



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE CHIMICHE"**

CICLO XXXI

COORDINATORE Prof. Carlo Alberto Bignozzi

**PROFILO CHIMICO E DI BIOATTIVITA' DI PIANTE DEL
SAHARA OCCIDENTALE**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

Dottorando

Dott. Abdi Bellau Mohamed Lamin

Tutore

Prof. Fogagnolo Marco

Co-tutore

Prof. Guerrini Alessandra

Anni 2016/2018

INDICE

1 Quadro introduttivo	pag.1
1.1 Il contesto	pag.1
1.2 Scopo della tesi	pag.4
1.3 Metabolismo primario e secondario delle piante	pag.5
1.4 I metaboliti primari e gli elementi nutritivi	pag.6
1.5 I metaboliti secondari	pag.9
1.5.1 I composti fenolici	pag.10
1.5.2 Gli alcaloidi	pag.11
1.5.3 I terpenoidi	pag.12
1.6 Le droghe oggetto di studio	pag.17
1.6.1 <i>Ammodaucus leucotrichus</i>	pag.17
1.6.2 <i>Atriplex halimus</i>	pag.21
1.6.3 <i>Matricaria pubescens</i>	pag.26
1.6.4 <i>Anvillea garcinii</i> subsp. <i>radiata</i>	pag.29
1.6.5 <i>Cleome amblyocarpa</i>	pag.33
1.6.6 <i>Nucularia perrini</i>	pag.36
1.6.7 <i>Anastatica hierochuntica</i>	pag.37
1.6.8 <i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	pag.40
2 Materiali e metodi	pag.44
2.1 Raccolta e autenticazione delle droghe	pag.44
2.2 Analisi bromatologica	pag.44
2.3 Valutazione quali-quantitativa del contenuto di fenoli e attività antiradicalica	pag.50
2.4 Approfondimento su <i>A. leucotrichus</i>	pag.53
2.4.1 Analisi di metaboliti secondari di <i>A. leucotrichus</i>	pag.53
2.4.2 Attività biologica di <i>A. leucotrichus</i>	pag.56
2.5 Approfondimento di <i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	pag.61
2.5.1 Composizione e proprietà chimico- fisiche della gomma	pag.61
2.5.2 Attività biologica della gomma di <i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	pag.63
2.6 Formulazioni cosmetiche di acacia e <i>A. leucotrichus</i>	pag.64
3 Risultati e discussione	pag.66
3.1 Raccolta, essiccamento e autenticazione della droga	pag.66
3.2 Analisi bromatologica	pag.67
3.3 Valutazione quali-quantitativa del contenuto di fenoli e attività antiradicalica	pag.75
3.4 Approfondimento su <i>A. leucotrichus</i>	pag.79
3.4.1 Metaboliti secondari di <i>A. leucotrichus</i>	pag.79
3.4.2 Attività biologica di <i>A. leucotrichus</i>	pag.87
3.5 Approfondimento su <i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	pag.94
3.5.1 Composizione e proprietà chimico- fisiche della gomma	pag.94
3.5.2 Attività biologica della gomma di <i>Acacia tortilis</i> subsp. <i>raddiana</i>	pag.101
4 Conclusioni	pag.103
Bibliografia	pag.105

1. Quadro introduttivo

1.1 Il contesto

La medicina tradizionale è un insieme di pratiche terapeutiche, farmacologiche, religiose e rituali, che attraverso la loro interazione costituiscono “sistemi sanitari” radicati da millenni nella cultura di una specifica comunità umana. E’ praticata ovunque nel mondo ed in alcune zone del globo è addirittura più diffusa della medicina scientifica; essa dipende principalmente dalle risorse naturali disponibili nel contesto ambientale locale e dalla conoscenza necessaria per utilizzarle. I sistemi medicinali tradizionali sono definiti dall’Organizzazione Mondiale della Sanità come: “la somma totale delle conoscenze, abilità e pratiche basate su teorie, credenze ed esperienze, indigene a diverse culture, sia spiegabili che non, utilizzate nel mantenimento della salute e nella prevenzione, diagnosi, miglioramento o trattamento di malattia fisica e mentale” (World Health Organization, 2018).

Proprio in questo contesto si inserisce la medicina tradizionale del popolo sahwari ("gente del deserto"), tribù di nomadi che tradizionalmente abitavano la zona costiera e semidesertica nord-occidentale dell’Africa, chiamata Sahara spagnolo o Sahara Occidentale. Dal 1975, anno della firma degli accordi di Madrid, con cui la Spagna cedeva dopo 90 anni la sua colonia al Marocco e alla Mauritania, la popolazione sahwari vive in parte nel Sahara Occidentale, sotto occupazione marocchina, e in parte nei campi profughi nel sud-ovest dell’Algeria, nei pressi di Tindouf, in un altipiano desertico chiamato Hamada (**Figura 1**).

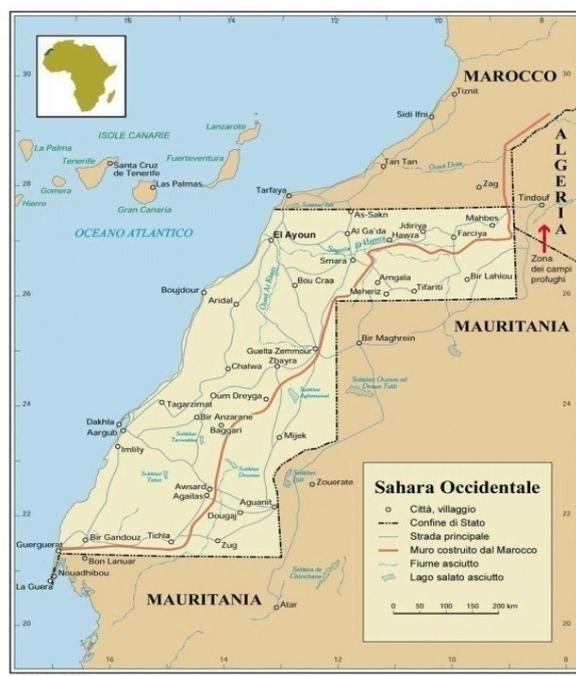


Figura 1 Distribuzione geografica dei territori del Sahara Occidentale

In questa parte del paese vivono tuttora come rifugiati circa 200.000 persone, amministrate da un governo autonomo, la Repubblica Araba Sahrawi Democratica (R.A.S.D.), costituitasi il 27 febbraio 1976.

La loro medicina nasce dall'incontro tra la farmacopea delle tribù berbere, basata sull'uso di piante selvatiche dei paesi del Sahara Occidentale, e la farmacopea dei popoli arabi islamici, provenienti dallo Yemen, ed è principalmente praticata dagli esperti e dalle donne più anziane della famiglia. Le parti di pianta più utilizzate in ordine di importanza sono foglie, fusti, semi, frutti, resine o gomme, che si trovano nelle famiglie dei rifugiati nella forma essiccata e tritata, pronte per essere schiacciate in un mortaio e aggiunte soprattutto nel tè o nel latte di cammello. Poiché l'Hamada è una zona desertica in cui cadono meno di 50 mm di pioggia ogni anno, solo alcune piante medicinali crescono intorno ai campi dei rifugiati; una parte dei rimedi usati provengono infatti da mercati commerciali come quello di Tindouf o di altre città algerine. Questa strategia ha consentito la prosecuzione della pratica della medicina tradizionale saharawi, che altrimenti non sarebbe stata possibile a causa della mancanza delle risorse vegetali nei campi. L'uso di piante come rimedi è parte integrante della cultura saharawi ma le pratiche della medicina tradizionale e la loro trasmissione intergenerazionale stanno diminuendo a causa dell'abbandono del nomadismo per uno stile di vita sedentario nei campi profughi, e dello sviluppo di un "sistema sanitario" basato sulla medicina occidentale (Volpato, 2010).

Sin dai primi momenti, la salute e l'alimentazione erano le principali preoccupazioni del giovane Governo della RASD, che dovette trovare rapidamente soluzioni alla mancanza di risorse umane e materiali per affrontare epidemie (come poliomielite, patologie all'apparato respiratorio e gastrointestinale) e denutrizione. Attualmente, il sistema sanitario saharawi ha una struttura di servizi sanitari di prevenzione e di assistenza sufficienti e abbastanza qualificati per tutta la popolazione; la scarsità di farmaci per la cura di malattie e di integratori alimentari per supportare la dieta non equilibrata rende però ancora precario lo stato di salute. Nonostante negli ultimi quindici anni nei campi di rifugiati si sia registrato un progressivo aumento dell'economia di mercato, reso evidente dalla presenza di alcune piccole attività commerciali dove è possibile acquistare generi di prima necessità (come frutta, verdura, biscotti e dolci, abbigliamento e utensili per la casa), questi rimangono per lo più accessibili solo ad un'esigua parte della popolazione rifugiata. Il limitato potere d'acquisto delle famiglie saharawi e la scarsa disponibilità di prodotti alimentari freschi fanno sì che la dieta sia poco variata e di scarsa qualità. La situazione nutrizionale della popolazione rifugiata monitorata a partire dal 1997 ad oggi ci restituisce infatti un quadro piuttosto preoccupante: i livelli di anemia nei bambini piccoli e nelle

donne in età fertile sono ancora elevati; la fornitura di acqua, sia in quantità che in qualità è insufficiente; ancora diversi bambini nei campi manifestano casi di diarrea, infezione respiratoria acuta (ARI), febbre e infezioni dovute a condizioni igieniche non appropriate (Ministerio de Salud Pública, RASD, 2008).

L'indagine nutrizionale svolta nel 2008 nei campi di rifugiati sahwari che ha coinvolto un totale di 892 bambini (dai 6 ai 59 mesi) e 797 donne in età fertile (dai 15 ai 49 anni) appartenenti a 215 famiglie ha, in particolare, evidenziato che:

- la distribuzione degli aiuti alimentari ai rifugiati è irregolare e insufficiente;
- il 43% circa dei nuclei famigliari intervistati possiede qualche tipo di bestiame, la maggior parte possiede 1 o 2 capre o pecore;
- il 15% delle famiglie ha una dieta povera;
- il 42% dei bambini mangia da un minimo di 4 a un massimo di 11 tipologie di alimenti mentre il 45% delle donne mangia un massimo di 5 tipologie di alimenti. Le tipologie di alimenti disponibili sono: cereali, lenticchie, olio, the, cipolle e patate;
- le strategie più comuni utilizzate dalle donne per sopperire alla mancanza di cibo consistono nel limitare le porzioni di tutta la famiglia, nel ridurre quelle degli adulti a beneficio dei bambini, nell'acquistare i prodotti meno costosi.

Dalla stessa indagine si rileva che secondo gli standard del 2005 dell'OMS, la percentuale di bambini con una denutrizione acuta-moderata globale è del 18%, mentre di bambini con denutrizione acuta grave è del 5%. Si stima che il 62% dei bambini siano anemici, tra questi il 6% ha un'anemia severa. Le cause della denutrizione e dell'anemia dei bambini dipendono da molteplici fattori ma soprattutto da inadeguata alimentazione, composta per lo più da alimenti secchi o conservati e dalla diarrea.

Più recentemente il Plan estratégico de salud 2016-2020 del Ministero della Salute Pubblica della RASD ha evidenziato che il 7.6% dei bambini di età inferiore a 5 anni è in una condizione di malnutrizione, mentre la malnutrizione cronica colpisce il 25.2% dei bambini della stessa fascia d'età e tra questi il 28.4% sono colpiti da anemia. Si tratta quindi di un sostanziale peggioramento della situazione rispetto al 2005. Nello stesso documento è riportato che il 47% delle donne in gravidanza soffre di anemia moderata o acuta, una condizione che perdura nel 33% dei casi fino al terzo mese di gravidanza.

Partendo da questo contesto, il Comune di Albinea, da anni impegnato in progetti di cooperazione con il popolo Sahwari, ha promosso la sottoscrizione di un accordo quinquennale di cooperazione, che è stato firmato il 19 Novembre 2015, con l'Università di Ferrara, il Comune di Ferrara, il Ministero della Salute pubblica sahwari, l'Università di

Tifariti con lo scopo di realizzare iniziative di formazione, di condivisione di strumenti di ricerca e innovazione per la crescita economica e sociale della popolazione sahwawi.

1.2 Scopo della tesi

Quattro dei 17 global goals dell'Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile costituiscono gli obiettivi generali del progetto di ricerca: la lotta alla fame nel mondo, la buona salute, la lotta alla povertà, l'istruzione di qualità. Questi sono stati poi declinati in obiettivi specifici:

- 1) individuare alcune piante del Sahara Occidentale con adeguato contenuto di micro e macro-nutrienti che potessero essere suggerite per l'integrazione della dieta sahwawi
- 2) valutare il contenuto di metaboliti secondari e l'attività antiossidante
- 3) indagare dal punto di vista fitochimico e biologico più approfonditamente alcune droghe
- 4) formulare alcuni prodotti salutistici ad uso topico che possano poi essere preparati direttamente nel laboratorio "M. Embarek Fakal-la", nei campi rifugiati sahwawi.

Gli attori locali sahwawi e l'Università di Ferrara, alla fine dell'anno 2015, a partire da fonti bibliografiche (Barrera Martinez et al., 2007; Volpato, 2010; Volpato et al., 2012), hanno selezionato alcune specie di uso alimentare e medico tradizionale, in particolare per le promettenti proprietà nutrizionali, per la cura delle infezioni alle vie respiratorie e all'apparato gastro-intestinale, per la cura e cicatrizzazione di ferite e piaghe, per la prevenzione e la cura del diabete e di anemie. *Ammodaucus leucotrichus* L. (frutti), *Atriplex halimus* L. (foglie), *Cleome amblyocarpa* Barratte & Murb. (parti aeree), *Matricaria pubescens* (Desf.) Sch. Bip. (parti aeree), *Anvillea garcinii* subsp. *radiata* (Coss. & Durieu) Anderb (foglie), *Anastatica hierochuntica* L. (parti aeree), *Nucularia perrinii* Batt. (foglie) sono state raccolte in natura allo stato spontaneo nel Sahara Occidentale nel marzo 2016 (località Bir Lehlu). E' stato acquistato, inoltre, nel mercato locale dei territori liberati un campione di resina di *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* (Savi) Brenan.

Le droghe raccolte nei territori liberati del Sahara Occidentale, dopo mondatura ed essiccamento in loco, sono state poi trasferite in Italia per essere sottoposte ad analisi bromatologica (fibra, proteine, lipidi, contenuto di acidi grassi e steroli, ceneri e metalli macro e micronutrienti) e valutarne le proprietà nutrizionali.

Sono state poi sottoposte ad uno screening per la valutazione del contenuto dei polifenoli e della potenziale attività antiossidante.

A. leucotrichus e *A. tortilis* subsp. *raddiana* sono state studiate in maniera approfondita per il loro profilo fitochimico e l'attività biologica. A completamento della tesi di dottorato sono state preparate alcune formulazioni cosmetiche.

1.3 Metabolismo primario e secondario delle piante

I costituenti fitochimici possono essere descritti come appartenenti a due classi: metaboliti primari e secondari. I composti primari hanno un ruolo diretto nella crescita della pianta, del suo sviluppo e struttura. Essi hanno un ruolo essenziale per processi come la fotosintesi, il ciclo dell'acido citrico e le catene di trasporto elettronico. I metaboliti primari includono intermedi di cammini catabolici e anabolici, che avvengono in tutte le piante, hanno le stesse funzioni metaboliche e sono necessari per la sopravvivenza delle piante. I composti prodotti in questi processi del metabolismo includono amminoacidi, zuccheri e acidi grassi, molecole a basso peso molecolare, che possono essere assemblate in strutture più complesse per dare origine a proteine, carboidrati, lipidi e acidi nucleici. I metaboliti secondari sono prodotti delle vie metaboliche primarie, inclusi fotosintesi, ciclo di Calvin, ciclo dell'acido citrico, glicolisi e via dei pentoso fosfati. Seppur il quadro generale dei metaboliti secondari sia molto complesso, essi possono essere ricondotti a tre cammini biosintetici, collegati al metabolismo primario del carbonio: la via dello scichimato che porta alla formazione dei composti fenolici, la via dell'acido mevalonico e del MEP/DOXP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato/ deossi-xilulosio-5-fosfato) che genera i terpenoidi, la via dell'acetato che porta alla sintesi di acidi grassi e polichetidi. Infine gli alcaloidi, i glicosidi cianogenici, i glucosinolati sono biosintetizzati dagli amminoacidi (Figura 2) (Schmidt & Klaser Cheng, 2017).

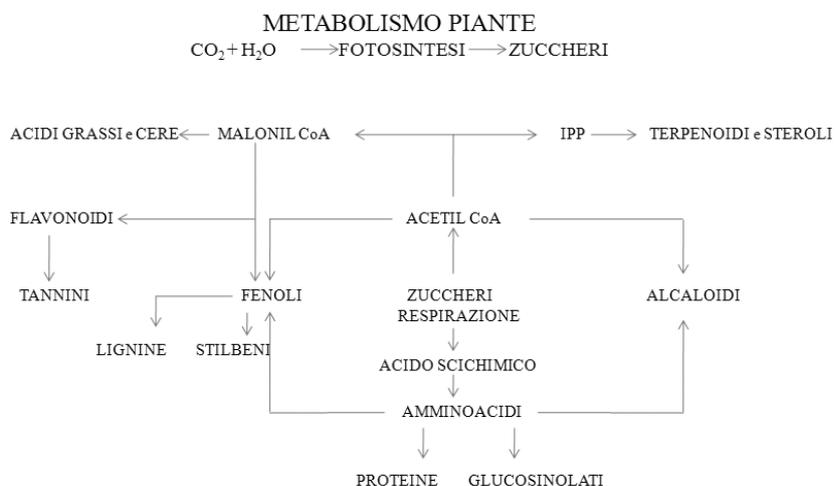


Figura 2. Schema semplificato del metabolismo delle piante

1.4 I metaboliti primari e gli elementi nutritivi

Per elemento nutritivo si intende quella sostanza fondamentale per il metabolismo umano, quindi per la produzione di energia necessaria per la vita.

