chimici molto simili, anche se non identici, a quelli ottenuti mediante SFE[300:40] (**Tabella 8 e 9**). Riguardo alla composizione percentuale in acidi grassi, la maggiore discrepanza è stata ottenuta per l'acido linoleico, (32.66 vs. 26.74) % nell'estratto SxRcp. SFE[300:40], rispettivamente.

Per tutti gli estratti ottenuti mediante SFE[300:40], *n*-esano con apparato Soxhlet, macerazione e HD è stata eseguita l'analisi quantitativa dei polifenoli totali (**Tabella 10**). I risultati mostrano un range di variabilità tra 17.7 mg GAE/g secco e 97.5 mg GAE/g secco. L'estratto ottenuto per macerazione in acqua è quello che ha la concentrazione di polifenoli maggiore, seguito da quello metanolico, mentre gli estratti SFE[300:40] presentano il minor contenuto di polifenoli totali. I test antimicrobici, antiossidanti e inibitori della XO hanno mostrato le seguenti informazioni biologiche.

- I risultati ottenuti con il saggio ABTS mostrano che gli estratti possiedono una capacità antiossidante con un range che varia da EC₅₀ di 0.05 mg/mL a 0.241

mg/mL Il macerato acquoso è quello che ha mostrato una maggiore attività antiossidante rispetto agli altri estratti di polpa. (**Tabella 10**).

- Gli estratti alcolici sono quelli che nel complesso possiedono una più alta attività inibitoria nei confronti dell'enzima XO, con il picco massimo rappresentato dai valori di inibizione fino al 24 % dell'estratto in etanolo. Mentre l'estratto SFE[300:40] è quello con la più bassa percentuale di inibizione.
- Il test di Kirby-Bauer rivela che solamente l'estratto acquoso, M_{H2O}Rcp, possiede attività antimicrobica verso *E. coli* ATCC 7075 e *S. pyogenes* NC4 con (14 e 15) mm di diametro di inibizione, rispettivamente. Tutti gli altri estratti indicati in **Tabella 10** mostrano assenza di alone di inibizione verso i seguenti ceppi patogeni: *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 7075, *C. albicans* BF1, *S. aureus* (MRSA) ATCC BAA-811 e *S. pyogenes* NC4.

L'idrodistillazione mediante apparato Clevenger ha permesso di isolare un'acqua aromatica, campione HDRcp, i cui test antimicrobici con il metodo del Kirby-Bauer, non hanno rivelato aloni di inibizione in colture batteriche di *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 7075, *C. albicans* BF1, *S. aureus* (MRSA) ATCC BAA-811 e *S. pyogenes* NC4.

L'estrazione con *n*-esano è la tecnica che ha permesso di ottenere il più elevato quantitativo di componente lipidica. L'estrazione supercritica ad alta pressione ha conseguito una buona percentuale di recupero, calcolabile confrontando i dati (**Tabella 5 e 9**) relativi alla concentrazione dei singoli acidi grassi nei due estratti a confronto, il cui valore medio è pari al 84.1 % per gli estratti a base di semi e al 71.9 %, per la polpa di frutti della specie indagata, *R. canina*. Si ritiene che, relativamente all'estrazione dei trigliceridi, l'estrazione preliminare condotta sulla matrice a 90 bar e 40 °C non abbia influenzato il valore della resa dell'estrazione successiva condotta a più alti valori di pressione, 300 bar. Infatti, è noto dalla letteratura che il completo recupero dei lipidi da matrici oleaginose viene ottenuto lavorando, solitamente, a pressioni superiori ai 350 bar (Reverchon et al. 2006). Tali condizioni non sono applicabili all'impianto di estrazione supercritico utilizzato in questo studio.

L'efficacia del *n*-esano come mezzo estraente di oli fissi, ampiamente prevedibile, giustifica il suo largo impiego nelle industrie di produzione e trasformazione alimentare. In Italia il suo uso è regolamentato dal DM del 4 agosto 2011, n. 158 – che fissa una concentrazione massima di 1 mg/kg negli oli alimentari, nei grassi e nel burro di cacao – che ha recepito la direttiva 2010/59/UE della Commissione del 26 agosto 2010 che modifica la direttiva 2009/32/CE del

Parlamento europeo riguardanti i solventi da estrazione impiegati nella preparazione dei prodotti alimentari e dei loro ingredienti. In quel decreto sono elencati i solventi utilizzabili per tutti gli usi in ambito alimentare: propano, butano, acetato di etile, etanolo, anidride carbonica, acetone (non utilizzabile nella raffinazione dell'olio di sansa di oliva) e protossido d'azoto; per i quali non sono previsti limiti massimi di residuo nel prodotto alimentare o nel suo ingrediente.

Con riferimento ai lavori presenti in letteratura riguardanti estratti di *Rosa canina* ottenuti mediante diossido di carbonio in fase supercritica (Taneva et al. 2017; Machmudah et al. 2007; Szentmihályi et al. 2002) è interessante sottolineare alcuni aspetti.

In Szentmihályi et al. 2002, vengono riportati i risultati relativi all'analisi degli acidi grassi e dei coloranti contenuti nell'olio ottenuto mediante CO₂-SFE a 250 bar, 35 °C per la durata di 80 min. Gli autori non specificano se l'olio sia stato recuperato assieme ad una soluzione acquosa. Gli estratti ottenuti non sono stati testati come antimicrobici, né vengono indicati usi di estratti come antimicrobici.

Nel lavoro di Taneva et al. 2017 vengono riportate le quantità di tocoferolo e carotenoidi e le percentuali di acidi grassi determinate su estratti ottenuti mediante estrazione con esano o con CO₂ supercritico a (350 e 450) bar. Mediante CO₂-SFE gli autori ottengono una frazione oleosa ed una frazione acquosa che scelgono però di buttare via senza sottoporla ad indagine chimica e biologica. Anche in questo caso non vengono indicati usi degli estratti ottenuti, né vengono indicati usi di estratti come antimicrobici.

La scelta di non considerare la frazione acquosa è ben spiegata in un lavoro di Rebolleda et al. 2012 dove se ne consiglia l'allontanamento e se ne sconsiglia l'utilizzo in quanto la presenza d'acqua in un estratto lipidico favorisce il processo di irrancidimento e l'ossidazione degli acidi grassi.

È evidente quindi, che aver analizzato e testato una frazione acquosa considerata nella letteratura presente come un sottoprodotto di estrazione indesiderato, abbia permesso di ottenere dei risultati microbiologici molto promettenti per quanto riguarda il controllo e l'eliminazione di batteri Gram positivi e Gram negativi, patogeni multiresistenti agli antibiotici, isolati clinici di provenienza nosocomiale ed isolati clinici multi-resistenti agli azoli. La valutazione dei singoli componenti dell'estratto è ancora in fase di sperimentazione per poter designare il responsabile dell'attività antimicrobica. Pertanto, ancora non si può ricondurre tale attività al responsabile che potrebbe essere un singolo composto o l'intero fitocomplesso. Sulla base di ciò che è stato caratterizzato e confrontato con la letteratura corrente le molecole che potrebbero essere responsabili dell'attività antimicrobica sono

diverse. Gli acidi grassi oleico, linoleico ed esteri metilici potrebbero essere i responsabili della elevatissima attività antimicrobica ad ampio spettro, dell'estratto SFE[90:40]RcsW, in quanto, come riporta Agoramorthy et al. 2007, le molecole summenzionate sono sia antibatteriche che antimicotiche; il limonene noto per la sua attività antimicrobica – sia da composto singolo che in sinergia con altre molecole – in particolare verso il ceppo *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Han et al. 2021; Vuuren et al. 2007; Rancic et al. 2003); la vanillina è citata per la sua attività antimicotica in Boonchird et al. 1982; il naftalene noto per le sue potenzialità antimicrobiche (Makar et al. 2019; Rokade et al. 2009).

Dal confronto con la letteratura, con riguardo agli estratti isolati da semi e polpa di *Rosa canina* mediante tecniche tradizionali, si evince che i dati da noi ottenuti sostanzialmente concordano con quanto emerso in altri studi (Nadpal et al. 2016; Ilyasoglu et al. 2014; Montazeri et al. 2011; Kazaz et al. 2009; Ercisli 2007; Demir et al. 2001). Un'attività antiossidante variabile legata al contenuto di composti fenolici – e un olio ricco in acidi grassi mono/polinsaturi –principalmente linoleico, α -linolenico e oleico. Le differenze riscontrate (in termini quantitativi) nel contenuto fenolico e di acidi grassi può essere dovuta a tre fattori principali: genetici, stadio vegetativo, e fattori ambientali (es. suolo e clima) di crescita della *Rosa canina*.

3.1.3 Tabelle e figure dei risultati relativi alla *R. canina*

Tabella 1. Composizione percentuale dei costituenti organici dell'estratto acquoso SFE[90:40] di semi di *R. canina*, SFE[90:40]RcsW, ottenuta mediante GC/MS, su campioni preparati col metodo I. Tempi di ritenzione, t_r , indice di Kovats sperimentale, $I_{K(\text{exp})}$, e di letteratura, $I_{K(\text{let})}$ (Adams R. P. 2007), nome, formula bruta e numero del Chemical Abstract System, CASNR, del composto identificato

t_r / min	$I_{K(\text{exp})}$	$I_{K(\text{let})}$	Composto – formula bruta – CASNR	Composizione / %
33.4531	1680	1677	Apiolo - C ₁₂ H ₁₄ O ₄ CAS 523-80-8	1.1
41.8728	1926	1921	Metil palmitato - C ₁₇ H ₃₄ O ₂ CAS 112-39-0	7.5
44.0367	1993	1993	Etil palmitato - C ₁₈ H ₃₆ O ₂ CAS 628-97-7	0.7
47.1536	2095	2085	Metil linoleato C ₁₉ H ₃₄ O ₂ CAS 112-63-0	31.4
47.346	2101	2103	Metil oleato C ₁₉ H ₃₆ O ₂ CAS 112-62-9	25.1
48.0804	2127	2125	Metil stearato C ₁₉ H ₃₈ O ₂ CAS 112-61-8	3.6
48.7274	2149		NI	13.3
49.0815	2161	2159	Etil linoleato C ₂₀ H ₃₆ O ₂ CAS 544-35-4	4.7
49.2695	2168	2169	Etil linolenato - C ₂₀ H ₃₄ O ₂ CAS 1191-41-9	3.3
63.2804	2697	2700	<i>n</i> -Eptacosano - C ₂₇ H ₅₆ CAS 593-49-7	1.5
69.0290	2871		NI	1.2
69.8203	2891		NI	4.2
70.0432	2897	2900	Nonacosano - C ₂₉ H ₆₀ CAS 630-03-5	2.4

NI = Non identificato

Tabella 2. Composizione percentuale dei costituenti organici dell'estratto acquoso liofilizzato SFE[90:40] di semi di *R. canina*, SFE[90:40]RcsW, ottenuta mediante GC/MS su campioni preparati col metodo II. Tempi di ritenzione, t_r , indice di Kovats sperimentale, $I_{K(\text{exp})}$, e di letteratura, $I_{K(\text{let})}$ (Adams R. P. 2007) nome, formula bruta e numero del Chemical Abstract System, CASNR, del composto identificato

t_r / min	$I_{K(\text{exp})}$	$I_{K(\text{let})}$	Composto – formula bruta – CASNR	Composizione / %
8.305	1033	1029	Limonene - C ₁₀ H ₁₆ CAS 138-86-3	1.0
14.284	1183	1181	Naphtalene - C ₁₀ H ₈ CAS 91-20-3	1.6
23.246	1391	1394	Vanillina – C ₈ H ₈ O ₃ CAS 121-33-5	27.1
30.660	1575		NI	2.1
43.059	1922	1921	Metil palmitato - C ₁₇ H ₃₄ O ₂ CAS 112-39-0	1.2
44.334	1961	1960	Acido palmitico - C ₁₆ H ₃₂ O ₂ CAS 57-10-3	2.4
48.269	2086	2085	Metil linoleato - C ₁₉ H ₃₄ O ₂ CAS 112-63-0	8.1
48.414	2091		NI	2.6
48.494	2093	-	Metil oleato C ₁₉ H ₃₆ O ₂ CAS 112-62-9	3.7
49.744	2135	2133	Acido linoleico C ₁₈ H ₃₂ O ₂ CAS 60-33-3	25.2
49.920	2141	2142	Acido oleico C ₁₈ H ₃₄ O ₂ CAS 112-80-1	25.0

NI = Non identificato

Tabella 3. Minime concentrazioni inibenti (MIC) e battericide (MBC) dell'estratto ottenuto mediante SFE[90:40], SFE[90:40]RcsW, nei confronti di differenti ceppi microbici; la concentrazione rappresenta la % peso/volume (w/v) di estratto utilizzato in sospensione acquosa

Ceppo	MIC / % (w/v)	MBC / % (w/v)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC15442	3.12	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NC5	3.12	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA-811	3.12	3.12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 7075	3.12	12.5
<i>Streptococcus pyogenes</i> NC4	6.25	6.25
<i>Streptococcus mutans</i> CIP103220	6.25	6.25
<i>Candida albicans</i> BF1	6.25	6.25
<i>Candida krusei</i> BF2	1.56	6.25
<i>Candida glabrata</i> BF3	6.25	6.25

Tabella 4. Composizione di acidi grassi (% di acidi grassi totale) misurata mediante analisi GC-FID, degli estratti di semi dei frutti di *R. canina* ottenute mediante estrazione con SFE[300:40], e *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcs. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Acido grasso	SxRcs / %	SFE[300:40]Rcs / %
Laurico (12:0)	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Miristico (14:0)	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00
Palmitico (16:0)	3.88 ± 0.06	3.73 ± 0.08
Palmitoleico (16:1 <i>n</i> -7)	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Stearico (18:0)	2.52 ± 0.00	2.39 ± 0.07
Oleico (18:1 <i>n</i> -9)	16.83 ± 0.05	17.00 ± 0.06
Linoleico (18:2 <i>n</i> -6)	53.27 ± 0.07	54.66 ± 0.21
Linolenico (18:3 <i>n</i> -3)	19.75 ± 0.03	19.83 ± 0.19
Arachidonico (20:0)	0.92 ± 0.03	0.85 ± 0.08
Gondoico (20:1)	0.37 ± 0.03	0.40 ± 0.05
Σ SFA	7.44 ± 0.09	7.07 ± 0.22
Σ MUFA	17.41 ± 0.07	17.61 ± 0.10
Σ PUFA	73.02 ± 0.09	74.5 ± 0.4
Σ UFA	90.43 ± 0.17	92.1 ± 0.3

Tabella 5. Composizione di acidi grassi (espressa come mg/g di olio), determinata mediante analisi HPLC-DAD, di estratti di semi di *R. canina* ottenuti mediante estrazione SFE[300:40], SFE[300:40]Rcs e *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcs. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Acidi grassi	SxRcs / (mg/g)	SFE[300:40]Rcs / (mg/g)
Oleico (18:1 <i>n</i> -9)	133 ± 12	113 ± 9
Linoleico (18:2 <i>n</i> -6)	489 ± 47	400 ± 13
Linolenico (18:3 <i>n</i> -3)	207 ± 33	177 ± 7

Tabella 6. Composizione dei principali triacilgliceroli (espressi come % del valore totale), misurata mediante analisi HPLC-ELSD, degli estratti di semi di *R. canina* ottenuti mediante estrazione SFE[300:40], SFE[300:40]Rcs e *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcs; numero di carbonio equivalente, ECN. L, acido linoleico; acido Ln, linolenico; O, acido oleico; P, acido palmitico. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Triacilglicerolo	ECN	SxRcs / %	SFE[300:40]Rcs / %
LnLnLn	36	1.06 ± 0.40	0.93 ± 0.21
LnLLn	38	7.05 ± 0.04	7.1 ± 0.3
LLLn	40	23.4 ± 2.2	23.9 ± 1.1
LLL/OLLn	42	37 ± 4	38 ± 4
OLL/PLL	44	19.4 ± 0.7	20.1 ± 0.6
OOL/POL	46	5.4 ± 1.3	5.5 ± 1.2
POO/OOO	48	1.4 ± 1.2	1.0 ± 0.5
Altri	-	5 ± 4	3.3 ± 1.9

Tabella 7. Concentrazione fenoli totali, attività antiossidante e inibizione dell'enzima XO, I_{XO} , di estratti di semi di frutti di *R. canina* ottenuti mediante estrazione SFE[300:40], SFE[300:40]Rcs; *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcs; macerati in etanolo, $M_{EtOH}Rcs$; metanolo, $M_{MeOH}Rcs$ e acqua, $M_{H_2O}Rcs$. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Campione	(Fenoli totali $\pm \sigma$) / (mg GAE/g)	(EC₅₀ $\pm \sigma$) / (mg/mL)	(I_{XO} $\pm \sigma$) %
SFE[300:40]Rcs	16.0 \pm 1.6	0.337 \pm 0.012	5 \pm 7
SxRcs	NC	NA	12 \pm 4
$M_{EtOH}Rcs$	144 \pm 26	0.025 \pm 0.002	51.3 \pm 1.9
$M_{MeOH}Rcs$	121 \pm 20	0.028 \pm 0.007	37.9 \pm 0.6
$M_{H_2O}Rcs$	31.8 \pm 2.2	0.235 \pm 0.001	NA

NC = non quantificabile, NA = nessuna attività

Tabella 8. Composizione di acidi grassi (% di acidi grassi totale) misurata mediante analisi GC-FID, degli estratti di polpa di frutti di *R. canina* ottenuti mediante estrazione con SFE[300:40], SFE[300:40]Rcp e *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcp. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Acido grasso	SxRcp / %	SFE[300:40]Rcp / %
Laurico (12:0)	1.99 ± 0.04	1.7 ± 0.3
Miristico (14:0)	1.17 ± 0.09	1.28 ± 0.05
Palmitico (16:0)	14.15 ± 0.16	18.20 ± 0.11
Palmitoleico (16:1 <i>n</i> -7)	1.70 ± 0.09	2.01 ± 0.3
Stearico (18:0)	3.52 ± 0.01	3.9 ± 0.3
Oleico (18:1 <i>n</i> -9)	16.62 ± 0.04	15.72 ± 0.01
Linoleico (18:2 <i>n</i> -6)	32.66 ± 0.21	26.74 ± 0.23
Linolenico (18:3 <i>n</i> -3)	24.9 ± 0.3	28.37 ± 0.23
Arachidonico (20:0)	0.54 ± 0.01	0.65 ± 0.06
Gondoico (20:1)	0.20 ± 0.13	0.10 ± 0.02
Σ SFA	21.38 ± 0.03	25.8 ± 0.5
Σ MUFA	18.52 ± 0.3	17.8 ± 0.3
Σ PUFA	57.6 ± 0.5	55.1 ± 0.5
Σ UFA	76.12 ± 0.3	72.9 ± 0.7

Tabella 9. Composizione di acidi grassi (espressa come mg/g di olio), determinata mediante analisi HPLC-DAD, di estratti di polpa di frutti di *R. canina* ottenuti mediante estrazione SFE[300:40], SFE[300:40]Rcp e *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcp. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Acido grasso	SxRcp / (mg/g)	SFE[300:40]Rcp / (mg/g)
Oleico (18:1 <i>n</i> -9)	64.7 ± 1.0	50 ± 3
Linoleico (18:2 <i>n</i> -6)	142 ± 4	102 ± 3
Linolenico (18:3 <i>n</i> -3)	128 ± 4	121 ± 3

Tabella 10. Concentrazione fenoli totali, attività antiossidante, EC_{50} e inibizione dell'enzima XO, I_{XO} , di estratti di polpa di frutti di *R. canina* ottenuti mediante estrazione SFE[300:40], SFE[300:40]Rcp; *n*-esano in apparato Soxhlet, SxRcp; macerati in etanolo, $M_{ETOH}Rcp$; metanolo, $M_{MeOH}Rcp$; e acqua, $M_{H2O}Rcp$. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Campione	(Fenoli totali $\pm \sigma$) / (mg GAE/g)	($EC_{50} \pm \sigma$) / (mg/mL)	($I_{XO} \pm \sigma$) %
SFE[300:40]Rcp	17.7 \pm 1.5	0.241 \pm 0.022	2.9 \pm 2.6
SxRcp	NC	NA	6 \pm 4
$M_{ETOH}Rcp$	33 \pm 11	0.137 \pm 0.006	24 \pm 7
$M_{MeOH}Rcp$	42 \pm 18	0.132 \pm 0.003	15.2 \pm 0.7
$M_{H2O}Rcp$	97.5 \pm 2.0	0.05 \pm 0.002	9 \pm 8