I principi nutritivi sono contenuti negli alimenti in vario modo e a seconda del fabbisogno vengono classificati in macronutrienti e micronutrienti.

Tra i macronutrienti troviamo le proteine, i carboidrati e i lipidi; i principali micronutrienti sono invece le vitamine e i sali minerali, che possiamo ricavare anch'essi dalle piante.

Le proteine sono molecole azotate formate da carbonio, idrogeno, ossigeno ed azoto, sono tra i composti organici più complessi e costituenti essenziali di tutte le cellule. Dal punto di vista chimico, le proteine sono delle macromolecole formate dall'unione di amminoacidi mediante un legame covalente detto legame peptidico.

Le proteine svolgono molteplici funzioni e rappresentano circa il 12-15% della massa corporea.

Gli amminoacidi presenti in natura sono numerosissimi, ma solo 20 di essi possono essere utilizzati dal nostro organismo per la sintesi proteica. Otto 8 di questi sono definiti "essenziali", ovvero non sono sintetizzati in quantità sufficiente e devono quindi essere assunti con la dieta.

Gli alimenti di origine animale hanno un profilo aminoacidico migliore perché generalmente contengono tutti gli aminoacidi essenziali in buone quantità. A differenza di questi, gli alimenti di origine vegetale presentano solitamente carenze di uno o più aminoacidi essenziali.

Normalmente viene assorbito il 92% delle proteine introdotte con la dieta (il 97% di quelle animali ed il 78% di quelle vegetali).

I nutrizionisti consigliano di assumere durante l'arco della giornata una quantità di proteine pari a circa il 15-20% dell'apporto calorico giornaliero totale, cioè 0.8-1 g di proteine per Kg di peso corporeo. Queste macromolecole dovrebbero derivare per i 2/3 da prodotti di origine animale e per 1/3 da prodotti di origine vegetale.

Una dieta eccessivamente proteica può provocare:

- accumulo di grasso di deposito (se le proteine inserite vanno oltre il fabbisogno calorico totale);
- formazione eccessiva di scorie azotate tossiche (ammoniaca, creatinina, acido urico, urea, ecc.).

Le scorie azotate in eccesso creano difficoltà nel ricambio e ricostituzione di nuove strutture cellulari, affaticamento dei reni e del fegato, acidosi del sangue, difficoltà e disturbi digestivi.

I carboidrati, detti anche glucidi, sono sostanze formate da carbonio, idrogeno ed ossigeno. Hanno formula molecolare $(CH_2O)_n$ e sono contenuti principalmente negli alimenti di origine vegetale.

In base alla loro struttura chimica, i carboidrati vengono classificati in *semplici* (monosaccaridi e disaccaridi) e *complessi* (oligosaccaridi e polisaccaridi).

I monosaccaridi vengono classificati in base al loro numero di atomi di carbonio in triosi, tetrosi, pentosi, esosi e così via; gli esosi (come glucosio, fruttosio, galattosio) sono i più importanti dal punto di vista nutrizionale.

Il glucosio è usato come fonte di energia sia dagli animali che dalle piante; è il principale prodotto della fotosintesi ed è il combustibile della respirazione cellulare. Quando presente in eccesso, il glucosio viene convertito in glicogeno, polimero del glucosio e riserva energetica principale degli animali.

Zuccheri semplici e/o complessi, seppur in percentuale molto variabile, sono pressoché presenti in tutti gli alimenti.

I carboidrati dovrebbero costituire la quota predominante dell'apporto calorico giornaliero, idealmente circa il 55-65%; di questi l'80% dovrebbe essere di tipo complesso.

Un consumo eccessivo, oltre a favorire aumenti di peso e patologie dentali, predispone allo sviluppo di insulino resistenza, del diabete di tipo 2, e ad alterazioni ormonali di diverso tipo.

I lipidi sono un gruppo eterogeneo di molecole, accomunate dalla caratteristica di essere insolubili in acqua.

Assolvono importanti funzioni nell'organismo, tra cui quella di apporto energetico (1 g di lipidi fornisce 9 Kcal, contro le 4 Kcal di carboidrati e proteine); sono costituenti delle membrane cellulari (fosfolipidi e colesterolo); sono precursori di composti che nell'organismo svolgono importanti funzioni regolatrici (ormoni steroidei, vitamina D); sono il nostro isolante termico sottocutaneo e sostentano i nostri organi.

I lipidi più importanti dal punto di vista dell'alimentazione umana sono: acidi grassi, trigliceridi, fosfolipidi e colesterolo.

Va ricordato che anche i lipidi sono fondamentali al fine di una dieta equilibrata e che tra gli acidi grassi insaturi quelli definiti essenziali come l'acido α -linolenico e linoleico sono importanti precursori delle prostaglandine, dei trombossani e dei leucotrieni, sostanze che

mediano la risposta infiammatoria e intervengono nel sistema immunitario e cardiovascolare.

Le vitamine sono un insieme molto eterogeneo di sostanze chimiche, normalmente necessarie in minime quantità per i fabbisogni dell'organismo, nel quale regolano una serie di reazioni metaboliche, spesso funzionando come coenzimi. La carenza di vitamine è solitamente definita ipovitaminosi e avitaminosi nei casi, molto più rari, in cui è totalmente assente.

Le vitamine si possono suddividere in due grandi gruppi:

- *idrosolubili*: non accumulabili dall'organismo, quindi da assumere quotidianamente con l'alimentazione. Si tratta di tutte le vitamine del gruppo B, compreso l'acido folico, della vitamina H, della PP e della C.
- *liposolubili*: vengono assorbite assieme ai grassi alimentari e accumulate nel fegato. La carenza si manifesta quindi in seguito a una mancata assunzione per tempi lunghi. Ne fanno parte la vitamina A, D, E e K.

I sali minerali sono sostanze inorganiche che, pur rappresentando complessivamente solo il 6% del peso corporeo, svolgono funzioni essenziali per la vita dell'uomo: partecipano infatti ai processi cellulari, come la formazione di denti ed ossa, sono coinvolti nella regolazione dell'equilibrio idrosalino, nell'attivazione di numerosi cicli metabolici e costituiscono fattori determinanti per la crescita e lo sviluppo di tessuti ed organi.

I sali minerali non forniscono direttamente energia, ma la loro presenza permette di realizzare proprio quelle reazioni che liberano l'energia di cui abbiamo bisogno.

I sali minerali possono essere suddivisi in:

- *Macroelementi*: sono presenti nell'organismo in quantità discrete. Il fabbisogno giornaliero è dell'ordine dei grammi o dei decimi di grammo.
- *Oligoelementi o microelementi*: sono presenti solo in tracce nell'organismo e il fabbisogno giornaliero va da qualche microgrammo ad alcuni milligrammi (Colonna et al., 2012).

LARN PER I MINERALI: ASSUNZIONE RACCOMANDATA PER LA POPOLAZIONE (PRI) E ASSUNZIONE ADEGUATA (AI)																
		Ca (mg)	P (mg)	Mg (mg)	Na (g)	K (g)	Cl (g)	Fe (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Se (µg)	I (µg)	Mn (mg)	Mo (µg)	Cr (µg)	F (mg)
LATTANTI	6-12 mesi	260	275	80	0,4	0,7	0,6	11	3	0,2	20	70	0,4	10	4	0,4
BAMBINI-ADOLESCENTI																
	1-3 anni	700	460	80	0,7	1,7	1,0	8	5	0,3	19	100	0,6	15	7	0,7
	4-6 anni	900	500	100	0,9	2,4	1,4	11	6	0,4	25	100	0,8	20	10	1,0
	7-10 anni	1100	875	150	1,1	3,0	1,7	13	8	0,6	34	100	1,2	30	14	1,6
Maschi	11-14 anni	1300	1250	240	1,5	3,9	2,3	10	12	0,8	49	130	1,9	50	25	2,5
	15-17 anni	1300	1250	240	1,5	3,9	2,3	13	12	0,9	55	130	2,7	60	33	3,5
Femmine	11-14 anni	1300	1250	240	1,5	3,9	2,3	10/18	9	0,8	48	130	1,9	50	21	2,5
	15-17 anni	1200	1250	240	1,5	3,9	2,3	18	9	0,9	55	130	2,3	60	23	3,0
ADULTI																
Maschi	18-29 anni	1000	700	240	1,5	3,9	2,3	10	12	0,9	55	150	2,7	65	35	3,5
	30-59 anni	1000	700	240	1,5	3,9	2,3	10	12	0,9	55	150	2,7	65	35	3,5
	60-74 anni	1200	700	240	1,2	3,9	1,9	10	12	0,9	55	150	2,7	65	30	3,5
	≥75 anni	1200	700	240	1,2	3,9	1,9	10	12	0,9	55	150	2,7	65	30	3,5
Femmine	18-29 anni	1000	700	240	1,5	3,9	2,3	18	9	0,9	55	150	2,3	65	25	3,0
	30-59 anni	1000	700	240	1,5	3,9	2,3	18/10	9	0,9	55	150	2,3	65	25	3,0
	60-74 anni	1200	700	240	1,2	3,9	1,9	10	9	0,9	55	150	2,3	65	20	3,0
	≥75 anni	1200	700	240	1,2	3,9	1,9	10	9	0,9	55	150	2,3	65	20	3,0
GRAVIDANZA		1200	700	240	1,5	3,9	2,3	27	11	1,2	60	200	2,3	65	30	3,0
ALLATTAMENTO		1000	700	240	1,5	3,9	2,3	11	12	1,6	70	200	2,3	65	45	3,0

Tabella 1. Assunzione raccomandata per la popolazione (PRI in grassetto) e assunzione adeguata (AI in corsivo): valori su base giornaliera (Società Italiana di Nutrizione Umana-SINU, 2014)

1.5 I metaboliti secondari

Oggi si conoscono più di 200'000 metaboliti secondari di origine vegetale e si stima che più del 60% dei medicinali riconosciuti sia riconducibile direttamente o indirettamente ad essi. L'attenzione sulle molecole di origine naturale si è ulteriormente accentuata negli ultimi anni anche perchè l'utilizzo di approcci alternativi, come ad esempio quello dell'identificazione di sostanze bioattive mediante la chimica combinatoriale, non hanno dato gli esiti sperati. La produzione chimica di molecole aventi specificità e complessità pari a quelle naturali risulta essere oggi impraticabile, e sembra dunque più promettente attingere direttamente a quelle presenti nel regno vegetale. Delle circa 350'000 specie vegetali stimate (un terzo delle quali ancora sconosciute) solo una piccolissima parte è stata caratterizzata in maniera adeguata dal punto di vista chimico (Cseke et al. 2006, Atanasov et al., 2015). I metaboliti secondari rappresentano un complesso sottoinsieme delle sostanze vegetali: essi sono coinvolti in alcune funzioni basali della pianta, ma giocano un ruolo fondamentale soprattutto per quanto riguarda l'interazione con l'ambiente

esterno. Essi sono coinvolti infatti nella difesa da stress biotici e abiotici, fungono da regolatori della crescita e alcuni sono molecole segnale e agiscono come attrattivi per gli insetti impollinatori o nella mediazione di interazioni simbiotiche o parassitiche. Per quanto l'ambito salutistico umano, queste sostanze esercitano importanti funzioni biologiche tra le quali attività antiossidante, modulazione di enzimi detossificanti, stimolazione del sistema immunitario, riduzione dell'aggregazione piastrinica e modulazione del metabolismo ormonale (Atanasov et al, 2015).

1.5.1 I composti fenolici

I composti fenolici si dividono in diverse classi, dai fenoli semplici come acidi benzoici, acidi cinnamici, cumarine, a quelli più complessi come flavonoidi e antocianidine. Gli acidi benzoici rappresentano le molecole più semplici, sono costituiti da un anello benzoico con un gruppo acido in posizione 1 e possono avere diversi sostituenti, tra cui l'ossidrile (-OH) e il metossile (-OCH₃). Gli acidi cinnamici sono particolarmente importanti in quanto costituiscono le molecole di base per la costruzione di strutture fenoliche complesse, oltre ad essere i costituenti della lignina, uno dei polimeri più diffusi nel regno vegetale. L'acido *trans*-cinnamico è una molecola base per la costruzione di diverse strutture fenoliche. Le cumarine, sostanze biologicamente attive presenti in varie famiglie, derivano proprio dall'acido *trans*-cinnammico in seguito a idrossilazione, ed eventuale glucosilazione del gruppo ossidrilico, con successiva lattonizzazione. Gli stilbeni sono costituiti da due anelli aromatici e da un ponte di etene o etano. Nelle piante vanno a regolare la crescita e sono coinvolti nella risposta di difesa dall'attacco dei patogeni. I flavonoidi, sono composti fenolici complessi, costituiscono una classe di metaboliti secondari comuni tutte le piante. In base al numero di ossidazione i flavonoidi si suddividono in diverse sottoclassi: calconi, flavoni, flavonoli, flavandioli, antocianine (o antocianidine) e protoantocianidine (o tannini condensati), un settimo gruppo, quello degli auron, è stato scoperto solo in alcune specie (**Figura 3**) (Winkel-Shirley, 2001). I flavonoidi sono ora considerati componenti indispensabili in una varietà di applicazioni nutraceutiche, farmaceutiche, medicinali e cosmetiche (Panche et al, 2016).

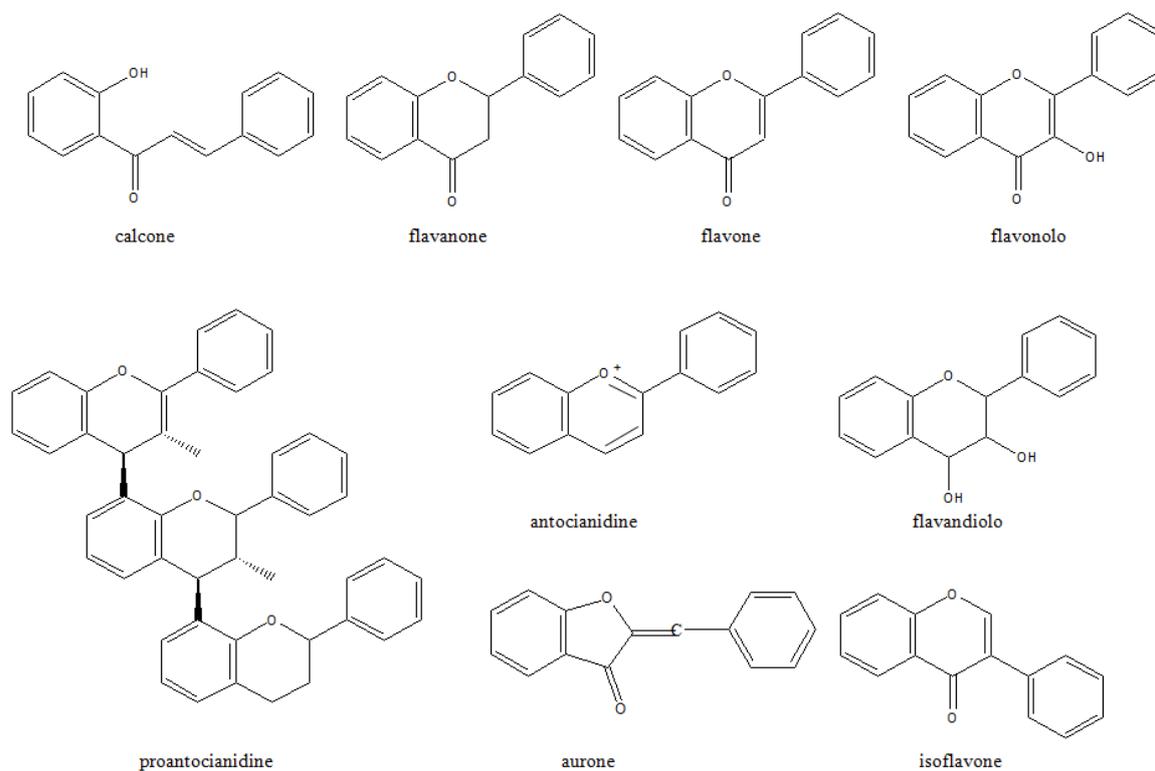


Figura 3. Strutture dei principali flavonoidi

Gli anelli aromatici possono presentare diversi sostituenti come gruppi ossidrilici su cui possono avvenire principalmente reazioni di glucosilazione, ramnosilazione, galattosilazione. Le antocianidine derivano dal diidroflavonolo ed rappresentano una delle sottoclassi di fenoli più importanti. Sono presenti nelle piante, in particolare nei fiori e nei frutti, in forma glicosilata (antocianine) e sono responsabili dei colori rosso, porpora e blu. Sia i composti fenolici semplici che quelli complessi possono polimerizzare in strutture ad elevato peso molecolare note come tannini.

1.5.2 Gli alcaloidi

Gli alcaloidi costituiscono un grande gruppo di composti azotati, appartenenti al regno vegetale e sono caratterizzati da una grande eterogeneità dal punto di vista chimico. La maggior parte di questi composti sono incolori, poco solubili in acqua e abbastanza solubili nei solventi organici. Vengono sintetizzati soprattutto a partire da amminoacidi (come ornitina, arginina, lisina, triptofano, fenilalanina e tirosina). Gli alcaloidi possono essere raggruppati in base a diversi criteri di classificazione: botanico, a seconda delle piante che

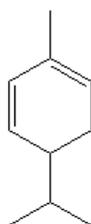
li sintetizzano; farmacologico, sulla base dei principi attivi o sull'attività tossicologica del composto; chemiotassonomico, in base agli aspetti botanici e chimici; chimico, a seconda del nucleo, eterociclo o carbociclo, che è alla base della struttura.