NC = non quantificabile, NA = nessuna attività

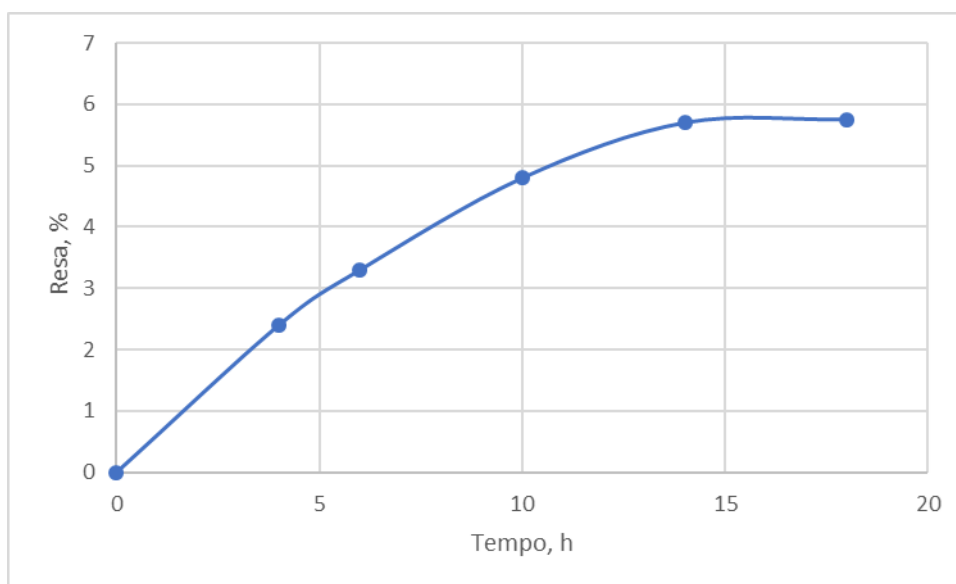


Figura 10. Resa % di estrazione dell'estratto SFE[90:40]RcsW

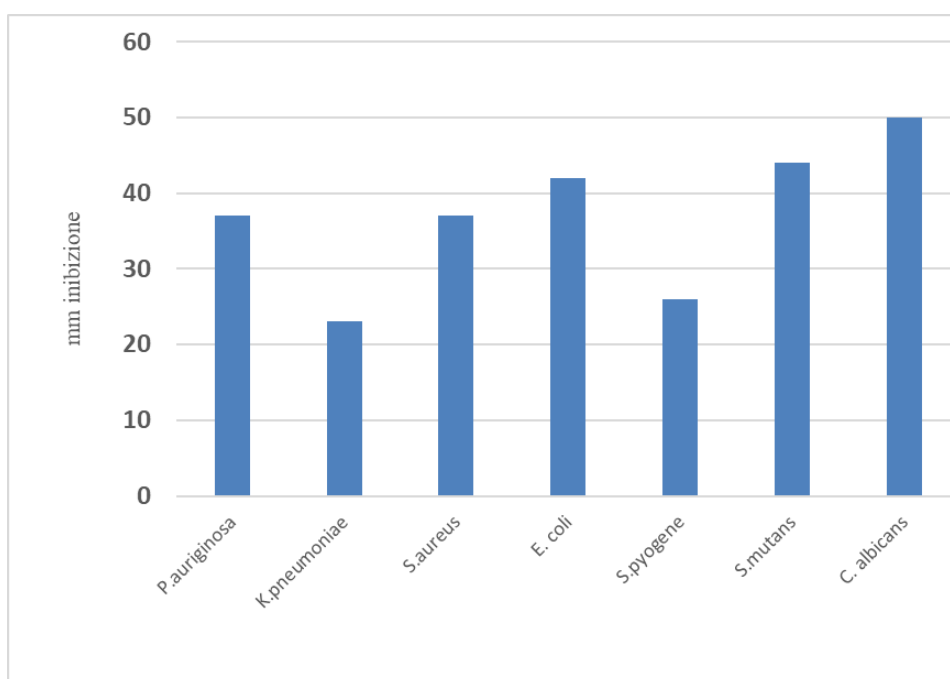


Figura 11. Diametro degli aloni di inibizione determinati dall'estratto SFE[90:40]RcsW verso i ceppi *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *S. mutans* e *C. albicans* con il test del Kirby-Bauer

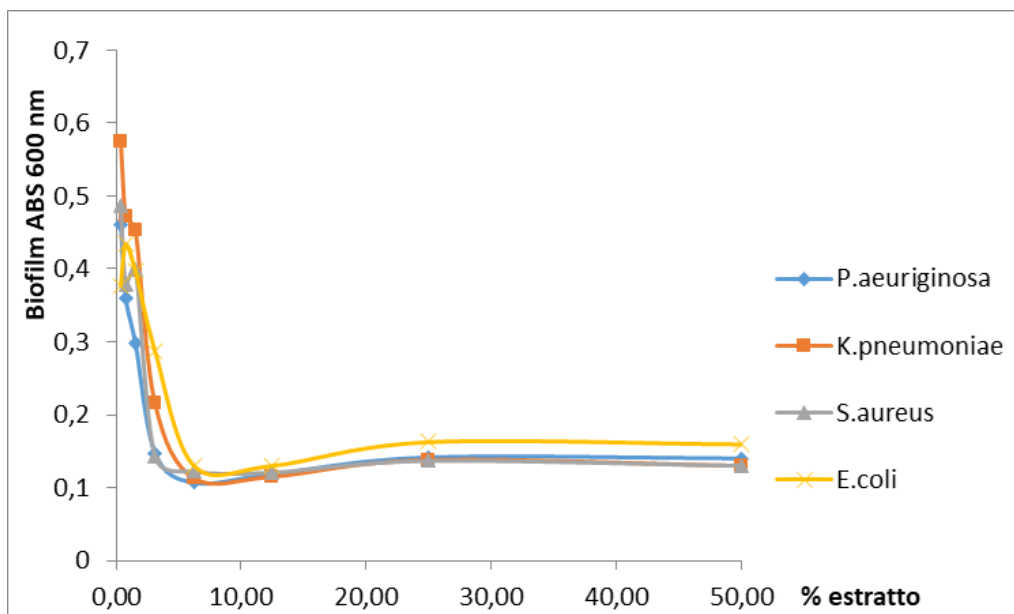


Figura 12. Inibizione nella formazione del biofilm per 4 specie batteriche, una Gram positiva (*S. aureus*) e tre Gram negative (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*); la MBIC è stata valutata su soluzioni acquose aventi una concentrazione di estratto SFE[90,40]RcsW pari al 6.25 % (w/v)

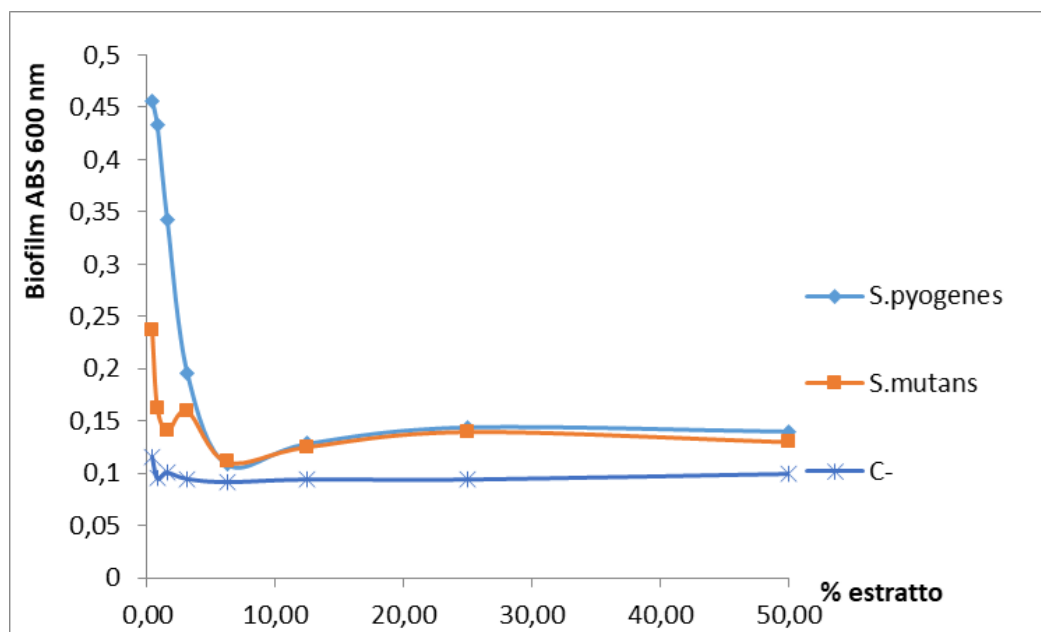


Figura 13. Inibizione del biofilm di *S. pyogenes* e *S. mutans*; la MBIC è stata valutata su soluzioni acquose aventi una concentrazione di estratto SFE[90,40]RcsW pari al 6.25 % (w/v), per entrambi i ceppi

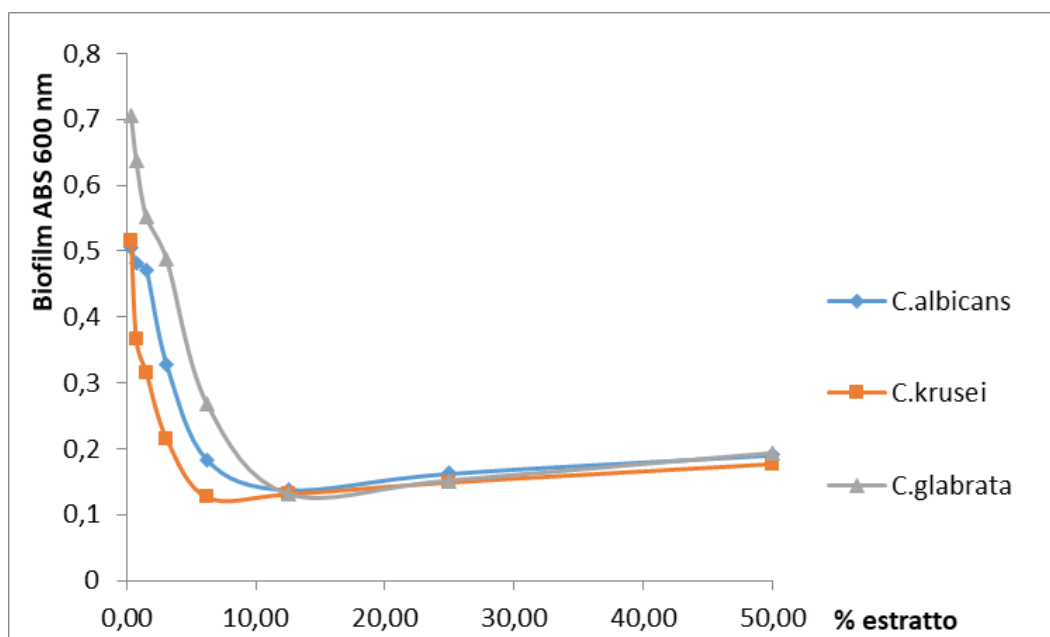


Figura 14. Inibizione del biofilm per tre specie di *Candida spp*; la MBIC è valutata su soluzioni acquose aventi una concentrazione di estratto SFE[90,40]RcsW pari al 12.5 % (w/v), per tutti i ceppi

3.2 *Rubus ulmifolius*

3.2.1 Estratti di foglie

3.2.1.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40]

L'estrazione SFE[90:40] ha permesso di ottenere un estratto eterogeneo costituito da una fase acquosa SFE[90:40]RufW ed una oleosa SFE[90:40]RufO le cui rese dopo 4 h di estrazione sono state (0.4 e 1.73) %, rispettivamente. L'analisi eseguita mediante GC-MS non ha evidenziato la presenza di composti volatili. Solamente la fase oleosa presentava alcuni alcani a lunga catena (cere cuticolari). L'analisi antimicrobica dell'estratto SFE[90:40]RufO eseguita mediante il metodo del Kirby-Bauer, sul patogeno orale *S.mutans* ha mostrato un alone di inibizione di 16 mm di diametro.

3.2.1.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in *n*-esano con apparato Soxhlet, macerazione e HD

I risultati riguardanti la caratterizzazione lipidica, eseguita mediante HPLC-DAD/ELSD, e microbiologica (Kirby-Bauer, MIC, MBC e MBIC), riportati in Ibba et al. 2021, degli estratti di foglie isolati mediante SFE[300:40] e solventi organici (*n*-esano, metanolo ed etanolo) (**Tabella 11**) sono di seguito illustrati.

- **L'analisi chimica** eseguita mediante HPLC-DAD/ELSD ha permesso di valutare i valori di concentrazione (espressi in mg/g di estratto secco) dei principali SFA, MUFA e PUFA (**Figura 15**). Tutti i campioni hanno mostrato risultati qualitativi simili, caratterizzati da una concentrazione compresa tra (25 e 36) % di SFA, principalmente acido palmitico (16:0) e acido stearico (18:0); dal (3 al 5) % di MUFA, acido oleico (18:1 *n*-9); e dal (60 al 70) % di PUFA, costituito dall'acido linoleico (18:2 *n*-6) e dall'acido α -linolenico (18:3 *n*-3). Il principale acido grasso di tutti gli estratti di foglie di *R. ulmifolius* era 18:3 *n*-3 presente in concentrazione pari a (185 \pm 16) mg/g, (64 \pm 18) mg/g, (8.05 \pm 0.09) mg/g e (53.98 \pm 0.02) mg/di peso secco negli estratti SFE[300:40], *n*-esano con apparato Soxhlet e macerati in metanolo ed etanolo, rispettivamente. L'estratto ottenuto mediante estrazione in SFE[300:40] è stato quello che ha mostrato la quantità totale di acidi grassi più alta (352.58 mg/g di peso secco). L'analisi di ciascun campione è stata eseguita in triplicato e tutti i dati sono stati espressi come valori medi \pm deviazioni standard (σ); (n = 3). Lettere diverse (^a, ^b, ^c) riportate su ciascun valore medio di

acido grasso rappresentano differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) tra gli estratti (**Figura 15**).

- L'analisi antimicrobica eseguita con il metodo del Kirby-Bauer ha mostrato un profilo di inibizione significativo nei confronti di *S. mutans* CIP103220 da parte di tutti i campioni, ad eccezione dell'estratto in etanolo, in quanto non ha dimostrato un'attività antimicrobica apprezzabile contro questo patogeno (**Figura 16**). I metodi delle diluizioni mostrano che solo l'estratto metanolico presenta interessanti valori di MIC e MBC, rispettivamente 6.25 % e 25 % (**Tabella 12**) e che l'inibizione completa del biofilm viene ottenuta con tutti gli estratti testati, per concentrazioni fino all'1.56 % (**Figura 17**).

I dati sperimentali ottenuti dalla quantificazione fenolica/flavonoidica e dalle analisi biologiche eseguite sull'estratto acquoso di foglie di *R. ulmifolius*, ottenuto per macerazione, sono stati i seguenti.

- Il contenuto fenolico totale (mg equivalenti di acido gallico per grammo di peso secco della pianta) è stato calcolato in 149 mg/g. Il contenuto totale di flavonoidi, misurato con il metodo del nitrato di alluminio, (equivalenti a mg di quercetina per grammo di peso secco della pianta) era di 60 mg/g. Pertanto, questo estratto secondo i su indicati dati sperimentali contiene una quantità considerevole di fenoli e flavonoidi totali.
- L'attività antiossidante è stata valutata mediante il saggio spettrofotometrico dell'ABTS^{•+} i cui risultati presentano una buona attività antiossidante esibendo un valore di $EC_{50} = (0.0087 \pm 0.0009)$ mg/mL paragonabile a quello del Trolox (0.0013 ± 0.0004) mg/mL. Si tratta di un risultato promettente che conferma le potenzialità applicative del genere *Rubus*.
- I risultati microbiologici del Kirby-Bauer mostrano che l'estratto possiede attività antimicrobica verso lo *S. intermedius* DSM 20573 (German Collection of Microorganism and cell culture) e *S. mutans* CIP103220 con diametri di inibizione rispettivamente di (14 e 18) mm. L'analisi antimicrobica-antibiofilm valutata in micropiastre mediante l'utilizzo di un mezzo liquido rifletteva parzialmente i risultati suggeriti dal Kirby-Bauer. I risultati evidenziano un'apprezzabile riduzione del biofilm fino alla concentrazione del formulato dello 0.025 % e un'attività di inibizione del biofilm completa è stata osservata fino allo 0.78 % e all'1.56 %. In *S. mutans* e *S. intermedius* il residuo del biofilm

era del (47 e 69) % rispetto al controllo positivo (100 %), con una riduzione effettiva di circa il (53 e il 31) % rispettivamente.

La seguente pubblicazione è in preparazione.

Ibba, A., Piras, A.; Era, B., Fais, A., Maxia, A., Fais, S., Orrù, G., Porcedda, S. Aqueous extract of *Rubus ulmifolius* Schott (Rosaceae) against pathogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*: an *in vitro* evaluation.

Mediante il processo di idrodistillazione, con apparato Clevenger, è stata ottenuta un'acqua aromatica le cui analisi GC/MS non hanno permesso di identificare nessun composto. Sono tutt'ora in corso analisi con altre tecniche analitiche. Le analisi microbiologiche, con il test del Kirby-Bauer, hanno mostrato assenza di aloni di inibizione verso i seguenti ceppi batterici testati: *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 7075, *S. aureus* ATCC BAA-811 (MRSA) e *S. pyogenes*.

3.2.1.3 Analisi mediante spettrometria di massa a bassa e alta risoluzione

Per gli estratti ottenuti dalle foglie del *R. ulmifolius* indicati in **Tabella 11** per mezzo della spettrometria di massa a bassa e alta risoluzione, mediante Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS) e la determinazione della massa molecolare esatta mediante lo spettrometro di massa OrbitrapElite, è stata eseguita l'analisi qualitativa dei composti lipidici, fenoli e carboidrati. In modalità ionizzazione negativa, eseguita in ESI-MS è stato possibile osservare nello spettro di massa della miscela, dei picchi con un rapporto m/z 255, 277, 279, 281 e 283 che corrispondono, rispettivamente, all'acido palmitico, acido linolenico, acido linoleico, acido oleico e acido stearico (**Tabella 13**). La determinazione della massa sperimentale esatta ha confermato la presenza di tutti gli acidi grassi saturati. L'estratto metanolico è stato quello che ha mostrato la maggior varietà di composti fenolici indicati in **Tabella 14**, tra cui l'acido ferulico, quinnico, gallico, caffeico e p-cumarico noti per le loro attività antimicrobiche (Bai et al. 2018; Stojković et al. 2013; Lou et al. 2012; Chanwitheesuk et al. 2007; Ou et al. 2004).

I carboidrati, individuati in modalità di ionizzazione positiva, sono stati il glucosio, un disaccaride e amminoglucosio. Solo gli estratti alcolici contenevano tutti e tre i carboidrati. A titolo d'esempio la **Figura 18** mostra lo spettro ad alta risoluzione in cui i picchi evidenziati

203, 365 e 425 individuano rispettivamente il glucosio, un disaccaride e amimnoglucosio negli estratti metanolici.

3.2.2 Estratti dei frutti

3.2.2.1 Estratti ottenuti mediante SFE[90:40]

Anche l'estrazione SFE[90:40] ha permesso di ottenere un estratto eterogeneo costituito da una fase acquosa SFE[90:40]RupW ed una oleosa SFE[90:40]RupO le cui rese dopo 4 h di estrazione sono state 0.14 e 0.16 %, rispettivamente. L'analisi eseguita mediante GC-MS non ha evidenziato la presenza di composti volatili. Solamente la fase oleosa presentava alcuni alcani a lunga catena (cere cuticolari). L'analisi antimicrobica dell'estratto SFE[90:40]RupO eseguita mediante il metodo del Kirby-Bauer, sui ceppi *S. mutans* CIP103220 e *S. aureus* (MRSA) ATCC BAA-811 ha mostrato aloni di inibizione di (19 e 12) mm di diametro, rispettivamente.

3.2.2.2 Estratti ottenuti mediante SFE[300:40], in *n*-esano con apparato Soxhlet e macerazione

I risultati riguardanti la caratterizzazione lipidica e microbiologica (Kirby-Bauer), di diverse tipologie di estratti di frutti di *R. ulmifolius*, sono riportati nel seguito.