1.5.3 I terpenoidi

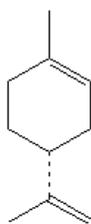
I terpenoidi comprendono un vasto numero di composti. Questa classe di prodotti ha origine da due vie biosintetiche, la via dell'acido mevalonico e del MEP/DOXP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato/ deossi-xilulosio-5-fosfato) che portano alla formazione di isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilallil pirofosfato (DMAPP), molecole a 5 atomi di carbonio, che fungono da unità di base per la costruzione di molecole più complesse e caratterizzate da un numero di atomi di carbonio sempre multipli di cinque: monoterpeni ($2C_5$), sesquiterpeni ($3C_5$), diterpeni ($4C_5$), triterpeni ($6C_5$), tertaterpeni ($8C_5$). Gli oli essenziali sono costituiti principalmente da mono e sesquiterpeni, responsabili del loro stato fisico liquido e della loro volatilità; raramente troviamo diterpeni, che non sono volatili. I terpeni possono essere divisi in due gruppi fondamentali: idrocarburi terpenici e loro derivati ossigenati.

Idrocarburi terpenici (C-H):

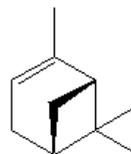
monoterpeni (C₁₀): limonene (agrumi, finocchio), pinene (trementina, eucalipto, basilico, rosmarino), canfene (trementina, canfora, ginepro, zenzero), terpinene (trementina, aneto), fellandrene (eucalipto, cannella, limone, finocchio)



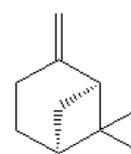
α -fellandrene



limonene (R)



α -pinene (R)



β -pinene (S)

Figura 4. Strutture di monoterpeni

sesquiterpeni (C₁₅): cadinene (limone, ginepro), β -cariofillene (cannella, chiodi di garofano), cedrene (cedro, ginepro); umulene o α -cariofillene (luppolo, pioppo, betulla); Azuleni: camazulene (camomilla), guaiazulene (eucalipto)

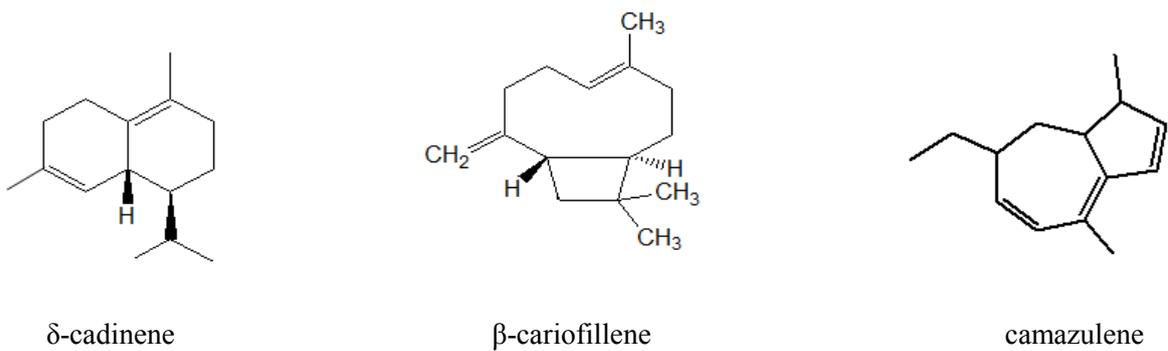


Figura 5. Strutture di sesquiterpeni

diterpeni (C₂₀): canforene (canfora), cupressene (cipresso)



Figura 6. Strutture di diterpeni

Idrocarburi ossigenati (C-H-O):

- **alcoli:** linalolo (lavanda, limone, basilico); mentolo (menta); santalolo (sandalò); geraniolo (geranio, timo); terpineolo (tea tree, timo, maggiorana), nerolo (neroli, mirto); farnesolo (neroli, rosa, ylan ylang); citronello (citronella, geranio)

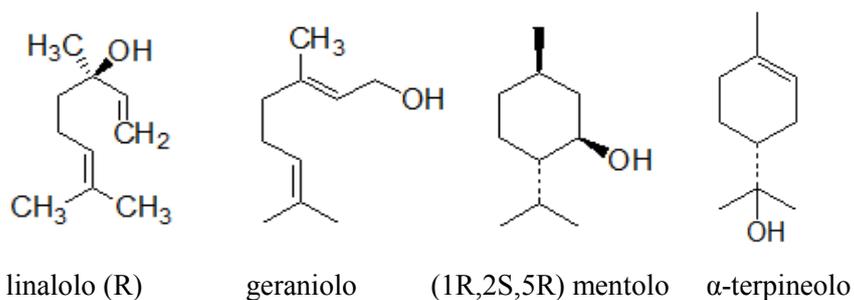
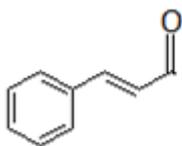


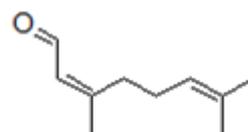
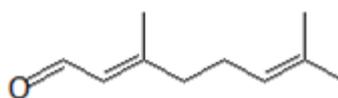
Figura 7. Strutture di alcoli monoterpenici

- **aldeidi:** aldeide cinnamica (cannella); aldeide benzoica (mandorlo amaro); aldeide cuminica (carvi, cumino, finocchio); aldeide anisica (anice, finocchio); citrale (limone, melissa); citronellale (citronella, melissa); vanillina (vaniglia, balsamo del Perù, balsamo del Tolù)

aldeide cinnamica



trans-citrale o geraniale



cis-citrale o nerale

Figura 8. Strutture di aldeidi monoterpeniche

- **chetoni:** canfora (canfora, cannella, salvia, basilico), carvone (carvi, anice), tujone (thuja, salvia, assenzio), mentone (menta)
- **fenoli:** timolo (timo), eugenolo (chiodi di garofano), carvacrolo (timo, origano, menta)
- **eteri:** eucaliptolo o 1,8-cineolo (eucalipto), estragolo (basilico, anice, finocchio), anetolo (anice, aneto, finocchio), apiolo (aneto, prezzemolo), safrolo (sassofrasso, noce moscata); miristicina (noce moscata, prezzemolo)
- **acidi organici:** acido cinnamico (cannella, balsamo del Perù, olio di storace), acido benzoico (ylang-ylang, balsamo del Perù)
- **perossidi:** ascaridolo (boldo, chenopodio).

Gli oli essenziali sono composti liquidi e volatili a temperatura ordinaria; si presentano incolore o giallo pallido, ma alcuni assumono particolari colorazioni (es. camomilla, blu; assenzio, verde). Sono poco solubili in acqua, ma alcuni componenti, essendo lievemente idrofili, ne permettono la miscibilità in piccola percentuale conferendole un aroma caratteristico che richiama quello delle piante da cui derivano, sono invece solubili nella maggior parte dei solventi organici e negli oli fissi.

Hanno elevato indice di rifrazione e molti possiedono potere rotatorio. La loro densità è generalmente inferiore a 1, con alcune eccezioni (cannella, chiodi di garofano). Tali caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche, come anche il titolo dei principali costituenti, devono rispondere a specifici standards imposti dalle farmacopee nazionali e internazionali (per esempio la *European Pharmacopoeia*) e, per gli oli essenziali per cui non siano previste delle monografie specifiche, dalla *Scientific Committee of the Essential Oil Association* (EOA Standards), dall'industria degli aromi e da enti autonomi di

certificazione (*International Standards Organisation - ISO Standards*). E' possibile così stabilirne autenticità, qualità ed eventuali sofisticazioni.

La *European Pharmacopoeia* (IX edizione) definisce oli essenziali “*i prodotti odorosi, solitamente di composizione complessa, ottenuti a partire da materie prime vegetali botanicamente definite, mediante distillazione a vapore, distillazione a secco o un appropriato processo meccanico senza riscaldamento*”.

La tecnica ordinariamente utilizzata è la distillazione in corrente di vapore, mentre la distillazione a secco è applicata in pochissimi casi (olio essenziale di *Pinus sylvestris*, olio di cade da *Juniperus oxycedrus*). L'estrazione meccanica è limitata alle scorze degli agrumi.

La distillazione in corrente di vapore acqueo

Questa tecnica per estrarre le essenze dai tessuti della pianta che li contiene, mediante il loro trasporto da parte del vapore acqueo. Si tratta di un particolare tipo di distillazione utilizzato per isolare sostanze termolabili, cioè che si degradano a temperature prossime al loro punto di ebollizione (per gli oli essenziali varia dai 150 ai 300 °C) sfruttando la loro immiscibilità con l'acqua.

Due liquidi immiscibili o parzialmente miscibili costituiscono una miscela binaria eterogenea. Nel caso di completa immiscibilità, non vi sono interazioni molecolari e la tensione di vapore totale della miscela è data dalla somma delle singole tensioni di vapore dei componenti puri a quella temperatura.

$$P = P^{\circ}_A + P^{\circ}_B$$

Un composto bolle quando la sua tensione di vapore eguaglia la pressione esterna. Ne deriva che la tensione totale della miscela uguaglierà la pressione esterna ad una temperatura che è inferiore alla temperatura di ebollizione di ciascuno dei componenti puri. Poiché in pratica uno dei due liquidi è l'acqua, la distillazione in corrente di vapore permette di distillare liquidi altobollenti non miscibili con l'acqua ad una temperatura inferiore a 100 °C, evitando così possibili fenomeni di decomposizione.

La distillazione in corrente di vapore è una distillazione etero-azeotropica in cui l'acqua rappresenta il composto bassobollente mentre l'olio essenziale è il componente altobollente. Durante il processo di distillazione, in cui si fa gorgogliare acqua nella droga che contiene il liquido immiscibile (essenza), viene prodotto un vapore a composizione costante chiamato azeotropo fino all'esaurimento del componente presente in quantità minore nella miscela. Il prodotto della distillazione contiene in percentuale molta più acqua

che olio essenziale in quanto la tensione di vapore di H₂O è maggiore rispetto a quella dell'olio essenziale. La composizione del vapore e quindi del distillato risultante non dipende dalla quantità dei componenti nella miscela eterogenea, ma solo dalle loro tensioni di vapore; il rapporto molare dei componenti nel vapore corrisponde al rapporto fra le tensioni di vapore alla temperatura di ebollizione.

Applicando l'equazione:

$$P^{\circ}_i \cdot V_i = n_i \cdot RT$$

dove

V_i = volume occupato dal vapore del composto i

$n_i = gr_i / PM_i$ è il n° di moli del composto i

si ottiene:

$$\frac{g_{org}}{g_{acq}} = \frac{P^{\circ}_{org} PM_{org}}{P^{\circ}_{acq} PM_{acq}}$$

Il rapporto in peso dei due componenti immiscibili nel distillato dipende dalle loro tensioni di vapore e dai pesi molecolari. I composti organici rispetto all'acqua hanno una P° inferiore ma un peso molecolare maggiore, ed è questo che fa aumentare il valore del rapporto.

L'apparecchiatura è composta da una caldaia per la produzione del vapore, una camera di distillazione in cui è collocata la droga e una serpentina refrigerante per la condensazione dell'acqua e dell'olio essenziale, che vengono poi raccolti in un contenitore in cui si separano per semplice decantazione grazie all'insolubilità e alla diversa densità (**Figura 9**). L'acqua di condensa, detta *idrolato* o *acqua aromatica*, è profumata in quanto contiene la frazione idrofila dell'olio essenziale e trova largo impiego in profumeria. In alternativa può essere riutilizzata per generare vapore e aumentare così la resa dell'olio, ma tale processo, detto *coobazione*, è molto costoso.

La distillazione avviene preferibilmente su droga fresca, raccolta al tempo balsamico e nel momento più opportuno della giornata (variabile a seconda dell'organo vegetativo), dopo averla adeguatamente preparata. Le droghe nelle quali gli oli essenziali sono contenuti in tasche (Mirtacee) o canali secretori (Apiacee, Pinacee) vanno triturate per facilitare la fuoriuscita dell'olio e distillate subito dopo per evitare fenomeni ossidativi. Se invece l'olio essenziale è prodotto da peli ghiandolari (Labiatae, Composite) è preferibile distillare la droga integra. Durante il processo possono verificarsi due tipi di problemi: si può avere un'eccessiva perdita dei componenti più idrofili (es. alcoli) nell'acqua di condensazione e possono avvenire reazioni di decomposizione, una delle più frequenti

Descrizione

Il genere *Ammodaucus*, che appartiene alla famiglia *Apiaceae*, è noto per essere endemico del Nord-Africa e dell'Africa Occidentale, oltre che delle isole Canarie (Abu Zarga et al., 2013).

La specie *A. leucothricus* è una pianta annuale appartenente alla famiglia delle Umbelliferae (*Apiaceae*), è una piccola pianta di altezza compresa tra 12-18 cm con steli ramificati alle estremità. Presenta foglie lievemente carnose e con le punte settate; i fiori bianchi sono raggruppati in ombrelle di 3-4 rami, sono piccoli e formati da 5 petali. La fioritura avviene all'inizio della primavera (tra febbraio e aprile).

Il frutto è un diachenio ovale, 6-12 mm lungo ed è fittamente ricoperto da peli bianchi e setosi; la pianta ha un forte odore di anice (IUNC Centre For Mediterranean Cooperation, 2005).

Aerale di distribuzione

E' endemica del Sahara, si trova anche nelle isole Canarie, in Marocco, in Algeria, in Tunisia e in Egitto. Cresce in uadi (letto di un torrente), su terreno sabbioso-ghiaioso in condizioni aride con precipitazioni annue non superiori a 100 mm (IUNC Centre For Mediterranean Cooperation, 2005).

Droga

Secondo la medicina tradizionale del Sahara Occidentale, si utilizzano i frutti in forma di decotto o infuso in acqua, latte o tè (Abu Zarga et al., 2013).

Usi della medicina tradizionale

I **frutti** vengono bolliti nel latte di cammello per curare varie infezioni respiratorie come laringiti e febbre, oppure tritati e aggiunti all'acqua o al grasso del latte di capra vengono spalmati sulle ferite di vario genere o su quelle da morsi di serpente per togliere l'infiammazione ed evitare che s'infettino. La droga secca, tritata e aggiunta al latte o al tè, viene inalata per curare la sinusite (Volpato, 2010).

Il **decotto** ha attività spasmolitica, allevia i dolori di stomaco e fegato, agisce contro l'indigestione, ha un uso pediatrico per disturbi dell'apparato digerente infantile soprattutto per curare dissenteria, nausea, rigurgito e vomito; ha anche proprietà toniche per il bambino ed infatti è aggiunto al bagno (Haj Said et al., 2015).

In Algeria il decotto delle parti aeree è usato nel trattamento di problemi alla tiroide (Abu Zarga et al., 2013).

I **frutti** sono usati come spezia per insaporire il sugo di carne e spesso sostituiscono il comune cumino: la droga viene infatti definita comunemente *cumino peloso* (Abu Zarga et al., 2013).

E' stato studiato l'utilizzo dell'estratto acquoso dei **frutti** nel ridurre i calcoli renali (Beghalia et al., 2009).

Fitochimica: i costituenti principali

Velasco-Negueruela *et al.* (2006) hanno studiato la composizione chimica, attraverso GC-MS, dell'olio essenziale dei frutti di *A. leucotrichus* raccolto nell'Africa Settentrionale in primavera. I componenti maggiori erano la perillaldeide (63%) e il limonene (26%); altri componenti caratteristici rivelati ma presenti in percentuale minore, sono stati: α -pinene (4,7%), β -pinene (1,4%), 3-idrossiperillaldeide (0,4%), metilperillato (0,5%) e alcol perillico (0,2%); il contenuto totale di monoterpeni era di 99,6% e di sesquiterpeni di 0,2%. Muckensturm *et al.* (1996) hanno analizzato l'estratto etereo dei semi trovando oltre alla perillaldeide, limonene, 3-idrossiperillaldeide e metilperillato, anche l'ammolattone-A e il γ -decalattone.

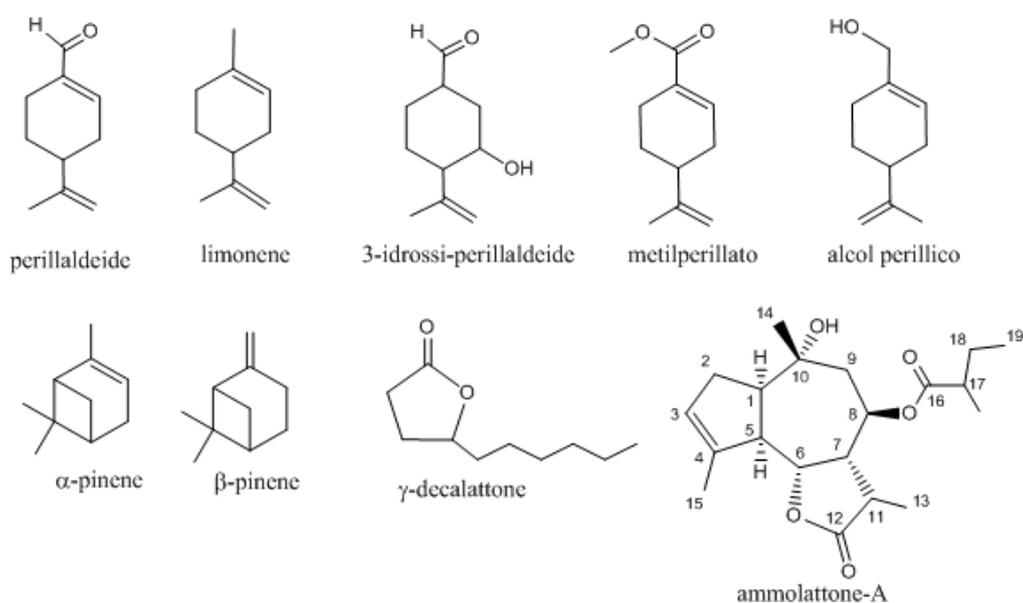


Figura11. Principali metaboliti secondari di *A. leucotrichus*

Potenziati effetti salutistici

El-Haci *et al.* (2014) hanno saggiato l'attività antimicrobica e antifungina dell'olio essenziale di *A. leucotrichus* ottenuto per idrodistillazione dei frutti della pianta; da questo

studio è emersa un'interessante attività dell'olio essenziale nell'inibire la crescita di *Salmonella typhimurium* (MIC: 0.50 µL/mL) e di *Bacillus cereus* (MIC: 0.75 µL/mL).