- I risultati delle analisi sui lipidi, eseguite mediante HPLC-DAD/ELSD, (**Tabella. 15**), mostrano valori di concentrazione (espressi come mg/g di estratto secco) dei principali SFA, MUFA e PUFA. La resa in olio espressa in % è indicata in **Tabella 16**. Gli estratti in *n*-esano e SFE[300:40] sono quelli che presentano il maggior contenuto di SFA, MUFA e PUFA. Nel dettaglio l'acido palmitico (16:0), oleico (18:1 *n*-9), linoleico (18:2 *n*-6) e linolenico (18:3 *n*-3) con una media rispettivamente di (51 ± 8) mg/g, (223.9 ± 1.0) mg/g, (407 ± 23) mg/g e (116.8 ± 1.7) mg/g erano maggiormente presenti nell'estratto in *n*-esano. Mentre l'acido stearico (18:0) con media (40 ± 4) mg/g presente in SFE[300:40] si è presentato con un contenuto leggermente superiore rispetto all'estratto in *n*-esano. Pertanto, quest'ultimo ha mostrato la quantità totale di acidi più alta (835.90 mg/g di peso secco). Questi dati sperimentali rivelano che gli estratti SFE[300:40] e in *n*-esano possiedono un buon contenuto dell'acido grasso essenziale linoleico.
- L'attività biologica valutata in modo preliminare con il metodo del Kirby-Bauer verso i ceppi *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 7075, *S. aureus* (MRSA) ATCC BAA-811 e *S. mutans* CIP103220 ha mostrato che solo l'estratto metanolico possedeva una lieve attività

antimicrobica verso lo *S. mutans* CIP103220 (con un alone di inibizione di 11 mm) e nessuna formazione di alone verso gli altri patogeni. Tutti gli altri campioni non sono risultati attivi con il test del Kirby-Bauer

3.2.2.3 Analisi mediante spettrometria di massa a bassa e alta risoluzione

L'analisi qualitativa degli acidi grassi liberi, composti fenolici e carboidrati degli estratti dei frutti del *R. ulmifolius* indicati in **Tabella 16** è avvenuta per mezzo dell'utilizzo Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS) e la massa molecolare esatta determinata sperimentalmente mediante lo spettrometro di massa OrbitrapElite, Dall'analisi sono risultati presenti tutti gli acidi grassi indicati in **Tabella 13** ad eccezione dell'acido linolenico assente nell'estratto metanolico. Tra i composti fenolici indicati in **Tabella 14** solo l'acido gallico ed ellagico erano presenti nell'estratto metanolico, mentre l'acido quinnico e l'acido 3-O-caffeilchinico nell'estratto SFE[300:40]. I carboidrati, individuati in modalità di ionizzazione positiva, sono stati il glucosio, un disaccaride e amminoglucosio. Solo l'estratto in *n*-esano presentava tutti e tre i carboidrati, mentre erano assenti negli estratti etanolici e in SFE[90:40].

Gli acidi grassi liberi palmitico, oleico, linoleico e linolenico, già noti in letteratura per le loro potenzialità antimicrobiche verso i patogeni del cavo orale (Choi et al. 2013), individuati negli estratti di foglie del *R. ulmifolius*, etichettati SFE[90;40]RufO, SFE[300:40]Ruf, SxRuf, M_{MeOH}Ruf, e [90:40]RupO dei frutti, potrebbero essere implicati nell'attività antibatterica verso lo *S. mutans*

La grande varietà di composti fenolici dell'estratto metanolico delle foglie, potrebbe aver contribuito a determinare la sua maggiore attività antibatterica, rispetto agli altri estratti. Infatti erano presenti l'acido ferulico, quinnico, gallico, caffeico e p-cumarico noti per le loro attività antimicrobiche (Bai et al. 2018; Stojković et al. 2013; Lou et al. 2012; Chanwitheesuk et al 2007; Ou et al. 2004).

Anche l'estratto ottenuto per macerazione in acqua dalle foglie del *R. ulmifolius* ha mostrato un interessante profilo di inibizione nei confronti dello streptococco orale. Questi risultati potrebbero essere correlati al profilo fenolico e flavonoico dell'estratto, infatti i dati sono in accordo con studi precedenti che collegano il profilo antibatterico di *R. ulmifolius* a composti fenolici, quali l'acido ellagico (Tabarki et al. 2017), acido gallico, acido ferulico, tiliroside (Flamini et al. 2002; Panizzi et al. 2002).

I risultati trovati sono in perfetto accordo con quanto presente nella letteratura sul *R. ulmifolius*.

Nel lavoro di Ali et. al 2017 si conferma che estratti metanolici di parti aeree del *R. ulmifolius* contengono sostanze fitochimiche come flavonoidi e tannini e che hanno una significativa attività antiossidante.

In un lavoro del 2013, gli acidi grassi più rappresentati presenti nell'olio estratto dai frutti di diverse specie di *Rubus* erano gli acidi linoleico, oleico e linolenico; mentre gli estratti metanolici sono stati analizzati per il loro contenuto fenolico totale e per le capacità antiossidanti. Questi effetti sono stati correlati al contenuto fenolico (Fazio et al. 2013).

Parti aeree di alcune specie di *Rubus* che contano flavonoidi (quercetina, kaempferolo, acido caffeico, acido clorogenico), acidi grassi saturi o insaturi (Tzouwara-Karayanni et al. 1981), hanno mostrato un'elevata attività antifungina (McCutcheon et al. 1994).

È stato anche riportato che estratti metanolici di specie strettamente imparentate di *R. ulmifolius* Schott hanno esibito proprietà antimicrobiche su batteri e funghi (Rauha et al. 2000; McCutcheon et al. 1994). È stata segnalata l'attività antimicrobica degli estratti di *R. ulmifolius* di polarità crescente e l'estratto metanolico ha mostrato una vasta gamma di attività contro batteri Gram+ e Gram- e lieviti, mentre gli estratti di *n*-esano, cloroformio, cloroformio/metanolo erano meno attivi. L'attività massima è stata esercitata da frazioni fenoliche e tanniniche (Panizzi et al. 2002; McCutcheon et al. 1994)

Nonostante la letteratura riporti le diverse ed interessanti proprietà biologiche e la presenza di molecole bioattive della specie *R. ulmifolius* ad oggi è ancora poco studiata. Pertanto, l'individuazione delle molecole ad attività biologica, in particolare quelle ad attività antimicrobica di questa specie, necessita di ulteriori approfondimenti.

3.2.3 Tabelle e figure dei risultati relativi al *R. ulmifolius*

Tabella 11. Quantità di estratti ottenuti (espresse in massa, m / g) e rese di estrazione (%), a partire dalle foglie di *R. ulmifolius*, relative a diversi metodi: SFE[90:40], SFE[90:40]RufO, SFE[300:40], SFE[300:40]Ruf, *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRuf, macerazione con metanolo, $M_{MeOH}Ruf$ o etanolo, $M_{EtOH}Ruf$

Campione	m /g	Resa / %
SFE[90:40]RufO	2.4	1.7
SFE[300:40]Ruf	1.1	0.8
SxRuf	0.1	1.1
MMeOHRuf	1.5	14.6
MEtOHRuf	0.3	3.5

Tabella 12. Valori di MIC, MBC e MBIC osservati in *S. mutans* con estratti di foglie di *R. ulmifolius* ottenuti mediante SFE[300:40], SFE[300:40]Ruf, *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRuf e macerazione con metanolo, $M_{MeOH}Ruf$

Ceppo	SFE[300:40]Ruf			SxRuf			$M_{MeOH}Ruf$		
	MIC	MBC % w/v	MBIC	MIC	MBC % w/v	MBIC	MIC	MBC % w/v	MBIC
<i>S. mutans</i> CIP103220	>50	>50	1.56	>50	>50	1.56	6.25	25	1.56

Tabella 13. Massa esatta teorica degli acidi grassi identificati mediante spettrometria a bassa risoluzione con ESI-MS, rapporto m/z dello ione, formula bruta del composto deprotonato, [M-H]⁻, formula molecolare, M, nei campioni mediante SFE[90:40], SFE[90:40]RufO e SFE[90:40]RupO, SFE[300:40], SFE[300:40]Ruf e SFE[300:40]Rup, *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRuf e SxRup macerazione con metanolo, M_{MeOH}Ruf e M_{MeOH}Rup o etanolo, M_{EtOH}Ruf e , M_{MeOH}Rup

Massa esatta teorica	m/z ESI-MS	[M-H] ⁻	M	Acidi grassi
255.2324	255	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Acido palmitico
277.2167	277	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Acido linolenico
279.2324	279	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Acido linoleico
281.2480	281	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Acido oleico

Errore ppm < 3

Tabella 14. Composti fenolici dell'estratto metanolico di foglie di *R. ulmifolius*, $M_{MeOH}Ruf$, identificati mediante spettrometria a bassa risoluzione (ESI-MS) e spettrometria ad alta risoluzione

Composti fenolici	Formula molecolare
Acido p- idrossibenzoico	$C_7H_6O_3$
Acido protocatecuico	$C_7H_6O_4$
Acido p-cumarico	$C_9H_8O_3$
Acido gallico	$C_7H_6O_5$
Acido quinnico	$C_7H_{12}O_6$
Acido caffeico	$C_9H_8O_4$
Acido ferulico	$C_{10}H_{10}O_4$
Acido ellagico	$C_{14}H_6O_4$
Acido 3-O-caffeilchinico	$C_{16}H_{18}O_9$
Metil 3-O-caffeilchinato	$C_{17}H_{20}O_9$
Acido triidrossicinnamico- glicoside	$C_{15}H_{18}O_{10}$
Acido ellagico -pentosio	$C_{19}H_{14}O_{12}$
Kaempferol glucouronide	$C_{21}H_{18}O_{13}$
Isoquercetina	$C_{21}H_{20}O_{12}$
Acido quercetina-7- O-glucuronico	$C_{21}H_{18}O_{13}$

Tabella 15. Composizione degli acidi grassi saturi e insaturi (espressa in mg/g di estratto oleoso), determinata mediante analisi HPLC-DAD, degli estratti ottenuti dai frutti liofilizzati di *Rubus ulmifolius* mediante estrazione SFE[300:40], SFE[300:40]Rup; *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRup; macerazione con etanolo, M_{EtOH}Rup; e metanolo, M_{MeOH}Rup. Le incertezze sono espresse dalla deviazione standard, σ

Acido grasso	SxRup / mg/g	SFE[300:40]Rup / mg/g	M_{EtOH}Rup / mg/g	M_{MeOH}Rup / mg/g
Palmitico (16:0)	51 ± 8	48 ± 9	1.59 ± 0.13	0.22 ± 0.03
Stearico (18:0)	37.5 ± 1.7	40 ± 4	1.27 ± 0.10	0.17 ± 0.02
Oleico (18:1 <i>n</i> -9)	223.9 ± 1.0	210 ± 6	7.1 ± 0.7	1.05 ± 0.08
Linoleico (18:2 <i>n</i> -6)	407 ± 23	386 ± 21	12.7 ± 1.0	1.73 ± 0.25
Linolenico (18:3 <i>n</i> -3)	116.8 ± 1.7	111.8 ± 2.5	3.7 ± 0.3	0.53 ± 0.09

Tabella 16. Quantità di estratti ottenuti (esprese in massa, *m* / g) e rese di estrazione (%), a partire dai frutti liofilizzati di *R. ulmifolius*, relative a diversi metodi: SFE[90:40], SFE[90:40]RupO, SFE[300:40], SFE[300:40]Rup, *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRup, macerazione con metanolo, M_{MeOH}Rup o etanolo, M_{EtOH}Rup

Campione	<i>m</i> / g	Resa %
SFE[90:40]RupO	0.4	0.2
SFE[300:40]Rup	8.6	3.1
SxRup	0.5	4.1
M _{MeOH} Rup	5.9	59.9
M _{EtOH} Rup	2.3	22.7

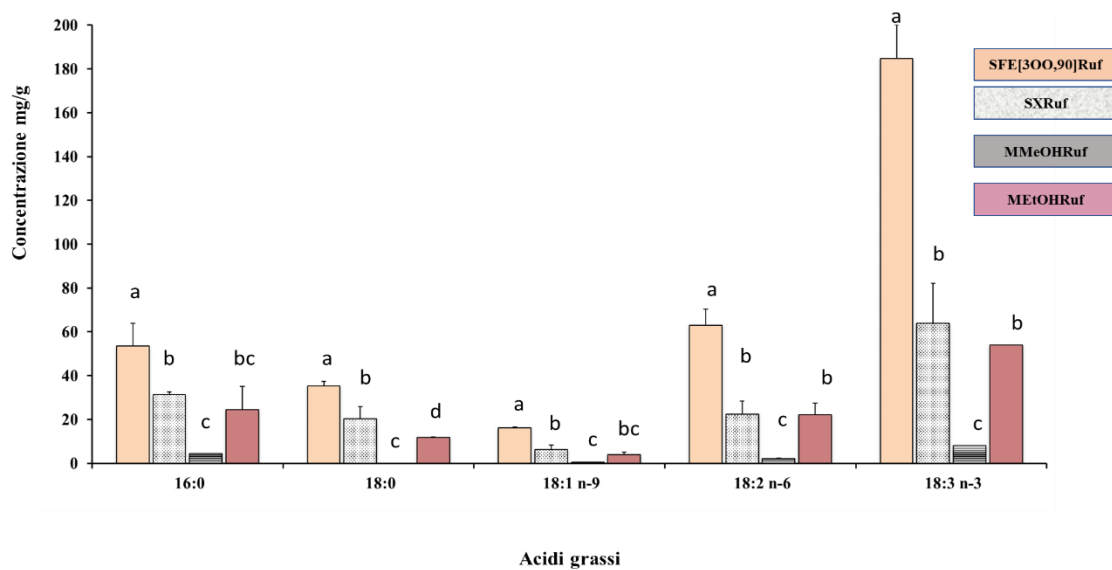


Figura 15. Concentrazione degli acidi grassi presenti negli estratti di *R. ulmifolius* ottenuti mediante SFE[300:40], SFE[300:40]Ruf, *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRuf, macerazione con metanolo, M_{MeOH}Ruf ed etanolo M_{EtOH}Ruf

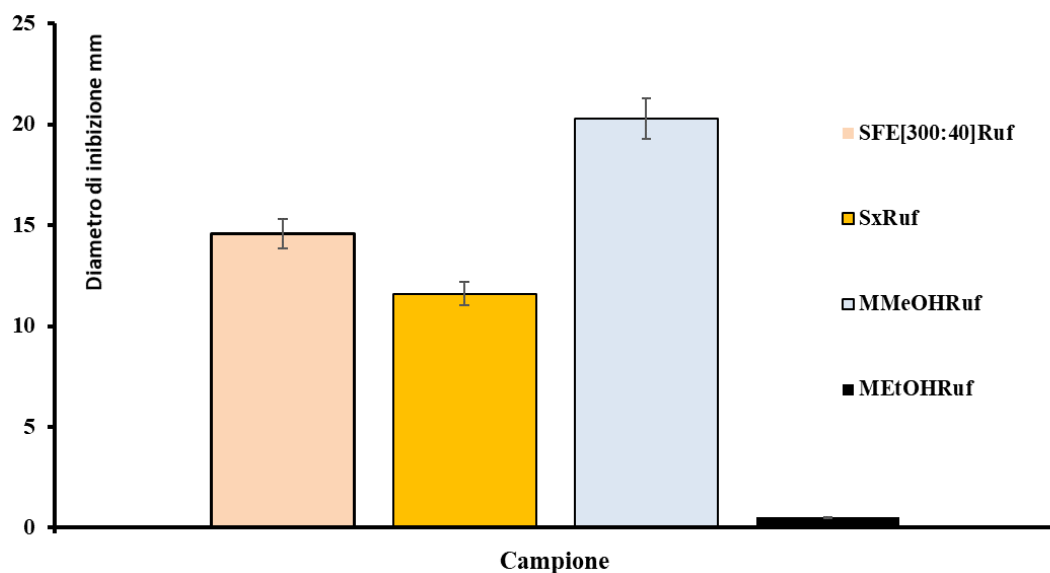


Figura 16. Test di sensibilità antimicrobica (Kirby Bauer). Estratti di *R. ulmifolius* ottenuti mediante SFE[300:40], SFE[300:40]Ruf; *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRuf; macerazione con metanolo, M_{MeOH}Ruf; o etanolo, M_{EtOH}Ruf

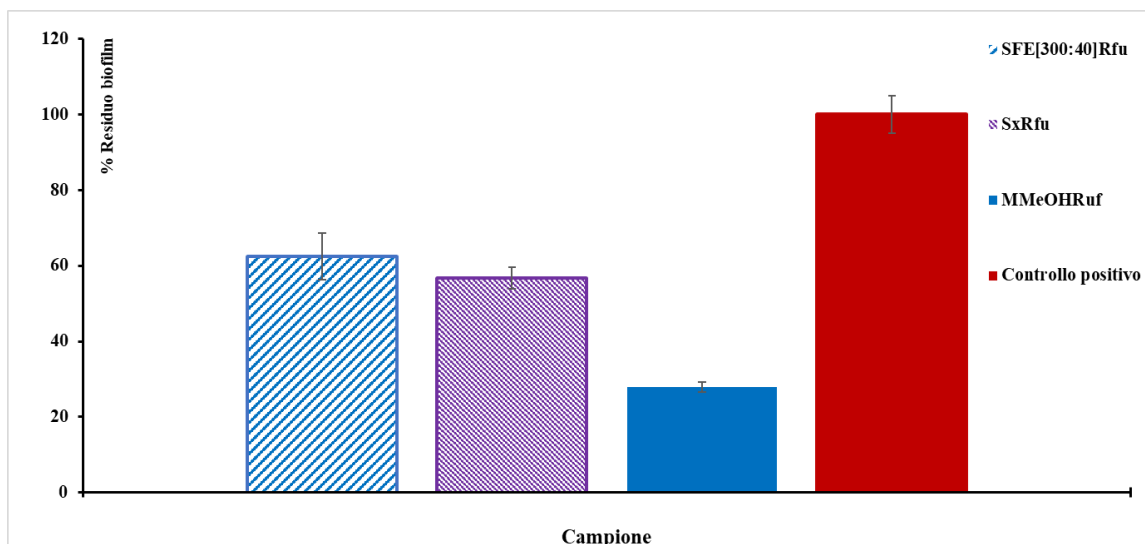


Figura 17. Residuo di Biofilm utilizzando lo 0.05 % di 3 diversi estratti di *R. ulmifolius*. SFE[300:40], SFE[300:40]Ruf; *n*-esano con apparato Soxhlet, SxRuf; macerazione con metanolo, M_{MeOH}Ruf

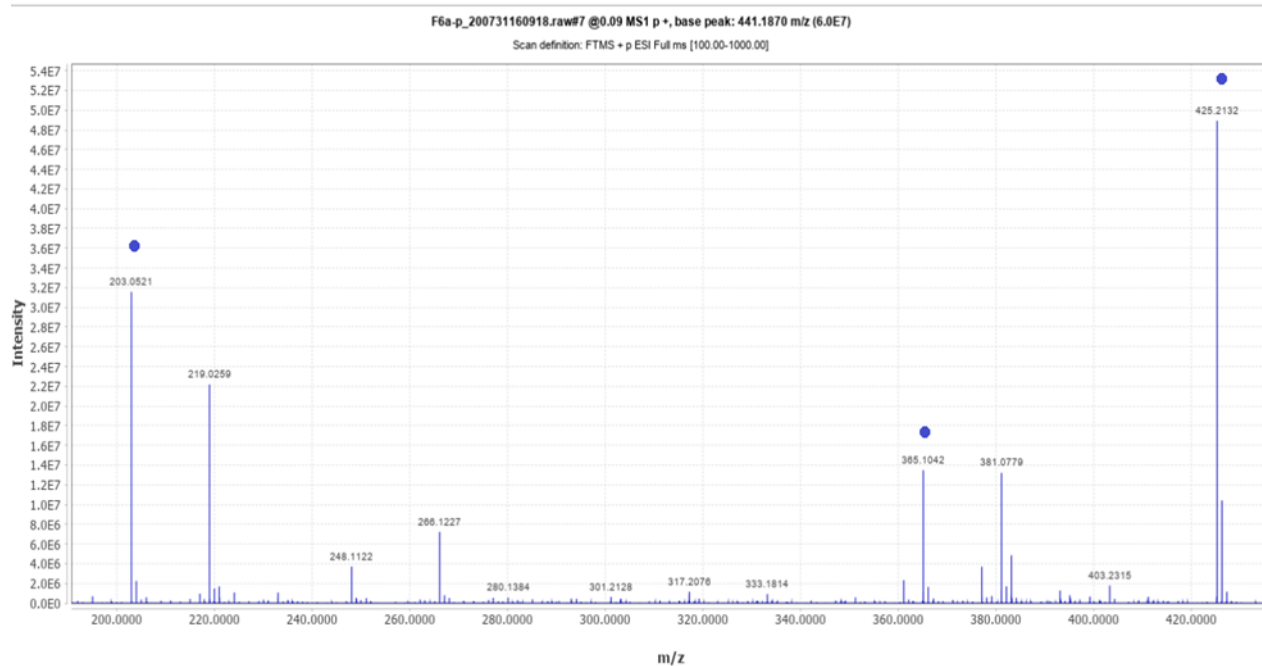


Figura 18. Spettro di massa ad alta risoluzione del glucosio, disaccaride e amminoglucosio presenti nell'estratto metanolico di foglie di *R. ulmifolius*, M_{MeOH}Ruf

CONCLUSIONI

Il lavoro di ricerca, svolto durante il triennio del dottorato, è stato principalmente finalizzato all'estrazione e caratterizzazione chimica di principi attivi, da piante appartenenti dalla famiglia delle Rosaceae, mediante diversi metodi di estrazione: SFE[90:40], SFE[300:40], HD, in *n*-esano con apparato Soxhlet e per macerazione con metanolo, etanolo e acqua.