Una moderata attività inibitoria dell'olio essenziale è stata valutata invece per *Enterobacteria cloacae* (MIC: 1 µL/mL), *Staphylococcus aureus* (MIC: 1 µL/mL) ed *Escherichia coli* (MIC: 1 µL/mL). Halla *et al.* (2018) hanno dimostrato un'attività confrontabile per *S. aureus* e poco rilevante per *E. coli* (MIC: 2.5 mg/mL). Altri autori hanno presentato risultati più interessanti e discordanti con i precedenti per *S. aureus* con MIC= 46 µg/mL (Dahmane et al., 2017) e 2 µg/mL (Aloui et al., 2014). Infine, El-Haci *et al.* (2014) hanno dimostrato un'interessante attività antifungina dell'olio essenziale specialmente contro *Candida albicans* (MIC: 0.75 µL/mL), *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus flavus* (MIC: 0.25-0.50 µL/mL).

In particolare, per quanto riguarda *A. flavus*, Tian *et al.* (2015), hanno mostrato l'alta capacità di perillaldeide, composto principale dell'olio essenziale di *A. leucotrichus*, di inibire la crescita dell'*A. flavus* e la produzione delle aflatossine B1(AFB1) da parte del fungo stesso. Questa particolare azione ha suggerito l'utilizzo degli oli essenziali, contenenti questo composto, come fungicidi naturali, utili nel prevenire l'attacco di questo fungo nei confronti di alcuni alimenti particolarmente soggetti, come i pomodorini.

Un altro importante studio, condotto da Beghalia *et al.* (2009), ha mostrato la capacità dell'estratto acquoso dei frutti di *A. leucotrichus* di inibire la cristallizzazione dell'ossalato di calcio *in vitro*, aspetto che potrebbe suggerire l'utilizzo della droga nella cura e nella prevenzione dei calcoli renali. E' stata infatti osservata la formazione di cristalli di ossalato di calcio, a diversi intervalli di tempo, in presenza e in assenza dell'estratto acquoso di *A. leucotrichus* e si è notato come l'aggiunta dell'estratto abbia inibito la crescita dei cristalli. Il meccanismo d'azione con cui avviene l'inibizione, non è noto, come pure non è stata determinata la molecola responsabile dell'attività.

Halla *et al.* (2018) hanno determinato un'attività antiossidante non degna di nota (IC₅₀= 27.82 mg/mL) mediante test del DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile), confermata anche da Dahmane et al. (2017).

L'attività antinfiammatoria dell'olio essenziale è stata condotta su macrofagi RAW 264.7 stimolati con lipopolisaccaride per la produzione del mediatore infiammatorio ossido nitrico. L'olio ha dimostrato un forte effetto antinfiammatorio IC₅₀=11.70 µg/mL se confrontato con desametasone, utilizzato come controllo positivo (Halla et al, 2018). Tale attività è stata correlata alla presenza di perillaldeide e limonene come composti principali dell'olio (Miguel, 2010).

1.6.2 *Atriplex halimus*

Classificazione scientifica

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Caryophyllales

Famiglia: Amaranaceae

Genere: *Atriplex*

Specie: *A. halimus* L.



Figura 12 *A. halimus* (Barrera Martínez et al., 2007)

Descrizione

È una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Amaranaceae; morfologicamente, le specie appartenenti a questa famiglia, sono caratterizzate dal possedere radici profonde e penetranti, atte ad assorbire la maggior quantità d'acqua possibile e le foglie sono conformate in modo tale da ridurre la perdita d'acqua dovuta alla traspirazione (Walker *et al.*, 2014). È una pianta xero-alofita che resiste bene alla siccità e alle condizioni saline (Hassine et al., 2008).

È un arbusto perenne di altezza tra i 2 e i 3 m, ramificato alla base con la corteccia di colore grigio-bianco; le foglie (10-30 mm lunghe e 5-20 mm larghe) hanno forme variabili dalla deltoide, sferica alla lanceolata. L'anatomia fogliare è di tipo Kranz, cioè mostra una guaina di cellule clorenchimatiche di grandi dimensioni che circondano i tessuti vascolari. L'anatomia Kranz è associata al metabolismo ad alta efficienza fotosintetica, che prende il nome di C4. Nel metabolismo C4 l'anidride carbonica si lega al piruvato per formare l'acido ossalacetico, composto a quattro atomi di carbonio, da cui il nome del ciclo metabolico. Questo meccanismo avviene nel mesofillo, dove questo composto è trasformato in acido malico, in seguito, una volta raggiunte le grandi cellule che compongono la guaina che circonda i vasi vascolari, è decarbossilato e l'anidride carbonica liberata entra nel ciclo di Calvin, mentre il piruvato ritorna nel mesofillo dove inizia un nuovo ciclo. I fiori sono ermafroditi (ma possono essere anche unisessuali sulla stessa pianta) e sono impollinati dal vento. I fiori maschili crescono principalmente verso l'alto, sono privi di brattee e hanno un perigonio 3-5 partito con tepali color giallino; i fiori femminili, crescono verso il basso, hanno invece 2 brattee. I frutti sono racchiusi dalle brattee di diametro di 6 mm e maturano in autunno-inverno. I semi sono circolari, piatti e hanno un diametro compreso tra 0.8-1.2 mm (Walker et al., 2014).

Aerale di distribuzione

Si estende dalle zone semi-aride fino a quelle umide, è molto comune lungo le coste del Bacino del Mediterraneo fino all'Asia occidentale, includendo Portogallo, Francia, Spagna (e le isole Canarie), Italia, Grecia, Turchia, Cipro, Siria, Libano, Giordania, Tunisia, Marocco, Algeria, Egitto e Arabia Saudita. Piantagioni su larga scala sono ormai presenti nell'Africa settentrionale e in Iran, mentre coltivazioni di dimensioni più modeste sono in via di sviluppo in Israele, Giordania, Siria, Africa meridionale, Messico, Australia e Stati Uniti. Questi arbusti foraggeri sono stati introdotti sia con l'obiettivo di colmare il deficit alimentare degli animali allevati che per migliorare il contenuto proteico della dieta, oltre che per il loro elevato adattamento ai suoli salini e l'elevata efficienza d'uso dell'acqua principalmente legata al metabolismo di tipo C4. Cresce in terreni aridi e semi-aridi con una bassa percentuale di precipitazioni annue (100-400 mm), ha bisogno di aree soleggiate e prive di ombra, terreno neutro o alcalino e tollera i suoli salini e la siccità (Walker et al., 2014).

Droga

Secondo la medicina tradizionale dell'Africa Settentrionale si utilizzano le foglie in forma di decotto o infuso in acqua, latte o tè (Walker et al., 2014).

Usi della medicina tradizionale

Usi culinari:

- Le **foglie** possono essere mangiate crude o cotte; sono piuttosto salate, solitamente sono mangiate come insalata o cucinate al vapore come sostitutive degli spinaci.
- I **semi** macinati possono essere aggiunti al pasto e usati come addensante nelle zuppe oppure mischiati con i cereali nella preparazione del pane (Walker et al., 2014).

Usi medicinali:

- Il decotto delle foglie è usato come carminativo per favorire l'espulsione dei gas intestinali, come lassativo, utilizzato per curare i dolori di stomaco e intestino, nel trattamento del diabete, dei problemi cardiaci, dell'asma, delle bronchiti e della febbre (Walker et al., 2014), oppure è aggiunto al bagno per curare i reumatismi (Walker *et al.*, 2014).

Altri usi:

- Come foraggio per animali da pascolo (sono stati eseguiti degli studi sui valori nutritivi) (El Shaer, 2010);

- Per il recupero di terreni contaminati da metalli poiché *A. halimus* è in grado di estrarre dal terreno i metalli e accumularli nelle sue radici (Pèrez-Esteban et al., 2013).

Fitochimica: i costituenti principali

Emam (2011) ha studiato i componenti bioattivi di *A. halimus*: ha analizzato analisi gli acidi grassi tramite GC-MS nell'estratto di foglie, ottenuto con il metodo Soxhlet, rivelando la presenza di: acido oleico, stearico, palmitico, palmitoleico, miristico, linoleico e linolenico.

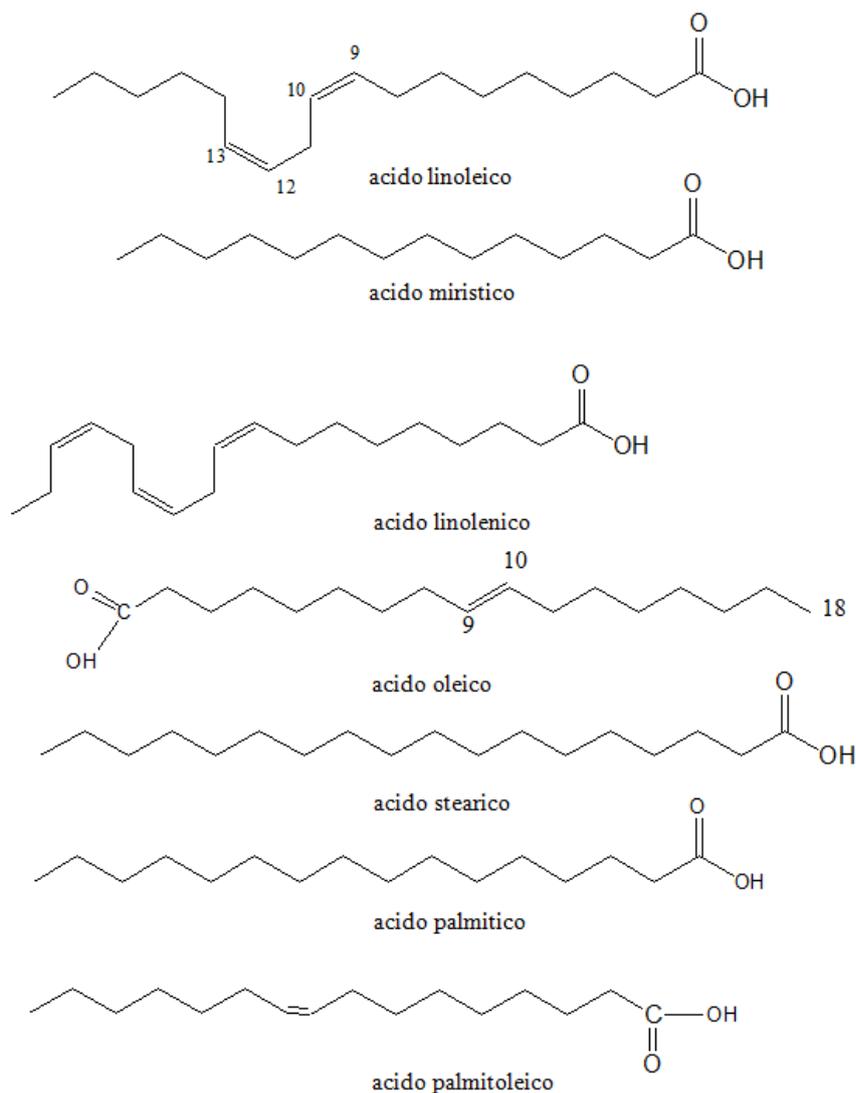


Figura 13. Principali acidi grassi presenti in *A.halimus*

Sempre in GC-MS è stata analizzata la parte insaponificabile dell'estratto che ha messo in evidenza la presenza di colesterolo e stigmasterolo.

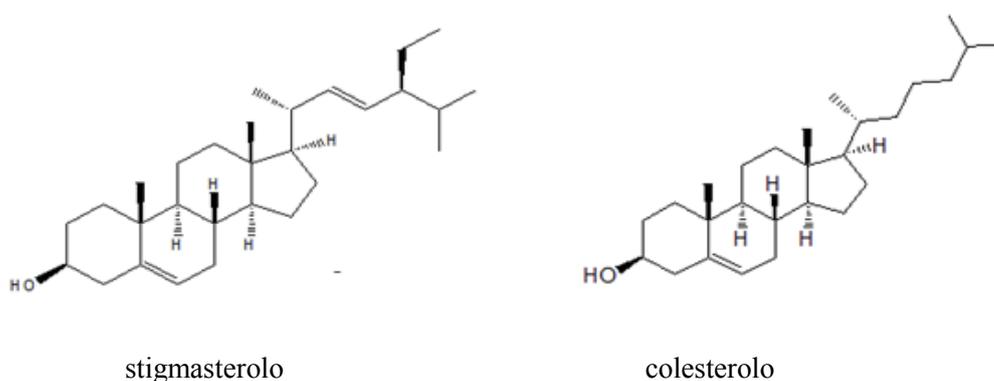


Figura 14. Principali steroli presenti in *A.halimus*

Inoltre, nell'estratto ottenuto con etilacetato, si è vista la presenza di flavonoidi glicosilati come isorammetina-3-O-glucopiranoside, rutina-4'-7-dimetil etero, vicenina-2, isoorientina, 4-metossi-7-glucoside-5-idrossiisoflavone, naringenina-4'-O-ramnopiranoside ed esperidina, acidi fenolici come il p-idrossibenzoico, il clorogenico, il cinnamico, il ferulico, il salicilico, il gallico e il p-cumarico.

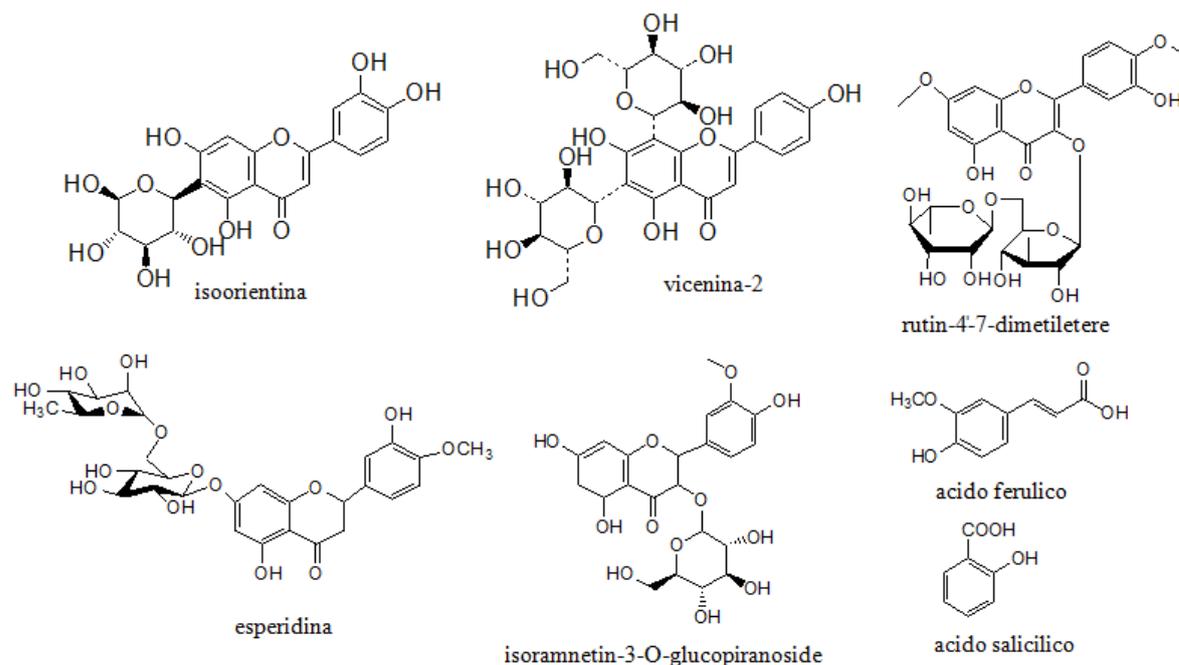


Figura 15. Principali fenoli presenti in *A.halimus*

Nell'estratto in cloroformio sono stati rivelati alcaloidi come piperina, efedrina, berberina e palmatina.

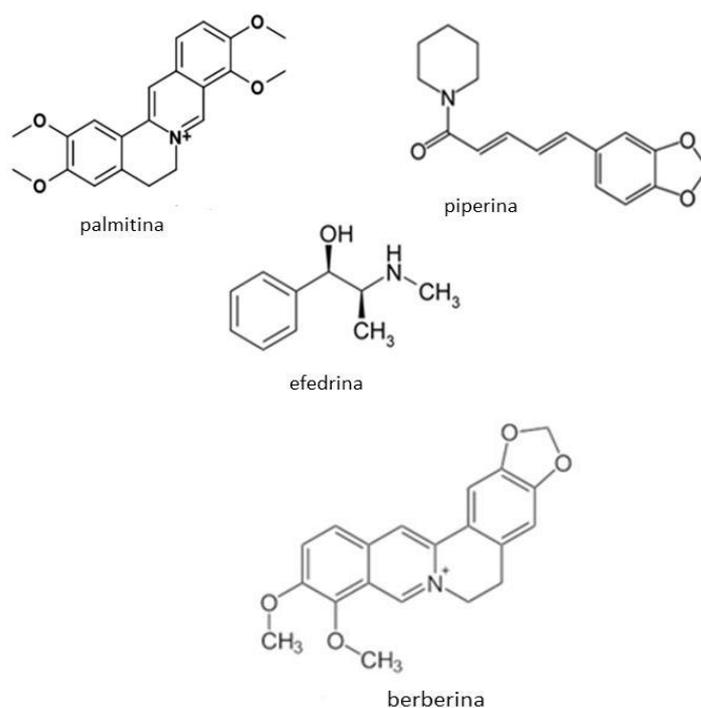


Figura 16. Principali alcaloidi presenti in *A. halimus*

Potenziati effetti salutistici

L'estratto metanolico delle foglie di *A. halimus* ha mostrato un'elevata attività antibatterica contro *Listeria ivanovii* misurata come diametro di inibizione della crescita, moderata azione contro *S. aureus*, *B. cereus* e *K. oxytoca* (Abdel-Rahman et al., 2011).

Dell'estratto metanolico è stata saggiata anche l'attività antifungina che è stata significativa nei confronti di *Fusarium solani* (% di inibizione: 91,4%) e moderata verso *Bipolaris oryzae* (46,7%) (Abd-Ellatif et al., 2011).

Uno studio condotto da Chikhi et al. (2014), ha messo in evidenza l'attività antidiabetica dell'estratto acquoso delle foglie di *A. halimus*, saggiato su ratti con diabete indotto da streptozotocina. L'esperimento è stato condotto su quattro gruppi, ognuno composto di cinque ratti, gruppo 1 con ratti normali non trattati, gruppo 2 con ratti diabetici non trattati, gruppo 3 con ratti diabetici trattati con l'estratto acquoso di *A. halimus* (200 mg/kg di peso corporeo) e gruppo 4 con ratti normali trattati con l'estratto, con somministrazione ogni giorno per 30 giorni. La ricerca ha dimostrato: 1) la capacità dell'estratto di ridurre del 54% il contenuto di glucosio nel sangue al termine dell'intero ciclo di trattamento e 2) una riduzione del 23% e del 41% dopo 2 e 3 ore, rispettivamente, dalla somministrazione dell'estratto.

1.6.3 *Matricaria pubescens*

Classificazione scientifica

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Asterales

Famiglia: Asteraceae

Genere: *Matricaria*

Specie: *M. pubescens* (Desf.) Sch. Bip.



Figura17. *M. pubescens* (Barrera Martínez et al., 2007)

Descrizione

Il genere *Matricaria*, appartenente alla famiglia delle Asteraceae, include diverse specie; le più diffuse in Europa sono *Matricaria chamomilla* (o *Chamomilla recutita*, definita con il nome volgare di camomilla comune), pianta erbacea annuale diffusa nei luoghi incolti dell'Europa, e *Chamaemelum nobile* (o *Anthemis nobilis*, comunemente camomilla romana), pianta erbacea perenne pubescente.

M. pubescens è una pianta erbacea endemica dell'Africa settentrionale. Il nome matricaria deriva dal latino *matrix, matricis*, che significa “utero”, con riferimento al potere calmante dei disturbi mestruali.

La *M. pubescens* è una piccola pianta annuale, con altezza tra 10-20 cm, che raramente supera 40 cm, formata da numerosi e sottili fusti prostrati, che diventano eretti, di colore verde scuro e lievemente ramificati.

Le foglie profondamente settate con ciascun lobo terminante con una punta bianca, sono leggermente carnose e di lunghezza compresa tra 10 e 20 mm.

I fiori tubulosi gialli sono raggruppati in capolini a disco emisferico con un diametro di circa 5-8 mm e si trovano alle estremità dei fusti. I frutti sono acheni provvisti di un piccolo pappo membranoso per favorire la dispersione. L'intera pianta risulta avere un odore davvero gradevole (IUNC Centre for Mediterranean Cooperation, 2005).

Areale di distribuzione

La pianta è endemica dell'Africa settentrionale e molto comune nel Sahara algerino. La fioritura avviene in primavera nel nord del Sahara Algerino, mentre nella parte centrale avviene dopo le precipitazioni piovose. Cresce in condizioni aride con media 100 mm di

pioggia l'anno; si trova sempre negli letti di torrenti non salini, con terreno sabbioso-argilloso e occasionalmente si trova in terreni ghiaioso-sabbiosi. La pianta è raccolta intera in primavera e venduta nei market (IUNC Centre for Mediterranean Cooperation, 2005).

Droga

Secondo la medicina tradizionale dell' Africa settentrionale si utilizzano le parti aeree della pianta (foglie, fiori, fusti) in forma di decotto o infuso in acqua, latte o tè (IUNC Centre for Mediterranean Cooperation, 2005).

Uso tradizionale nella medicina locale

E' molto apprezzata come erba medicinale, è usata principalmente nella forma di **decotto** in acqua o nel latte oppure aggiunta al tè, per curare i disturbi gastro-intestinali, i calcoli, mal di gola, tonsilliti, faringiti, bronchiti, asma, otiti, dolori di denti, febbre, dolore ai reni e infezioni urinarie (Barrera Martínez et al., 2007); un massaggio con l'olio essenziale è indicato per i disturbi reumatici, nevralgie e sciatica (IUNC Centre for Mediterranean Cooperation, 2005).

Fitochimica: costituenti principali

Djellouli et al.(2013) hanno condotto uno screening fitochimico su un estratto delle parti aeree di *M. pubescens*, ottenuto attraverso Soxhlet; da queste analisi è risultato che l'estratto ha un buon contenuto di terpeni, flavonoidi glicosilati, steroidi e cardenolidi.

Gherboudj et al.(2012) hanno studiato la composizione di un estratto metanolico al 70% delle parti aeree di questa specie: i componenti principali sono risultati essere: apigenina, luteolina, quercetina, apigenina 7-O-glucoside, luteolina 7-O-glucoside, quercetina 3-O-glucoside, erniarina, 3,4-diidroerniarina.

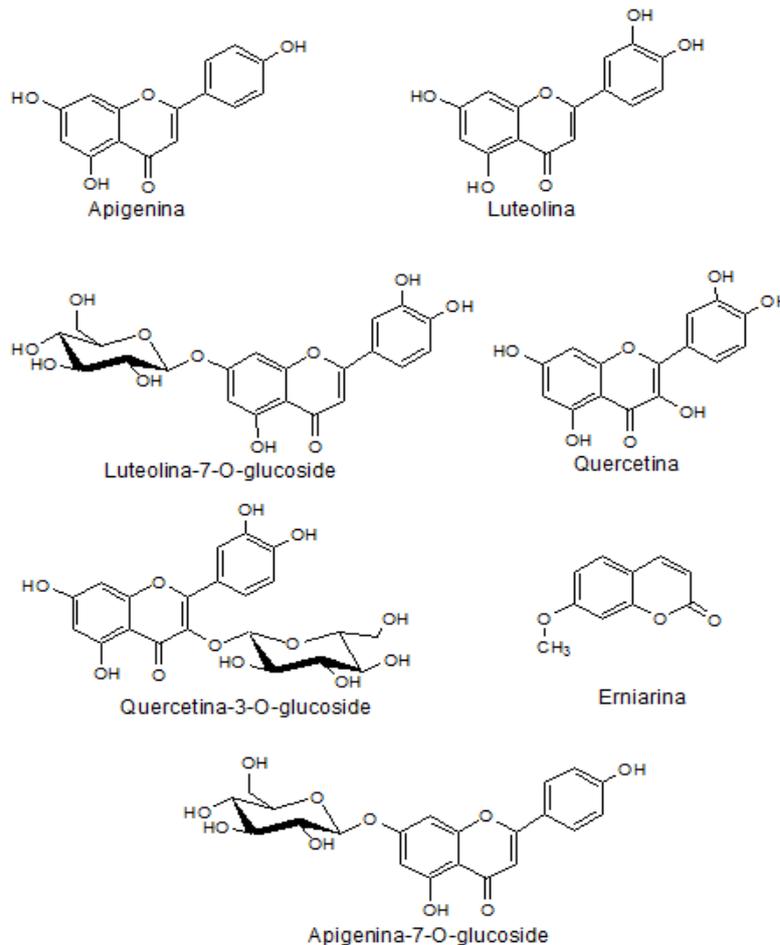


Figura 18. Principali molecole presenti in *M.pubescens*

Potenziati effetti salutistici

Makhloufi *et al.* (2012) hanno studiato l'attività antibatterica dell'estratto etanolic di parti aeree di *M. pubescens*, che ha mostrato la capacità dell'estratto di inibire la crescita di *L. monocytogenes* e *S. aureus* con MIC di 0.5 e 0.833 mg/mL, rispettivamente.

Un altro studio ha dimostrato l'attività inibitoria dell'estratto acquoso di *M. pubescens* nei confronti dell' α -amilasi, enzima che idrolizza i carboidrati a maltosio (dimero di glucosio), suggerendo un'attività antidiabetica dell'estratto, perché l'inibizione dell'enzima porta a una minore produzione di maltosio, e quindi di glucosio, nel sangue (Khacheba *et al.*, 2014).

Uno studio *in vivo* su ratti trattati con un estratto metanolic, trattato selettivamente per isolare alcaloidi ma non caratterizzato chimicamente, ha fornito indicazioni interessanti sull'attività antiinfiammatoria e antinocicettiva (Metrouh-Amir & Amir, 2018).

1.6.4 *Anvillea garcinii* subsp. *radiata*

Classificazione scientifica

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Asterales

Famiglia: Asteraceae

Genere: *Anvillea*

Figura 19. *A.garcinii* subsp. *radiata* (Barrera Martinez et al., 2007)

Specie: *Anvillea garcinii* subsp. *radiata* (Coss. & Durieu) Anderb.

Sinonimo: *Anvillea radiata* Coss. & Durieu



Descrizione

Il genere *Anvillea*, appartiene alla famiglia delle Asteraceae.

Anvillea garcinii subsp. *radiata* è un arbusto basso lanuginoso. I fusti sono molti e ramificati, i vecchi rami sono rigidi, intricati, ricoperti di corteccia bianca. Le foglie sono 0.5-1.2 x 0.2-0.3 cm, obovate-spatulate, con margine irregolarmente dentato o ondulato, affusolate verso la base e auricolate, pubescenti con ghiandole visibili su entrambe le facce. I capolini sono 1.5-2.5 cm di diametro: nel periodo dell'antesi sono solitari, pochi, irradiati o discoidi. Il peduncolo è di spessore di 2-5 mm; involucri 1.2-1.8 cm, ampiamente campanulato. Le brattee sono 2-3-seriate, le più esterne, da 5 a 8, formano una coppa rigida, che termina con appendici appiattite di 2-3 mm. Le brattee interne da 10 a 25, sono 1-2-seriate, con dimensioni 1-1.4 x 0.2-0.3 cm, lanceolate, acuminate, pubescenti, che diventano spinescenti con l'età. I fiori del raggio sono circa 15-25, con lunghezza 1.5-2.2 cm; i fiori del disco sono numerosi con corolle di diametro 5-8 mm, strette alla base e gialle. Gli acheni hanno dimensioni 1-1.5 x 0.3-0.4 mm, sono di forma irregolare, con peli a forma di ancora e il pappo è assente (Barrera Martinez et al., 2007).

Areale di distribuzione

È endemica del Sahara, distribuita nell'Africa dal nord, nel Sahara Occidentale, in Marocco, Algeria, Tunisia, Libia ed Egitto.

Droga

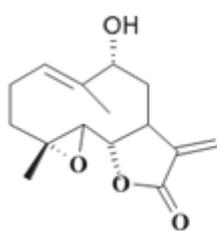
È costituita dalle foglie e dalle parti aeree della pianta.

Uso tradizionale nella medicina locale

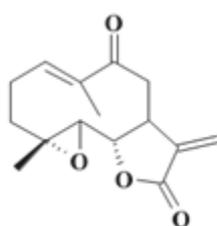
Il decotto delle parti aeree preparato da solo o con altre piante (come *A. leucotrichus*), oppure come infuso nel tè è usato per problemi ginecologici, problemi catarrali, diabete, infertilità, disturbi gastro-intestinali e per le infezioni urinarie (Barrera Martínez et al., 2007; Volpato 2010).

Fitochimica: costituenti principali

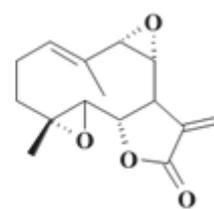
Tyson e al. (1981) hanno studiato un sesquiterpene lattone, partenolide-9-one, la cui presenza è stata confermata anche da El Hassany e al. (2004) insieme a 9 α -idrossipartenolide ed 8 α ,9 α -epossipartenolide.



9 α -idrossipartenolide



partenolide-9-one



8 α ,9 α -epossipartenolide

Figura 20. Principali lattoni sesquiterpenici

Boukhris *et al.* (2016) hanno determinato il contenuto di flavonoidi ed fenoli, Destandau *et al.* (2015) hanno utilizzato la cromatografia di partizione centrifuga (CPC) in gradiente di eluizione per separare due germacranolidi puri (9 α -idrossipartenolide, 9 β -idrossipartenolide) e flavonoidi (nepetina o eupafolina, isoramnetina, jaceosidina, patuletina, spinacetina e loro derivati glicosilati, quercetina 3-O-glucoside), clorofilla e pigmenti da parti aeree di *A. radiata*. Per identificare i composti isolati, ogni frazione di CPC è stata analizzata in HPLC-DAD-ESI / MS.

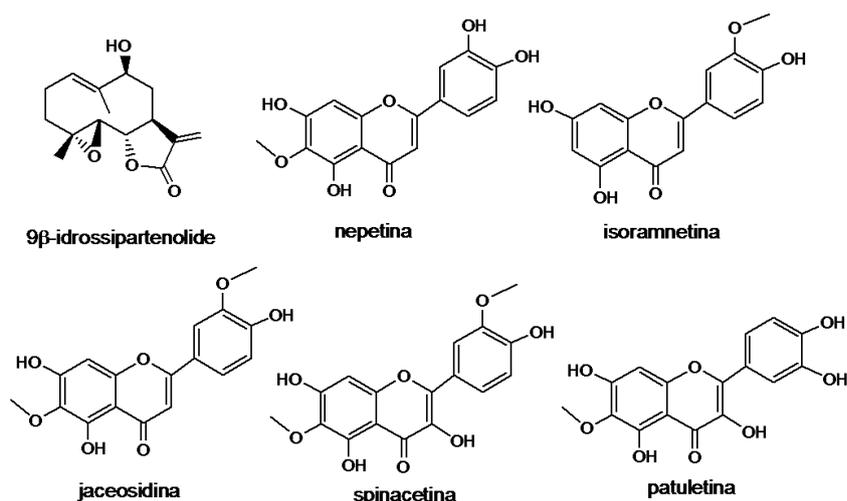


Figura 21. Molecole isolate da Boukhris *et al.* (2016)

I composti fenolici sono stati estratti selettivamente dalle parti aeree di *A. radiata* usando l'estrazione accelerata del solvente (ASE) in due fasi. Date le due famiglie molecolari (flavonoidi e germacranolidi) descritte come presenti nel materiale vegetale, è stata effettuata una prima fase di estrazione utilizzando cloroformio come solvente di estrazione per rimuovere i germacranolidi, i composti più abbondanti. I composti fenolici minori sono stati quindi estratti e arricchiti in modo selettivo dai residui vegetali mediante metanolo. La caratterizzazione di venticinque composti fenolici nell'estratto metanolico è stata eseguita utilizzando analisi HPLC-DAD-ESI-MS/MS e HPLC-HRMS. Sette composti corrispondevano all'acido clorogenico e a derivati dell'acido dicaffeoilchinico e diciotto flavonoidi (dai quali cinque agliconi e tredici glicosidi) furono identificati, di alcuni per la prima volta.

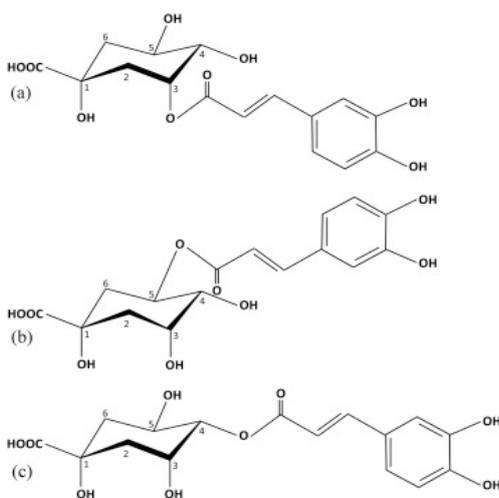


Figura 22. Strutture degli isomeri dell'acido caffeoilchinico: (a) acido 3-caffeoil chinico, (b) 5-caffeoil chinico, (c) 4-caffeoil chinico.

Merajuddin Khan *et al.* (2016) hanno analizzato l'olio essenziale ottenuto dai fiori e dalla parte aerea di *A. garcinii* subsp. *radiata* con GC-FID e GC-MS: nell'olio dei fiori sono stati identificati 126 composti, mentre 119 in quello delle parti aeree che rappresentano il 95,7% e 94,9% della composizione totale, rispettivamente. I componenti principali nell'olio di fiori sono bornil acetato (33.7%), *cis*-nerolidolo (7.3%) e canfene (6.1%), mentre per l'altro sono *cis*-nerolidolo (16.0%), terpinen-4-olo (10.4%) e cabreuva ossido B (6.4%).

Possibili effetti salutistici

Kandouli *et al.* (2017) hanno studiato le attività antidiabetica, antinfiammatoria, antiossidante di sei estratti acquosi e organici. Gli estratti idroalcolici, in etilacetato, acquosi e butanolici non erano tossici sulle cellule di fibroblasti sani di polmone umano, su A549 cellule cancerose del polmone (400 µg / mL) o quando somministrati per via orale in topi sani (2000 mg / kg): hanno esercitato un'azione ipoglicemizzante dose-dipendente nei topi diabetici, che era massima alla dose di 150 mg / kg. Dopo aver somministrato questa dose per 12 settimane, gli estratti hanno dimostrato una migliorata capacità di controllo del peso corporeo, di recupero dei livelli di glucosio plasmatico e di insulina, riduzione dello stress ossidativo nel sangue, nel miocardio e a livello muscolo-scheletrico e migliorati lo stato iperlipidemico e antinfiammatorio. Inoltre, le complicanze legate al diabete erano ottimizzate in modo ottimale dalla terapia orale basata su dosi dimezzate (75 mg / kg) di una miscela di estratto acquoso e metformina.