Prioritariamente è stata condotta una approfondita ricerca bibliografica, per individuarne le caratteristiche di composizione specifiche e gli eventuali principi attivi di particolare interesse sui quali indirizzare le successive attività.

È stato esplorato il potenziale applicativo del diossido di carbonio in fase supercritica per l'ottenimento di estratti da frutti di *Rosa canina* (semi e polpa dei frutti) e da *Rubus ulmifolius* (frutti interi e foglie). Il CO₂ supercritico è un solvente molto promettente poiché l'estrazione può essere effettuata a bassa temperatura. Inoltre, l'estrazione con fluidi supercritici (SFE) offre molte altre caratteristiche favorevoli rispetto alle tecniche tradizionali, dovuto al fatto che utilizza un solvente pulito, economico, non infiammabile e non tossico.

L'attenzione è stata rivolta, oltre che all'ottimizzazione del processo di estrazione e alla caratterizzazione chimica degli estratti, allo studio dell'attività biologica (antimicrobica e antiossidante); nello specifico, i test hanno riguardato l'attività antimicrobica verso patogeni umani, compresi quelli antibiotico resistenti.

Questo lavoro trova la sua motivazione in un grande attuale problema mondiale di sanità pubblica legato all'aumento della resistenza agli attuali farmaci, che è stata sviluppata da diversi microorganismi patogeni. Lo studio dell'attività antimicrobica di estratti naturali potrebbe, infatti, contribuire ad identificare composti o classi di composti biologicamente attivi utili per la progettazione di nuovi farmaci. Infatti, le sostanze naturali costituiscono un'ampia fonte di materiale rinnovabile, che non sarà mai completamente esplorata, di molecole bioattive, di elevata variabilità strutturale

In sintesi, dall'attività di ricerca sono emersi risultati coerenti con l'obiettivo iniziale:

- In particolare, un estratto ottenuto dai semi di *Rosa canina* mediante SFE[90:40] (attualmente in stato di attesa di concessione di brevetto internazionale a titolarità di UniCa) ha mostrato *in vitro* un'eccezionale attività antimicrobica verso una selezione di patogeni umani, compresi quelli che in ambito sanitario vengono definiti super-batteri divenuti refrattari ai trattamenti correnti, tra i quali: *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. I risultati e le caratteristiche dell'estratto in oggetto, naturale

al 100 %, e privo di qualsiasi traccia di solvente, suggeriscono che esso possa essere destinato a svariate applicazioni come disinfettante. La sua attività lo rende una preziosa fonte di molecole biologicamente attive; un punto di partenza sulla quale sviluppare una serie di indagini e approfondimenti utili per la comprensione degli antimicrobici naturali e lo sviluppo di molecole antimicrobiche di sintesi.

- Lo studio degli estratti ottenuti, specialmente, dalle foglie di *R. ulmifolius*, ha permesso di isolare mediante estrazione in diossido di carbonio supercritico e solventi organici miscele antimicrobiche interessanti verso i patogeni del cavo orale come lo *Streptococcus mutans* e lo *Streptococcus intermedius*, responsabili della formazione della carie o associati ad alcune forme di paradontiti. Infatti, la valutazione dell'inibizione della formazione del biofilm suggerisce che questi estratti possano rappresentare delle buone "soluzioni anticarie". Pertanto, l'approfondimento dell'indagine sulle loro componenti bioattive, rappresenta una fase preliminare necessaria all'individuazione di composti o classe di composti antimicrobici di origine vegetale, utili per la progettazione di disinfettanti, preparazione di dentifrici e collutori in grado di prevenire l'insorgenza di carie e paradontiti.

I risultati ottenuti sul profilo quali-quantitativo degli acidi grassi presenti negli estratti dei frutti di *R. ulmifolius* e semi e polpa di *R. canina*, isolati mediante SFE[300:40], mostrano importanti proprietà nutrizionali dovute al loro buon contenuto di acidi grassi essenziali, come l'acido linoleico (18:2 *n*-6) e linolenico (18:3 *n*-3).

Questi estratti, naturali al 100 %, ottenuti mediante una tecnologia rispettosa dell'ambiente, potrebbero trovare applicazione come ingredienti di alimenti e nutraceutici.

Diverse sono le molecole ad attività antimicrobica che son state individuate e quantificate come, gli acidi grassi liberi oleico, linoleico e linolenico; mentre altri, appartenenti alla famiglia dei polifenoli sono stati identificati ma devono essere ulteriormente indagati.

Da quanto esposto, è possibile concludere che ulteriori studi sono necessari per chiarire meglio la relazione tra composizione chimica e attività biologica osservata, ma che comunque estratti isolati dalle specie *R. canina* e *R. ulmifolius* sono da considerarsi promettenti per possibili applicazioni, nella disinfezione, in particolare.

Allo stato attuale, ed in seguito ad un confronto con tutti i dati ottenuti dalla presente ricerca, la matrice che pare aver dato le migliori risposte, sia dal punto di vista costitutivo che per

l'attività microbiologica, è rappresentata dai semi di *R. canina* per i quali si è convenuto fosse importante cercare di mettere a frutto le sue potenzialità applicative mediante deposito brevettuale.

BIBLIOGRAFIA

Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass* Vol. 456. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.

Agoramoorthy, G. Chandrasekaran, M. Venkatesalu, V. & Hsu, M. J. (2007). Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 739-742.

Akkari, H. Hajaji, S. B'chir, F. Rekik, M. & Gharbi, M. (2016). Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 221, 46-53.

Ali, N. Shaoib, M., Shah, S. W. A., Shah, I. & Shuaib, M. (2017). Pharmacological profile of the aerial parts of *Rubus ulmifolius* Schott. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-7.

Bai, J. Wu, Y. Wang, X. Liu, X. Zhong, K. Huang, Y. ... & Gao, H. (2018). In vitro and in vivo characterization of the antibacterial activity and membrane damage mechanism of quinic acid against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Safety*, 38(1), e12416.

Bailly, C. (2020). Anticancer properties of *Prunus mume* extracts (Chinese plum, Japanese apricot). *Journal of Ethnopharmacology*, 246, 112215.

Barberis, A. Deiana, M. Spissu, Y. Azara, E. Fadda, A. Serra, P. A. ... & Sanjust, E. (2020). Antioxidant, antimicrobial, and other biological properties of Pompia juice. *Molecules*, 25(14), 3186.

Batiha, G. E. S. Beshbishy, A. M. Ikram, M. Mulla, Z. S. El-Hack, M. E. A. Taha, A. E., ... & Elewa, Y. H. A. (2020). The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: quercetin. *Foods*, 9(3), 374.

Boonchird, C., & Flegel, T. W. (1982). *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(11), 1235-1241.

Canuti, M. (2006). Il Roseto botanico Carla Fineschi di Cavriglia. *Il Roseto botanico Carla Fineschi di Cavriglia*, 1000-1003.

Capasso, F. (2011). Droghe contenenti carboidrati. In *Farmacognosia* (pp. 109-125). Springer, Milano.

Capasso, F. Grandolini, G. & Izzo, A. A. (2006). I principi attivi delle droghe vegetali. *Fitoterapia: Impiego razionale delle droghe vegetali*, 81-127.

Carratù, B. & Sanzini, E. (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali – Istituto Superiore di Sanità*, 41(1), 7.

Chanwitheesuk, A. Teerawutgulrag, A. Kilburn, J. D. & Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food chemistry*, 100(3), 1044-1048.

Choi, J. S. Park, N. H. Hwang, S. Y. Sohn, J. H. Kwak, I. Cho, K. K. & Choi, I. S. (2013). The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *Journal of Environmental Biology*, 34(4), 673.

Chojnacka, K. Skrzypczak, D. Izydorczyk, G. Mikula, K., Szopa, D. & Witek-Krowiak, A. (2021). Antiviral Properties of Polyphenols from Plants. *Foods*, 10(10), 2277.

Cohen, M. (2012). Rosehip: an evidence based herbal medicine for inflammation and arthritis. *Australian Family Physician*, 41(7), 495-498.

Colonna, S. Folco, G. & Marangoni, F. (2013). I carboidrati. In *I cibi della salute* (pp. 23-38). Springer, Milano.

Coșarcă, S. L. Moacă, E. A., Tanase, C., Muntean, D. L. Pavel, I. Z. & Dehelean, C. A. (2019). Spruce and beech bark aqueous extracts: Source of polyphenols, tannins and antioxidants correlated to *in vitro* antitumor potential on two different cell lines. *Wood Science and Technology*, 53(2), 313-333.

Council of Europe. European Pharmacopoeia, 3rd ed., Council of Europe Press, Strasbourg; 1997, 121-122.

Couto, J. Figueirinha, A. Batista, M. T. Paranhos, A., Nunes, C., Gonçalves, L. M., ... & Pina, M. E. (2020). *Fragaria vesca* L. extract: A promising cosmetic ingredient with antioxidant properties. *Antioxidants*, 9(2), 154.

da Silva, L. P. Pereira, E. Pires, T. C. Alves, M. J. Pereira, O. R., Barros, L. & Ferreira, I. C. (2019). *Rubus ulmifolius* Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. *Food Research International*, 119, 34-43.

Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.

Demir, F. & Özcan, M. (2001). Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 47(4), 333-336.

Ercisli, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa spp.*) species. *Food chemistry*, 104(4), 1379-1384.

Fan, C. Pacier, C. & Martirosyan, D. M. (2014). Rose hip (*Rosa canina* L): A functional food perspective. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(12), 493-509.

Fazio, A. Plastina, P. Meijerink, J. Witkamp, R. F. & Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food chemistry*, 140(4), 817-824.

Gandhi, G. R. Vasconcelos, A. B. S. Wu, D. T. Li, H. B. Antony, P. J. Li, H. ... & Gan, R. Y. (2020). *Citrus* flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: A systematic review of in vitro and in vivo studies. *Nutrients*, 12(10), 2907.

Geronço, M. S. da Silveira Ramos, I. F. da Silva Filho, E. C. dos Santos Rizzo, M. Ribeiro, A. B., & da Costa, M. P. (2021). Are Structurally Modified Galactomannan Derivatives Biologically Active?. *Polysaccharides*, 2(1), 1-15.

Górniak, I. Bartoszewski, R. & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 241-272.

Grajzer, M. Prescha, A. Korzonek, K. Wojakowska, A. Dziadas, M., Kulma, A. & Grajeta, H. (2015). Characteristics of rose hip (*Rosa canina* L.) cold-pressed oil and its oxidative stability studied by the differential scanning calorimetry method. *Food Chemistry*, 188, 459-466.

Gramza, A. Korczak, J. & Amarowicz, R. (2005). Tea polyphenols-their antioxidant properties and biological activity-a review. *Polish Journal of food and Nutrition Sciences*, 14(3), 219.

Graziottin, A. Zanello, P. P. & D'Errico, G. D-mannosio nelle cistiti recidivanti: attacco su due fronti.

Gupta, A. Naraniwal, M. & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1), 8-26.

Gutiérrez-del-Río, I. Fernández, J. & Lombó, F. (2018). Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: Terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(3), 309-315.

Gyawali, R. & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.

Han, Y. Chen, W. & Sun, Z. (2021). Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Safety*, 41(5), e12918.

Hardman, W. E. (2004). (n-3) fatty acids and cancer therapy. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3427S-3430S.

Horváth, G. Molnár, P. Radó-Turcsi, E. Deli, J., Kawase, M. Satoh, K. ... & Molnár, J. (2012). Carotenoid composition and in vitro pharmacological activity of rose hips. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1).

<http://www.biofilm.montana.edu/>

Ibba, A. Piras, A. Rosa, A. Maxia, A. Fais, S. Orrù, G. & Porcedda, S. (2021). Fatty Acid Profile and Antimicrobial Activity of *Rubus ulmifolius* Schott Extracts Against Cariogenic Bacterium *Streptococcus mutans*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(1), 25-33.

Jayaraman, P. Sakharkar, M. K., Lim, C. S. Tang, T. H., & Sakharkar, K. R. (2010). Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International Journal of Biological Sciences*, 6(6), 556.

Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567-1574.

Kazaz, S. BaydaR, H. & ERBaS, S. (2009). Variations in chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa canina* L. fruits. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(3), 178-184.

Lay, L. Carboidrati e immunologia

Li, L. Thakur, K. Liao, B. Y. Zhang, J. G. & Wei, Z. J. (2018). Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 317-323.

Lou, Z. Wang, H. Rao, S. Sun, J. Ma, C. & Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25(2), 550-554.

Mailoa, M. N. Mahendradatta, M. Laga, A. & Djide, N. (2014). Antimicrobial activities of tannins extract from guava leaves (*Psidium guajava* L.) on pathogens microbial. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 3(1), 236-241.

Makar, S. Saha, T. & Singh, S. K. (2019). Naphthalene, a versatile platform in medicinal chemistry: Sky-high perspective. *European journal of medicinal chemistry*, 161, 252-276.

Marongiu, B. Porcedda, S. Piras, A. & Falconieri, D. (2012). Traditional and modern methods for the preparation of essential oils. *Essential Oils as Natural Food Additives*.

Martini, S. d'Addario, C. Colacevich, A. Focardi, S., Borghini, F. Santucci, A., ... & Rossi, C. (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(1), 50-59.

Mazarei, F. Jooyandeh, H. Noshad, M. & Hojjati, M. (2017). Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa* L.) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 224-231.

McCutcheon, A. R. Ellis, S. M. Hancock, R. E. & Towers, G. H. (1994). Antifungal of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, 44, 157–169.

Mondello, F. Girolamo, A. & Di Vito, M. (2020). Sostanze naturali e antibiotico-resistenza. *Natural 1*

Montazeri, N. Baher, E. Mirzajani, F. Barami, Z. & Yousefian, S. (2011). Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18), 4584-4589.

Mousavi, S. Bereswill, S. & Heimesaat, M. M. (2019). Immunomodulatory and antimicrobial effects of vitamin C. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 9(3), 73-79.

Nadpal, J. D. Lesjak, M. M., Šibul, F. S., Anačkov, G. T. Četojević-Simin, D. D. Mimica-Dukić, N. M. & Beara, I. N. (2016). Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds. *Food chemistry*, 192, 907-914.

Orrù, G. Demontis, C. Mameli, A. Tuveri, E. Coni, P., Pichiri, G. ... & D'hallewin, G. (2017). The selective interaction of *Pistacia lentiscus* oil vs. human Streptococci, an old functional food revisited with new tools. *Frontiers in microbiology*, 8, 2067.

Othman, L. Sleiman, A. & Abdel-Massih, R. M. (2019). Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. *Frontiers in microbiology*, 10, 911.

Ou, S. & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.

Panizzi, L. Caponi, C. Catalano, S. Cioni, P. L. & Morelli, I. (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 165-168.

Rajeshkanna, A. Senthamilselvi, M. M. & Prabhakaran, D. (2020). Isolation, Characterization and Antimicrobial Activity of Quercetin-3-O-(2''- α -Methyl-p-Coumaryl)-Rutinoside from *Delonix elata* Flowers. *European Journal of Medicinal Plants*, 1-11.

Rancic, A. Stankovic, S., Sokovic, M., Stankovic, S., Van Griensven, L., Vukojevic, J., ... & Ristic, M. (2003). Antimicrobial activity of limonene. *Zbornik radova*.

Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Journal of Food Microbiology*, 56, 3–12.

Rebolleda, S. Rubio, N. Beltrán, S. Sanz, M. T. & González-Sanjosé, M. L. (2012). Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, 270-277.

Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 146-166.

Rodríguez Vaquero, M. J. Aredes Fernandez, P. A. Manca de Nadra, M. C., & Strasser de Saad, A. M. (2010). Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6048-6052.

Rodríguez-Leyva, D. Bassett, C. M. McCullough, R. & Pierce, G. N. (2010). The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(9), 489-496.

Rokade, Y. B. & Sayyed, R. Z. (2009). Naphthalene derivatives: A new range of antimicrobials with high therapeutic value. *Rasayan J. Chem*, 2(4), 972-980.

Rosa, A. Era, B. Masala, C. Nieddu, M. Scano, P. Fais, A. ... & Piras, A. (2019). Supercritical CO₂ extraction of waste citrus seeds: Chemical composition, nutritional and biological properties of edible fixed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(7), 1800502.

Rosa, A. Maxia, A. Putzu, D. Atzeri, A. Era, B. Fais, A. ... & Piras, A. (2017). Chemical composition of *Lycium europaeum* fruit oil obtained by supercritical CO₂ extraction and evaluation of its antioxidant activity, cytotoxicity and cell absorption. *Food Chemistry*, 230, 82-90.

Rovná, K. Ivanišová, E. Žiarovská, J. Ferus, P. Terentjeva, M. Kowalczewski, P. Ł. & Kačaniová, M. (2020). Characterization of *Rosa canina* fruits collected in urban areas of Slovakia. Genome size, iPBS profiles and antioxidant and antimicrobial activities. *Molecules*, 25(8), 1888.

Ruiz-Rodríguez, B. M. Sánchez-Moreno, C. De Ancos, B. de Cortes Sánchez-Mata, M., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., & Tardío, J. (2014). Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidant capacity. *Fruits*, 69(6), 435-448.

Sateriale, D. Facchiano, S. Colicchio, R. Pagliuca, C. Varricchio, E. Paolucci, M. ... & Pagliarulo, C. (2020). In vitro synergy of polyphenolic extracts from honey, myrtle and

pomegranate against oral pathogens, *S. mutans* and *R. dentocariosa*. *Frontiers in microbiology*, 11, 1465.

Schulz, M. & Chim, J. F. (2019). Nutritional and bioactive value of *Rubus* berries. *Food Bioscience*, 31, 100438.

Selahvarzian, A., Alizadeh, A. Baharvand, P. A. Eldahshan, O. A., & Rasoulia, B. (2018). Medicinal Properties of *Rosa canina* L. *Herbal Medicines Journal*, 3(2), 77-84.

Stojković, D. Petrović, J. Soković, M. Glamočlija, J., Kukić-Marković, J. & Petrović, S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3205-3208.

Szentmihályi, K. Vinkler, P. Lakatos, B. Illés, V. & Then, M. (2002). Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. *Bioresource Technology*, 82(2), 195-201.

Taneva, S. Konakchiev, A. Totzeva, I. Kamenova-Nacheva, M., Nikolova, Y. Momchilova, S. & Dimitrov, V. (2017). Super-critical carbon dioxide extraction as an effective green technology for production of high quality rose hip oil. *Bulgarian Chemical Communication*, 49, 126-131.

Tzouwara-Karayanni, S. M., & Philianos, S. M. (1981). Chemical constituents of *Rubus ulmifolius* Schott. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 19, 127–130.

Wu, T. Cheng, D. He, M. Pan, S. Yao, X. & Xu, X. (2014). Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from *Citrus reticulata* Blanco peel against *Aspergillus niger*. *Food Control*, 35(1), 354-359.

Yoon, B. K. Jackman, J. A. Valle-González, E. R. & Cho, N. J. (2018). Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1114.

Vuuren, S. V. & Viljoen, A. M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. *Flavour and fragrance journal*, 22(6), 540-544.