Le attività antitumorale e anti-HIV di germacranolidi *in-vitro* sono state valutate per i composti isolati nello studio di Sattar *et al.* (1996). Tali molecole sono state valutate dal National Cancer Institute (NCI) su uno spettro di circa 60 linee cellulari tumorali umane. Il composto che ha mostrato più alta attività ($ED_{50}=0.05-4.38$ µg / mL) è il partenolide-9-one: aumentando il grado di insaturazione aumenta l'attività. I composti erano inattivi nei test anti-HIV.

Snoussi *et al.* (2017) hanno studiato l'attività antifungina di quattro estratti di *A. radiata*, preparati con gradiente di solventi (etere di petrolio, cloroformio, etil acetato e metanolo): i risultati dei test antifungini indicavano un grande potenziale, in particolare per gli estratti metanolici, di attività antifungina specialmente verso *Aspergillus* spp. (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. niger*).

Perveen *et al.* (2018) hanno studiato l'effetto epatoprotettivo di estratti etanolic, cloroformico e butanolic, usando il tetracloruro di carbonio modello di tossicità del fegato. La frazione cloroformica, alla dose di 400 mg / kg, ha dimostrato un significativo

effetto epatoprotettivo confrontato alla silimarina in tutto il siero e nei parametri dei tessuti. La citotossicità di tutti gli estratti e i composti isolati, garciniammine (derivati amminici dei sesquiterpenlattoni), sono stati valutati contro cinque linee cellulari tumorali umane: MCF-7, HCT-116, HepG2, Hela e A-549. I risultati hanno indicato che le frazioni cloroformiche e butanoliche e 4 composti amminici dimostravano attività citotossica significativa contro queste linee cellulari.

Rustaiyan *et al.* (2011) hanno studiato gli oli essenziali ottenuti da idrodistillazione dalle foglie e dai fiori di *A. garcinii*, via GC e GC / MS.

I costituenti principali sono: α -pinene (16.1%), limonene (12.9%) e sabinene (12.5%) per l'olio essenziale delle foglie, bornil acetato (41.5%), il canfene (12.4%), sabinene (8.3%), α -pinene (7.5%) e limonene (6.5%) per quello dei fiori. L'attività antimicrobica è stata effettuata utilizzando il metodo di diffusione in agar. La minima concentrazione inibitoria (MIC) è compresa tra 2.5 e 10 mg/mL su tre Gram-positivi, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e due Gram-negativi, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*.

1.6.5 *Cleome amblyocarpa*

Classificazione scientifica

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Brassicales

Famiglia: Cleomaceae

Genere: *Cleome*

Specie: *Cleome amblyocarpa* Barratte & Murb.

Sinomino: *Cleome africana* Botsch.

Figura 23. *C. amblyocarpa* (Barrera Martinez et al., 2007)



Descrizione

C. amblyocarpa è una specie appartenente alla famiglia delle Cleomaceae. Erba annuale o perenne, alta fino a 1,5 m, appiccicosa e aromatica con fusto ghiandolare-pubescente. Foglie alterne, composte trifoliate; foglioline ellittiche o oblanceolate, la mediana fino a 5 x 1,8 cm, le laterali un po' più corte, ghiandolari-pubescenti su entrambe le superfici; il picciolo è lungo fino a 3 cm. Sono presenti piccole brattee. I sepali sono lunghi 2-3 mm, ghiandolari. I petali sono giallastri con venature viola, lunghi 6-11 mm, brevemente artigliati. Gli stami sono 6 o 7. Le silique hanno dimensioni 60-80 (minimo 40) x 3-3.5

mm, sono sparse o spesso pendenti alla maturità; gineceo è lungo 2-6 mm. I semi hanno diametro di 1.5-1.75 mm, sono di colore bruno-nerastro, pelosi (IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, 2005).

Areale di distribuzione

Distribuita nell'Africa dal nord, dal Marocco all'Arabia. È stata confusa in passato con *C. arabica* L. che ora è riconosciuta essere presente nell'area del Sinai, dall'est dell'Egitto sino al sud dell'Iran

Droga

Si usano le parte aeree o le foglie.

Uso tradizionale nella medicina locale

Il decotto preparato ponendo le parti aeree triturate poste in latte o con acqua si usa per la prevenzione di aborti e per la cura delle bronchiti.

Le foglie secche e triturate, mescolate con olio o grassi animali, costituiscono una pomata per alleviare i dolori articolari e muscolari, le foglie cotte in grasso di cammello formano una poltiglia che si pone sopra la cicatrice.

Fitochimica: costituenti principali

Harras *et al.* (1995) hanno studiato e isolato dammarani triterpeni in *C. amblyocarpa*: cleocarpanolo (1), cabraleaidrossilattone (2), idrossipropilamblionolo (3), ambliene (4), cleomblinolo A (5) e il suo isomero 3 α -isocleomblinolo A (6), cleomblinolo B (7).

Sono stato isolati anche i flavonoidi crisoeriolo e crisoeriolo 7-glucoside.

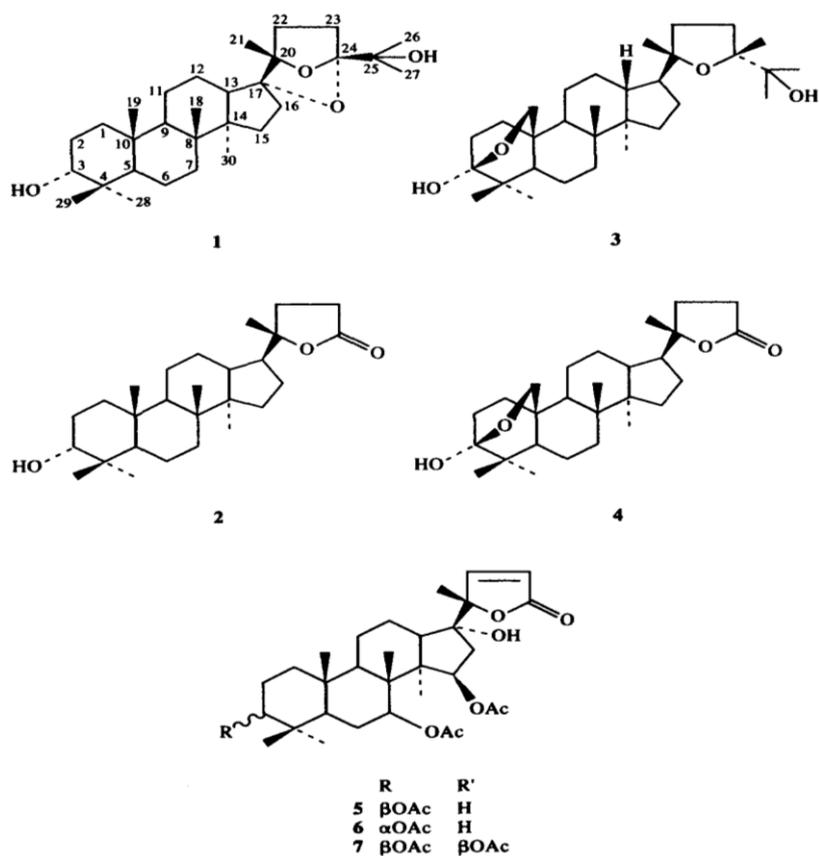


Figura 24. Damarrani diterpeni presenti in *C.amblyocarpa*

Tan *et al.* (1995) isolarono sette flavonoidi, sei dei quali ben noti come apigenina, canferolo 3-glucoside, quercetina 3-glucoside-7-ramnoside, isoramnetina 3- glucoside-7-ramnoside, canferolo 3,7-diramnoside, canferolo 7-ramnoside e canferolo 7-metil etere 3-ramnoside.

Possibili effetti salutistici

Ezdiri *et al.* (2013) hanno condotto uno studio sulle proprietà tossiche (test dell'assorbimento al rosso neutro) e genotossiche (test della cometa alcalina) *in vitro* di *C. amblyocarpa*. L'estratto metanolico della pianta intera appariva non genotossico alle concentrazioni sub-tossiche.

Merajuddin *et al.* (2008) hanno studiato l'attività antibatterica, antifungina e citotossica *in vitro* di amblyone. L'attività antibatterica con il metodo del disk diffusion ha rivelato valori di MIC tra 8 to 64 µg/mL per 4 Gram-positivi (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*) e sei Gram-negativi (*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*). Lo screening antifungino ha messo in evidenza piccole zone di

inibizione contro *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus aryzae*, mentre *Candida albicans* era resistente a questo composto. L'attività citotossica determinata con il test brine shrimp nauplii era moderata con LC₅₀ di 13.25 µg/mL. La capacità antiossidante *in vitro* degli estratti butanolic, metanolico-acquoso, acquoso ed esanico di *C. amblyocarpa* tramite i saggi del DPPH, ABTS, metallo chelante (MCA), radicale idrossile si è rivelata interessante per gli estratti butanolic, quando confrontati con i controlli positivi (Al-Humaidi et al., 2017).

1.6.6 *Nucularia perrinii*

Classificazione scientifica

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Caryophyllales

Famiglia: Amaranthaceae

Genere: *Nucularia*

Specie: *Nucularia perrinii* Batt.



Figura 25. *N.perrinii* (Barrera Martinez et al., 2007)

Descrizione

È un arbusto che raggiunge una dimensione di 20-60 (70) cm di altezza, legnoso alla base, con tronco molto ramificato. I rami sono lunghi fino a 50 cm. Le foglie opposte sono carnose, coriacee. I giovani ramoscelli sono biancastri con la parte terminale rossastra.

I fiori molto piccoli sono gialli. Una specie di grande guscio duro e legnoso si sviluppa attorno al frutto irregolare (IUNC Centre For Mediterranean Cooperation, 2005).

Areale di distribuzione

Sulla base dei dati disponibili nella letteratura botanica, la distribuzione di *N. perrinii* è collocata all'interno dell'area geografica che include Libia, Ciad, Niger, Mali, nel sud dell'Algeria, Mauritania e Sahara occidentale. Si trova in luoghi sabbiosi e pietrosi a 1000 m di altitudine

Droga

La droga è costituita dalle foglie.

Uso tradizionale nella medicina locale

Le foglie in infuso si usano contro l'asma, per risciacqui per dolori dentali, gli impacchi con foglie fresche o triturate e impastate con acqua per ferite infettate e reumatismi.

N. perrinii è usata dai Sahrawi per scopi medicinali ed etnoveterinari. I Sahrawi sfasciano le foglie fresche di askaf e le mescolano con acqua per formare un impiastro applicato localmente per trattare le infezioni e le ferite della pelle. Gli steli essiccati e in polvere sono aggiunti al tè come digestivo, per il mal di stomaco e il dolore addominale, mentre i frutti secchi vengono aggiunti al tè in modo simile per il trattamento del diabete e dell'ipertensione.

Volpato e Di Nardo (2017), nel loro studio sui foraggi per cammelli nel Sahara Occidentale, hanno messo in evidenza che *N. perrinii* ha un uso zootecnico e costituisce un ottimo pasto per cammelli e pecore: è considerato "il pasto migliore e più forte per i cammelli", che fornisce agli animali sali, forza e miglior rapporto peso/grasso. L'importanza di *N. perrinii* per i Sahrawi si riflette nelle caratteristiche organolettiche che conferisce al latte di cammello, alimento base del Sahrawi. Il popolo riconosce in dettaglio i rapporti tra i foraggi e il gusto, l'odore, o la salute e le proprietà nutrizionali del latte di cammello. Le pratiche Sahrawi intorno al gusto e all'olfatto dei prodotti di cammello sono incorporate nei valori e nell'identità culturale Sahrawi.

1.6.7 *Anastatica hierochuntica*

Classificazione scientifica

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Capparales

Famiglia: Brassicaceae

Genere: *Anastatica*



Specie: *Anastatica hierochuntica* L. **Figura 26.** *A. hierochuntica* (Barrera Martinez et al., 2007)

(sinonimo: *Myagrammum hierochunticum* (L.) Crantz)

Descrizione

È una piccola specie erbacea annuale che raramente cresce più di 15 centimetri. È ramificata dalla base con rami solitamente ascendenti, spesso arrotolata verso l'interno quando è secca, densamente pubescente con peli stellati. Foglie lunghe 10-20 mm, larghe

5-10 mm, spatulate, con 3-5 lobi poco profondi verso l'apice o su tutta la foglia; gambo più corto della lamina. I piccoli fiori bianchi, ascellari sono sessili. I petali sono circa 2 mm di lunghezza, i sepali 1.5 mm, gli stami circa 1.5-1.7 mm. I frutti ovoidi-globosi hanno un diametro di circa 4 mm. Il seme misura 1.5 mm di lunghezza ed è ovoidale. Il ciclo vitale di questa specie annuale si conclude all'inizio della stagione secca, quando la pianta disidratandosi ripiega i rami in una massa sferoidale compatta: questa protegge i semi e ne previene una dispersione prematura. I semi dormienti possono rimanere vitali per anni. Quando bagnata, i rami si allargano e i semi vengono dispersi dalla pioggia battente. Nel giro di poche ore questi germogliano e danno vita alla nuova generazione (IUNC Centre For Mediterranean Cooperation, 2005).

Areale di distribuzione

Sulla base dei dati disponibili nella letteratura botanica, la mappa di distribuzione di *A. hierochuntica* è all'interno dell'area geografica africana che include Libia, Ciad, Niger, Mali, Algeria, Mauritania e Sahara occidentale, in Asia minore, in Israele, Siria, Iraq, Giordania e Pakistan.

Droga

Si usano le parti aeree.

Uso tradizionale nella medicina locale

Le foglie in infuso si usano contro l'asma, per dolori dentali e addominali.

Il decotto preparato con acqua si utilizza per indurre contrazioni uterine, per cardiopatie, per infezione urinarie e infertilità.

Fitochimica: costituenti principali

Yoshikawa *et al.* (2003) hanno isolato nuovi flavonoidi, anastatina A e B, dall'estratto metanolico di piante intere di *A. hierochuntica*. Le loro strutture di flavanone, aventi una parte benzofuranica, sono state determinate sulla base di prove chimiche e fisico-chimiche.

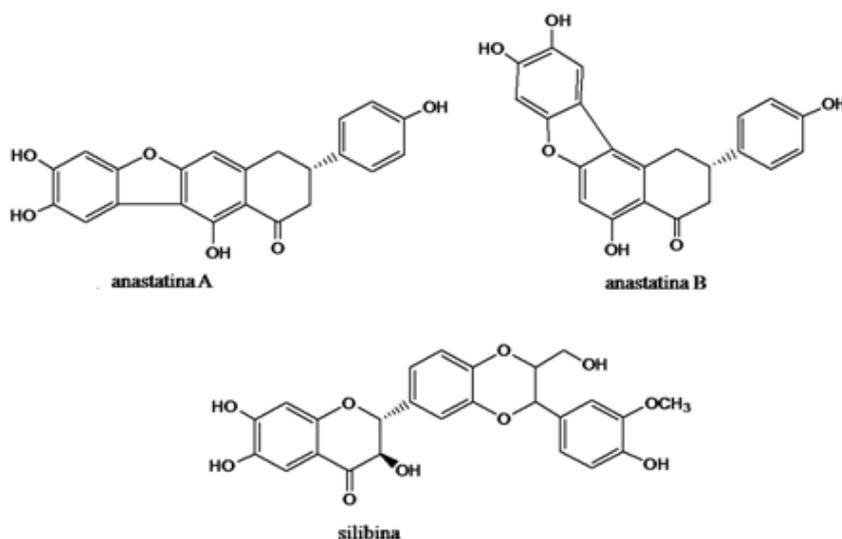


Figura. 27. Alcune molecole caratteristiche di *A. hierochuntica*

Sono stati caratterizzati anche i flavonoidi isovitexina-7-O-glucoside, orientina, isoorientina, isovitexina, isoorientina-2''-O-glucoside, silibina A e B, isosilibina A e B, luteolina, canferolo, canferolo 3-O-(6''- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranoside, quercetin 3-O-6''- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranoside, quercetina, rutina e i composti hierochina A, hierochina C, (+)-deidrodiconiferil alcol, (+)-balanofonin, hierochina B, (+)-lariciresinolo, (-)-evofolina B, acido p-idrossibenzoico, acido p-metossibenzoico, acido 3,4- diidrossibenzoico, acido 3-metossi-4-idrossibenzoico, p-idrossibenzaldeide, 3,4-diidrossibenzaldeide, vanillina, acetovanillone, 2,4-diidrossi-3-metossiacetofenone, idrossipropilguaiacone, (+)-2,3-diidrossi-1-(4-idrossi-3-metossifenil-1-propanone), acido *trans*-cinnamico, acido *trans*-ferulico e coniferaldeide (Zin *et al*, 2017).

Possibili effetti salutistici

A. hierochuntica è una pianta utilizzata in varie zone del globo per trattare diversi disturbi. Gli estratti metanolici e acquosi di questa droga hanno attività antiossidante, antifungina e antimicrobica. È stato dimostrato che tali estratti hanno la capacità di attivare i fagociti e di avere attività microbica, favorendo così una maggiore resistenza alle infezioni. Hanno inoltre attività ipoglicemizzante, con l'estratto metanolico che mostrava in modo significativo effetti ipolipidemici nei ratti diabetici. Lo stesso estratto ha la capacità di ridurre significativamente le attività delle transaminasi e delle fosfatasi alcaline nei ratti diabetici, indotti da allossano. Anche se *A. hierochuntica* è ampiamente utilizzata, gli studi

su questa pianta sono ancora scarsi, poichè le sue rinomate attività biologiche e benefici salutistici richiedono ancora una valutazione critica (Zin *et al*, 2017).

L'estratto metanolico della pianta intera è stato trovato inibire la melanogenesi in cellule di melanoma B16 murine. Tra i costituenti isolati, anastatina A, silibina A, isosilibine A e B e diversi flavonoidi hanno inibito la melanogenesi con valori IC₅₀ di 6.1 – 32 µM. Per quanto riguarda il meccanismo di azione di silibine e isosilibine sembra essere importante l'inibizione dell'attività della tirosinasi. Inoltre, isosilibine A e B hanno inibito l'espressione del mRNA di TRP-2, ma in modo opposto innalzano l'espressione di mRNA tirosinasi TRP-1 e –TRP-2 a 10 e/o 30 µM; l'inibizione della fosforilazione della chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK1/2) è coinvolta nell'espressione di mRNA, almeno in parte (Nakashima *et al.*, 2010).

Venti composti comprendente una serie di C - e O- flavoni glicosidi, acidi fenolici, acidi clorogenici e flavonoli sono stati studiati per il loro potenziale antiossidante in un tè preparato dai semi della pianta: 14 di essi hanno esibito attività antiossidante. Il più alto contributo alla capacità antiossidante del tè, pari al 56%, proveniva dall'acido 3,4-didrossibenzoico e acidi caffeoil - e dicaffeoilchinici, mentre 6 C-glucosidi della luteolina e apigenina ha contribuito al 41% (Al Gamdi *et al.*, 2011).

1.6.8 Acacia tortilis subsp. raddiana

Classificazione scientifica

Regno: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordine: Fabales

Famiglia: Fabaceae

Genere: *Acacia*

Specie: *Acacia tortilis subsp. raddiana* (Savi) Brenan



Figura 28. *A.tortilis subsp.raddiana* (Barrera Martinez *et al.*, 2007)

Descrizione

In condizioni di estrema aridità si sviluppa in forma di arbusto alto 1-1.5 m, mentre in condizioni ottimali assume portamento arboreo, raggiungendo mediamente l'altezza di 15–18 m, con esemplari che possono superare i 20 m.

Il tronco è nudo e contorto ed è sormontato da una chioma rada e appiattita, per l'appunto a forma di ombrello.

Le foglie, pinnate, lunghe approssimativamente 2.5 cm, sono composte da 4 a 10 paia di pinne, ciascuna con sino a 15 coppie di foglioline.

I fiori sono piccoli e bianchi, molto profumati.

I semi sono chiusi in un baccello piatto e avvolti da una polpa carnosa e profumata.

La gomma (o resina) viene raccolta durante l'estate, essiccata e poi schiacciata in un mortaio.

Le radici sono disposte in una fitta rete che si spinge molto in profondità e sono dotate di noduli radicali che ospitano batteri azotofissatori del genere *Rhizobium*, capaci di estrarre l'azoto atmosferico, sopperendo così alla carenza di azoto dei suoli aridi (IUNC Centre For Mediterranean Cooperation, 2005).

Areale di distribuzione

È diffusa ampiamente in Africa, dal Sudafrica all'Africa orientale e a nord dal Maghreb all'Egitto, e in Anatolia, da Israele alla Penisola Arabica.

È coltivata, per ricavarne legname, in India e Pakistan.

È nota per essere resistente a condizioni estreme di siccità ed alcalinità. Cresce su terreni sia sabbiosi che rocciosi ed è una specie tipica della savana e dei territori aridi.

Droga

Principalmente si usa la gomma

Uso tradizionale nella medicina locale

La gomma triturrata è usata come cicatrizzante per ferite infettate e per ustioni, per allergia, come assorbente nel caso di intossicazione alimentare.

La polvere della miscela di foglie e fiori, la gomma si usano per dolore di stomaco.

Fitochimica: costituenti principali

Lakhera & Kumar (2017) hanno isolato i polisaccaridi dalla gomma con una resa del 43.6%: la composizione era L-arabinosio, D-galattosio, D-glucosio, L-Ramnosio e D-mannosio determinati in rapporto molare del 78.1%, 18.64%, 0.60%, 1.71% e 0.74%, rispettivamente. Il contenuto di acido D-Galatturonico e D-Glucuronico è stato determinato essere del 3.88% e 4.35% rispettivamente, confermato con GLC.

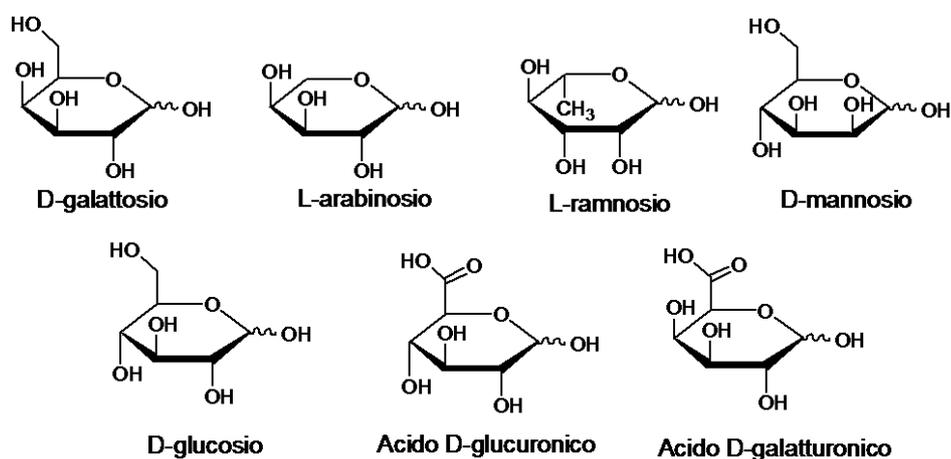


Figura. 29. Principali monomeri della gomma di *A. tortilis* subsp. *raddiana*

Hagos *et al.* (1987) hanno isolato da un estratto acquoso della corteccia ricoperta di gomma e caratterizzato, mediante l'uso di cromatografia HPLC e TLC due composti, 1,3-diaril-propan-2-oli, denominati quracol A e quracol B (**Figura 30**).

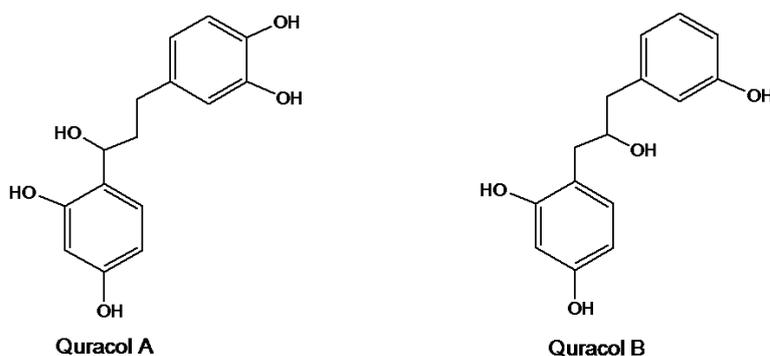


Figura 30. 1,3-diaril-propan-2-oli isolati da *A. tortilis* subsp. *raddiana*

Possibili effetti salutistici

Sono stati studiati gli effetti emostatici ed antibatterici di una soluzione acquosa di resina di *Acacia arabica* e semi di *Moringa oleifera* da Bhatnagar *et al.* (2013) con interessanti risultati, per valutare valutarne la proezione d'uso nella cura e cicatrizzazione di ferite infettate.

Bhateja e Singh (2014) hanno studiato il potenziale antidiabetico della gomma di *A. tortilis* nel ratto. I ratti Wistar sono stati suddivisi in controllo, controllo diabetico e trattato con glimepiride (10 mg / kg) e ratti diabetici trattati con dose 250, 500 e di 1000 mg/kg di estratti purificato di gomma. Sono stati misurati i livelli di HDL (high density lipoprotein), SGOT (serum glutamic oxaloacetic transaminase) e SGPT (serum glutamic piruvic transaminase). La STZ (streptozotocina nicotinammide) ha aumentato significativamente il livello di glucosio nel sangue a digiuno, di emoglobina glicata, di colesterolo, trigliceridi,

livelli di LDL (low density lipoprotein), VLDL (very low density lipoprotein), SGOT, and SGPT, mentre ha ridotto il livello di HDL se confrontato con il gruppo di controllo. Dopo 7 giorni di somministrazione di dose dell'estratto di gomma da 500 e 1000 mg / kg hanno mostrato una riduzione significativa ($P < 0,05$) della glicemia a digiuno, ma sono anche stati ridotti i livelli di colesterolo totale, trigliceridi, LDL, VLDL, SGOT e SGPT.

Bisht *et al.* (2013) hanno studiato l'attività antiiperglicemica del polisaccaride isolato dalla gomma essudata di *A. tortilis*: in particolare, hanno dimostrato *in vitro* l'attività inibitoria di α -D-glucosidasi (ricavata da *S. cerevisiae* e dall'intestino di piccoli ratti) e *in vivo* della riduzione dei livelli di glucosio nel sangue post-prandiali, a seguito di un pasto ricco di carboidrati: i risultati hanno mostrato la potenzialità del polisaccaride per la cura del diabete mellito e delle sue complicazioni.

Recentemente, è stato riferito che la gomma di acacia è antibatterica, emostatica e non emolitico (Bhatnagar *et al.*, 2013). Singh e Dhiman (2016) hanno studiato un metodo di formulazione di gomma di Acacia, con polivinilimidazolo, carbopol, lidocaina, gentamicina in un idrogel. La gomma d'acacia non è tossica, è emostatica (non emolitica), antibatterica, antiossidante e antinfiammatoria, carbopol è un polimero biocompatibile, mucoadesivo (acido poliacrilico) e le sue applicazioni per la somministrazione transdermica di farmaci sono note. Inoltre è stato anche dimostrato che l'innesto di acido poliacrilico in polisaccaridi migliora il gonfiore e le proprietà di rilascio dei farmaci degli idrogel.

Nel lavoro di Singh *et al.* (2017), è stato progettato un idrogel usando gomma di Acacia con polivinilpirolidone e carbopolo. Se queste medicazioni di idrogel sono caricate con antibiotici, come la moxifloxacina, aumenta il potenziale di guarigione della ferita. Quindi, il farmaco antibiotico proposto in medicazioni con idrogel non solo fornisce protezione per l'infezione per un periodo più lungo (a causa di antibiotico), ma può assorbire fluido della ferita che è necessario per la pulizia e il mantenimento di un ambiente umido per la guarigione rapida.

Raguvaran e Manuja (2017) hanno suggerito una combinazione di gomma di Acacia con nanoparticelle di ossido zinco e sodio alginato, in forma di idrogel come antibatterico ed antinfiammatorio. Gli idrogel hanno mostrato un effetto curativo a bassa concentrazione di nanoparticelle di ossido di Zn su cellule di fibroblasti di pecora. I risultati suggeriscono che alte concentrazioni di nano particelle di ossido di zinco sono tossiche per le cellule ma gli idrogel di alginato-gomma-nanoparticelle di ossido di Zn hanno ridotto significativamente la tossicità e preservato l'effetto benefico antibatterico e curativo.

2. Materiali e metodi

2.1 Raccolta e autenticazione della droga

Le droghe *A. leucotrichus* (frutti), *A. halimus* (foglie), *Cleome amblyocarpa* (parti aeree), *Matricaria pubescens* (parti aeree), *Anvillea garcinii* subsp. *radiata* (foglie), *Anastatica hierochuntica* (parti aeree), *Nucularia perrinii* (foglie) sono state raccolte in natura nel Sahara Occidentale nel marzo 2016 (località Bir Lehlu). Sono state essiccate per 15 giorni a temperatura ambiente e in luogo asciutto: successivamente sono state trasferite in Italia. Sulle droghe è stata condotta poi un'identificazione botanica con stereomicroscopico (Nikon SMZ-2B Japan), sulla base dei dati in letteratura e un'operazione di cernita per eliminare eventuali elementi estranei, come descritto nella Farmacopea Europea (Eur. Ph. 9.0). Sono poi state conservate a -20 °C fino al momento dell'uso. Un campione di ogni pianta è conservato presso il laboratorio di Biologia farmaceutica dell'Università di Ferrara.

2.2 Analisi bromatologica

La chimica degli alimenti o bromatologia è la branca della chimica che si occupa dello studio degli alimenti approfondendone gli aspetti relativi alla caratterizzazione quali-quantitativa, alle trasformazioni biochimiche a cui vanno incontro più o meno spontaneamente e ai metodi di condizionamento e conservazione degli alimenti.

Prevede lo studio e la determinazione quali-quantitativa, attraverso specifiche metodiche, del contenuto di proteine, lipidi, metalli, fibra solubile ed insolubile, umidità dell'alimento (o droga) oggetto di studio.

Determinazione dell'azoto organico totale (contenuto proteico totale): metodo Kjeldahl

Da più di 100 anni il metodo di Kjeldahl è stato utilizzato per la determinazione dell'azoto in una grande varietà di composti. Questa metodica viene utilizzata in molti campi, dal calcolo del contenuto di proteine in alimenti, bevande, carne, foraggi e cereali; alla determinazione dell'azoto in acque di scarico, terreni o altri campioni. È un metodo ufficiale e viene riportato in diverse normative come: AOAC, US-EPA, ISO, Farmacopee e varie Direttive Europee (www.novachimica.com). Il Kjeldahl è uno degli strumenti più utilizzati per effettuare l'analisi quantitativa delle proteine su campioni biologici. Il metodo è indiretto in quanto non si basa sulla misurazione dell'effettivo contenuto proteico della matrice testata, ma sulla quantità di azoto presente nello stesso.

Dapprima si procede con la mineralizzazione del campione, una vera e propria digestione che comporta la trasformazione di tutti i componenti minerali in sali insolubili, mentre quelli organici in H_2O , CO_2 e sali di ammonio. Per effettuare questa operazione si introduce in un provettone apposito una quantità di circa 1 g esattamente pesata del campione secco in esame, macinato con Retsch Grindomix GM 200, e si aggiunge allo stesso un eccesso di acido solforico 96% (circa 25 mL) per far avvenire una forte ossidazione. Si aggiungono inoltre 10 g di solfato di potassio, che funge da innalzatore del punto di ebollizione, e 0.7 g di ossido di rame che ha la capacità di catalizzare la reazione. Si lascia mineralizzare per 40 minuti ad una temperatura di 400 °C. Tutto l'azoto presente si trasforma in $(NH_4)_2SO_4$.

Al termine della mineralizzazione si lascia raffreddare e si aggiungono, ad ogni provettone, 10 mL di acqua deionizzata e 25 mL di tiosolfato di sodio.

Il solfato di ammonio, fatto reagire con una base forte, libera ammoniaca, che viene distillata in corrente di vapore e raccolta, dopo un refrigerante a ricadere, in una beuta. In questa beuta è contenuto H_2SO_4 in quantità e concentrazione nota (0.5 N). Retrotitolando con NaOH 0.5 N si risale alla quantità di azoto, che moltiplicata per un fattore di conversione (6.25) esprime direttamente la quantità di proteine. Il fattore di conversione permette di risalire direttamente al contenuto proteico in un alimento a partire dal suo contenuto di azoto; questo valore deriva dalla considerazione generale che il contenuto medio di azoto nelle proteine sia del 16% ($100/16=6.25$); fanno eccezione le proteine del frumento e della soia (fattore di conversione 5.70) e del latte e derivati (6.38) (Evangelisti & Restani, 2011). L'indicatore utilizzato è il rosso di metilene.

Determinazione delle ceneri

Si esegue trattando il campione essiccato e macinato, circa 1 g esattamente pesato, in muffola a 570 °C per 6 ore. La parte organica prima carbonizza, poi si ossida completamente ad acqua e anidride carbonica, le quali evaporano mentre la parte inorganica rimane e rappresenta la frazione minerale totale. Al termine del processo si pone il campione in essiccatore per l'intera notte. Il quantitativo di ceneri si ottiene per differenza con la tara iniziale della capsula in quarzo, su cui era stato inserito il campione, e rapportando il valore a 100.

Determinazione del contenuto di umidità

Questo procedimento serve per rendere confrontabili i diversi campioni, eliminando l'acqua. I pesafiltri vuoti e numerati sono stati pesati, riempiti con 1 g di campioni

macinati, sottoposti a nuova pesata e successivamente posti in stufa a 60 °C per l'intera notte fino a peso costante. In seguito sono stati raffreddati in un essiccatore fino a raggiungere la temperatura ambiente. Si è proceduto calcolando il peso secco e il relativo contenuto in acqua dei campioni in valore percentuale. Il risultato dell'umidità è espresso in percentuale peso/peso (% p/p).

Determinazione della frazione lipidica: metodo Soxhlet

Il metodo Soxhlet viene utilizzato per estrarre a caldo matrici vegetali con solventi organici volatili. Il vantaggio principale di questo apparecchio consiste nell'impiego di una minima quantità di solvente, grazie ad una sua continua purificazione e distillazione dopo ogni passaggio effettuato attraverso la matrice.

L'apparecchio utilizzato nella determinazione della frazione lipidica delle droghe in oggetto è un distillatore semiautomatico (VELP SCIENTIFICA, Usmate, Milano), che combina l'ebollizione a riflusso con l'estrazione consentendo di diminuire i tempi di estrazione e di recuperare il solvente evaporato. Il ditale di cellulosa contenente il campione, per favorire la dissoluzione immediata dei componenti estraibili è immerso nel solvente in ebollizione, che, come in un normale Soxhlet, viene fatto passare attraverso la matrice e continuando ad evaporare e a condensare, completa l'estrazione "a caldo" che non sarà esaustiva, ma avrà raggiunto una fase di equilibrio. Successivamente il ditale viene sospeso estraendolo dal recipiente contenente il solvente, e si procede con la seconda fase che prevede l'evaporazione e successiva condensazione del solvente che ricadrà nella camera di estrazione per completare e rendere esaustivo il processo, poiché ciò che evapora è solo il solvente fresco senza la componente lipidica precedentemente estratta. Infine si effettua la fase di recupero del solvente che viene fatto evaporare e ricondensare e viene raccolto senza che ricada nella camera di estrazione. Si ottiene così l'estratto secco corrispondente alla frazione lipidica estratta. La differenza sostanziale con i tradizionali Soxhlet è che il solvente passa in continuo attraverso il contenitore del campione, senza essere sifonato. Con tale tecnica si può recuperare fino al 70% del solvente, che dunque può essere riutilizzato in successive estrazioni, con notevoli vantaggi economici e ambientali. Rispetto ai tradizionali Soxhlet si ha un notevole risparmio di tempo (8 ore per il metodo tradizionale, 4 ore per quello semiautomatico).

Sono stati pesati circa 3g di ciascuna droga essiccata e macinata (con Retsh Grindomix GM 200), messi nel ditale poroso che poi è stato inserito nell'apparecchio; per l'estrazione sono stati utilizzati 50 mL di etere etilico.

Il processo si compone di tre fasi:

1. 30 minuti in immersione in solvente
2. 30 minuti con riflusso a ricadere
3. 10 minuti di recupero del solvente.

Al termine, dopo raffreddamento a temperatura ambiente, si è pesato l'estratto raccolto e si è risalito al contenuto totale di lipidi.

Determinazione del profilo degli acidi grassi mediante GC-MS

Per la determinazione degli acidi grassi, l'estratto ottenuto con il metodo Soxhlet viene recuperato con 3 mL di esano e transesterificato con 1.5 mL di metanolo con idrossido di sodio al 5%. Si agita il tutto per qualche minuto e si recupera la fase superiore contenente gli acidi grassi metilati per la corsa cromatografica.

L'analisi GC-MS dei campioni è stata eseguita con Gascromatografo Varian 3900 con iniettore Split-Splitless equipaggiato con una colonna Zebron ZB-WAX Phenomenex (polietilenglicole; lunghezza: 60 m, diametro interno: 0,25 mm) e associato a un rivelatore spettrometro di massa Varian 2100 ad impatto elettronico;

Le condizioni sperimentali erano le seguenti: gas carrier elio (1 mL/min), energia di ionizzazione (EI) 70eV, corrente in emissione 10 μ A, velocità di campionamento 1 scan/sec, range di massa 40-400 Da, temperatura della trappola ionica 150°C, temperatura della transfer line 300°C.

Per quanto riguarda l'analisi degli estratti lipidici transesterificati, si è proceduto introducendo 1 μ l nell'iniettore del gascromatografo (T 250 °C; rapporto di split 1:20), l'analisi è stata eseguita impostando una programmata di temperatura, cioè portando la temperatura del forno a 100 °C per 2 min, da 100 a 200 °C con una velocità di 10°C/min, mantenendo poi questa temperatura per 108 minuti. La durata totale di acquisizione del cromatogramma era pari a 120 minuti.

Gli spettri delle singole molecole sono stati confrontati con gli spettri della libreria NIST, oppure con standard puri.

Determinazione del contenuto dei metalli mediante spettroscopia atomica

L'assorbimento atomico è una tecnica strumentale mediante la quale si effettua la ricerca quantitativa dei metalli in varie matrici (acque, alimenti, piante, creme). Il principio del metodo consiste nell'emissione di una radiazione caratteristica del metallo da determinare mediante una apposita sorgente (lampada a catodo cavo) e nel successivo parziale assorbimento da parte degli atomi del metallo presente nel campione. La misura dell'assorbimento, che può essere letta direttamente sul display dello strumento, consente di

risalire alla concentrazione del metallo, contenuto nel campione analizzato, facendo riferimento alla legge di Lambert-Beer.

Il processo prevede due fasi principali:

1. Mineralizzazione del campione
2. Determinazione quantitativa dei metalli in assorbimento atomico

1. Per la mineralizzazione del campione si procede nel seguente modo.

Per ogni droga sono state eseguite tre prove; in ciascun provettone sono stati inseriti 1g di campione (esattamente pesato) e 5 mL di HNO₃ concentrato al 70% (per portare in soluzione tutti i metalli, poiché i nitrati sono tutti solubili) e si inizia la mineralizzazione dei campioni, collegando ad ogni provettone un refrigerante a ricaduta allo scopo di condensare i vapori che si formano durante la mineralizzazione. I provettoni sono posti all'interno del mineralizzatore con programma di riscaldamento articolato in 5 step secondo lo schema tempo/temperatura che segue:

STEP	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
1	50	20
2	90	20
3	140	20
4	200	40
5	250	40

Al termine della mineralizzazione, tutte le molecole organiche sono ossidate a H₂O e CO₂, tutti i metalli sono convertiti in sali nitrati solubili.

Infine, dopo raffreddamento, si aggiunge 1 mL di H₂O₂ 40% p/v, per ossidare completamente tutto il materiale organico, e si effettua un nuovo programma di riscaldamento che prevede un solo step di 20 minuti a 200°C (processo di strippaggio) e poi si lascia raffreddare.

Dopo il raffreddamento, ogni campione mineralizzato viene recuperato in modo quantitativo con acqua milliQ in un matraccio da 20 mL, quindi si filtra il tutto per rendere la soluzione limpida e senza tracce solide con filtro di carta Whatman senza ceneri (filtri di cellulosa pura al 100%) per evitare al minimo la possibile addizione di metalli che andrebbe a falsare il risultato.

Accanto a questi campioni si prepara un bianco di controllo, applicando la medesima procedura, in assenza di campione. Il bianco serve a escludere dalla misurazione eventuali interferenze dovute a metalli presenti nei solventi o negli strumenti utilizzati.

I campioni così preparati vengono letti dopo opportuna diluizione allo spettrofotometro ad assorbimento atomico.

2. Per la determinazione quantitativa dei metalli in assorbimento atomico si procede nel seguente modo.

L'analisi della componente minerale si effettua utilizzando uno spettrofotometro per assorbimento atomico Perkin Elmer 1100B in configurazione fiamma ad aria/acetilene.

È necessario costruire una retta di taratura per ogni metallo in esame con opportuni standard a titolo noto secondo la legge di Lambert-Beer che associa a determinati valori di assorbanza i rispettivi valori di concentrazione.

La concentrazione del metallo nei campioni si esprime in $\mu\text{g/g}$ e si ottiene applicando una formula apposita che tiene conto del fattore di diluizione e riportando il valore ottenuto ai grammi di campione pesati inizialmente.

Analisi della fibra alimentare solubile ed insolubile

Questa analisi è stata effettuata seguendo le linee guida e il kit di enzimi del Megazyme International Ireland che si basa sulle metodiche AOAC 991.43, AOAC 985.29, AACC 32-07.01 e AACC 32-05.01 per la determinazione della fibra alimentare solubile ed insolubile (Lee et al., 1992; Prosky et al., 1988).

Per ogni campione di pianta, sono stati preparati due crogioli filtranti di Gooch, uno per la fibra solubile e uno per la fibra insolubile. In ogni crogiolo è stato pesato 1 g di celite; per distribuire la celite sono stati utilizzati 10 mL di acqua deionizzata per la fibra insolubile (IDF) e 15 mL di etanolo al 78% per la fibra insolubile (SDF). I crogioli sono stati poi posti in stufa a 100 °C per 1 ora ed infine trasferiti nell'essiccatore a campana di vetro fino a completo raffreddamento.

Per ogni campione di pianta è stato pesato circa 1 g di droga polverizzata, in un becher da 400 mL. In ciascun becher sono stati aggiunti 40 mL di tampone MES/TRIS (acido 2-morfolin-4etansolfonico/tris-(2-idrossimetil)-amminometano cloridrato) e dopo aver posto la soluzione in agitazione con ancoretta magnetica, sono stati aggiunti 50 μL di α -amilasi, enzima deputato all'idrolisi dei legami 1,4- α -D-glucosidici, utilizzato per la digestione dei polisaccaridi, in particolare dell'amido. Successivamente i campioni sono stati posti in un bagno termostatico con agitatore orbitale a 99.9 °C e sono stati lasciati in incubazione per 35 minuti. Dopo aver raffreddato fino ad una temperatura di 60 °C, sono stati aggiunti a ciascun campione 10 mL di acqua deionizzata e 100 μL di proteasi, enzima in grado di catalizzare la rottura del legame peptidico delle proteine. I becher sono stati posti nuovamente in incubazione nel bagno termostatico per 30 minuti a 60 °C per far avvenire la reazione. I campioni sono stati poi messi sull'agitatore magnetico ed a ciascuno sono stati aggiunti 5 mL di acido cloridrico 0.561 M in modo da ottenere un valore di pH

compreso tra 4.1 e 4.8. Per degradare ulteriormente l'amido ai due campioni sono stati aggiunti 200 μ L di amiloglicosidasi, enzima che rimuove unità di glucosio dall'amido rompendo i legami α -1,4-glucosidici lineari e i legami α -1,6-glucosidici ramificati. Dopo averli nuovamente lasciati incubare nel bagno termostatico a 60 °C per 30 minuti, i campioni sono stati filtrati sottovuoto sui crogioli filtranti di Gooch preparati per separare la fibra insolubile (per lavare eventuali residui rimasti nei becher, sono stati aggiunti 10 mL di acqua deionizzata precedentemente scaldata a 70 °C). A seguito della filtrazione, per entrambi i campioni, il surnatante raccolto in beuta è stato trasferito in un becher da 600 mL, effettuando vari lavaggi della beuta con 240 mL di etanolo caldo al 96%. Successivamente le due soluzioni sono state lasciate a riposo per 1 ora in modo tale da far precipitare la fibra solubile. Le soluzioni sono state poi filtrate sui crogioli filtranti di Gooch preparati per separare la fibra solubile, utilizzando la pompa a vuoto e lavando i becher con etanolo al 78%. I quattro crogioli in cui è stata raccolta la fibra sia insolubile che solubile sono stati infine essiccati in stufa a 100 °C per 24 ore e la mattina seguente trasferiti nell'essiccatore a campana di vetro fino a raffreddamento per la pesata.

2.3 Valutazione quali-quantitativa del contenuto di fenoli e attività antiradicalica

Isolamento dei polifenoli

0.5 g di droga polverizzata sono stati posti in una provetta di vetro da 10 mL con tappo e sospesi in 2 mL di esano, 1.2 mL di etanolo e 0.8 mL di acqua e posti in ultrasuoni per 30 minuti (Andrewes et al., 2003). Successivamente le provette sono state poste in centrifuga a 5800 giri/min per 10 minuti. Si è poi prelevata la fase superiore (esano/etanolo mediante pasteur) che è stata trasferita in una vial da 4 ml e la parte inferiore di etanolo/acqua in un'altra vial: la feccia è stata centrifugata per altri 10 minuti per recuperare la parte residua di etanolo/acqua che viene riunita alla precedente. Per le analisi HPTLC le soluzioni vengono usate tal quali. Per le analisi dei polifenoli totali le soluzioni etanolo/acqua vengono liofilizzate e successivamente preparate soluzioni di 1 mg/mL di etanolo al 60%.

Analisi dei polifenoli totali con metodo di Folin-Ciocalteu

L'analisi dei polifenoli totali con il metodo di Folin-Ciocalteu si basa sull'aggiunta agli estratti in esame di un reattivo in grado di assumere una colorazione blu di intensità proporzionale al numero di residui fenolici.

100 μL di estratto etanologico 60% delle droghe alla concentrazione di 1 mg/mL sono posti in falcon da 10 mL a cui sono stati addizionati rispettivamente 7.9 mL di acqua distillata e 500 μL di reattivo di Folin-Ciocalteu, formato da una miscela di acido fosfo-tungstico $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ e acido fosfo-molibdico $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \times \text{H}_2\text{O}$ in ambiente alcalino (Tacchini et al., 2015). I composti fenolici in questo modo vengono ossidati. Per innescare la reazione dopo due minuti vengono aggiunti 1.5 mL di soluzione acquosa di Na_2CO_3 anidro al 20%, e si porta a volume con acqua deionizzata. I campioni così ottenuti sono lasciati al buio a temperatura ambiente per 2 ore, e successivamente si procede alla lettura allo spettrofotometro a 765 nm. Come standard di riferimento sono state utilizzate soluzioni acquose di acido gallico a partire da concentrazioni da 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fino a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per costruire la retta di taratura. Il valore di assorbanza degli estratti in esame viene interpolato nella retta di taratura, ricavando in questo modo gli equivalenti di acido gallico.

Saggio del DPPH con metodo del microplate reader

Il metodo del DPPH, sfrutta un radicale stabile il 2,2-difenil-1-picrilidrazile che solubilizzato in etanolo assume una colorazione violacea, mentre in presenza di composti antiossidanti, per neutralizzazione del radicale libero la colorazione vira verso il giallo. L'esperimento è stato condotto in una piastra a 96 pozzetti (microplate) ed è stato utilizzato un lettore di piastre per acquisire i dati riguardi l'assorbanza (Microplate Reader 680 XR, Biorad). Lo strumento è stato impostato ad una lunghezza d'onda di 515 nm, la più prossima al picco di assorbimento della forma radicalica (Cheng et al., 2006).

Per valutare l'attività antiradicalica delle droghe a partire da una soluzione 1 mg/mL di etanolo 60% dell'estratto secco liofilizzato, precedentemente descritto, è stato individuato un range di concentrazioni delle soluzioni appropriato per individuare IC_{50} .

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μL di una soluzione di etanolo al 60%, ad eccezione di quelli della prima riga orizzontale dove sono stati aggiunti 200 μL degli estratti delle droghe e del composto di riferimento. Successivamente sono state effettuate 7 diluizioni successive con fattore di diluizione 1:2. È stato utilizzato, come controllo positivo, il Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico), un antiossidante sintetico. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μL di una soluzione di DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile, 0.208 mM finale) in etanolo al 60%. Come controllo negativo è stata utilizzata la soluzione di DPPH in etanolo al 60% e come bianco strumentale la soluzione di etanolo al 60%. Le piastre sono state poste in agitazione meccanica, al buio (il DPPH è fotosensibile) per 40 minuti. La lettura della piastra viene effettuata prima dell'aggiunta del DPPH, e si ottiene il bianco, e dopo essere trascorsi i 40

minuti dall'aggiunta dell'agente ossidante. Con i valori ottenuti degli estratti e del Trolox, tramite la formula matematica:

$$\% \text{ inibizione DPPH} = \left(1 - \frac{A_c - A_{\text{bianco}}}{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{bianco}}} \right)$$

Dove:

A_c = assorbanza del campione da analizzare

A_{bianco} = assorbanza con etanolo al 50 %

A_{DPPH} = assorbanza con solo DPPH

si calcola poi l'IC₅₀ (concentrazione alla quale otteniamo il 50% della inibizione del radicale libero): minore è il valore assunto dall'IC₅₀ maggiore sarà l'attività antiossidante di un estratto.

HPTLC qualitativa per fenoli e bioautografica con DPPH

Entrambe le soluzioni derivate dall'isolamento dei polifenoli dalle droghe sono state depositate in doppio su lastra HPTLC (high performance thin layer chromatography). In queste lastre la granulometria della silice è più fine ed omogenea, da cui consegue una migliore separazione, grazie al maggior numero di piatti teorici. Sulla lastra in gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck, Germany) sono stati applicati da 1 a 4 µL di entrambe le soluzioni, come bande di larghezza pari a 8 mm, con l'ausilio del depositore automatico Linomat V (Camag, Switzerland). L'eluizione successiva è avvenuta in 2 passaggi:

- nel primo step di eluizione fino a 4 cm la fase mobile era costituita da etilacetato – acido formico – acido acetico – acqua distillata (100:11:11:20)
- nel secondo step con eluizione fino a 8 cm la miscela utilizzata era composta da toluene – etilacetato – acido acetico (100:90:10).

Una volta effettuata l'eluizione, le lastre cromatografiche sono state asciugate all'aria e visualizzate a lunghezze d'onda di 366 nm e 254 nm con l'ausilio di CAMAG Visualizer. Sono state successivamente tagliate in 2 parti (era state depositate in doppio) e derivatizzate rispettivamente con:

- NP/PEG (1% difenilborilossietilamina in metanolo, 5% polietilenglicole-4000 in EtOH): la lastra viene spruzzata con 10 mL di NP e 8 mL di PEG. Questo reagente serve per la rivelazione di flavonoidi. Dopo il trattamento si svilupperà un'intensa fluorescenza, rafforzata dal PEG, visibile alla luce UV-366 nm (Wagner, 2009);
- Soluzione di DPPH, 200 mg in 100 mL di EtOH, spruzzata sulla lastra. Conferisce una colore porpora uniforme con una decolorazione in corrispondenza di componenti ad attività antiradicalica (Prencipe et al., 2014).

2.4 Approfondimento di *A. leucotrichus*

2.4.1 Analisi di metaboliti secondari di *A. leucotrichus*

Analisi degli insaponificabili mediante GC-MS

La frazione insaponificabile è stata determinata a partire dall'estratto lipidico ottenuto in Soxhlet ripreso in esano. Dall'estratto secco si prelevano 40 mg per campione e si saponificano con 5 ml di KOH metanolica 1M (56g/1000 mL) per 24 ore a 28 °C. La soluzione viene poi estratta due volte con 2 mL di esano e 0.2 mL di etanolo in imbuto separatore. Le frazioni organiche riunite e anidificate con Na₂SO₄ anidro, vengono portate a secco sotto flusso di azoto e silanizzate con 2 mL di una miscela (5:2:1) di piridina:esametildisilazano:trimetilclorosilano precedentemente centrifugata.

Dopo un'ora a temperatura ambiente il liquido viene riscaldato in un bagno a 80°C ed evaporato sotto flusso di azoto. Il residuo viene risospeso in 0.3 mL di esano in ultrasuoni per 2 minuti e centrifugato, ed il surnatante viene iniettato in GC.

L'analisi qualitativa dei campioni silanizzati è stata eseguita con un gascromatografo Varian GC-3800 equipaggiato con una colonna VarianFactor Four VF-5ms (5%-fenil-95%-dimetilpolisilossano; diametro interno: 0.25 mm, lunghezza: 30 m) associato ad uno spettrometro di massa Varian MS-4000 caratterizzato da una sorgente ionica ad impatto elettronico ed integrato ad una libreria NIST.

Le condizioni operative del gas cromatografo sono state le seguenti: temperatura dell'iniettore: 300°C, rapporto di split di 1/50, gas carrier: elio, flusso: 1.2 ml/min. Tali condizioni sono state eseguite impostando la seguente programmata: un incremento di temperatura del forno da 230°C a 320°C con una velocità di 5°C/min, seguito da un'isoterma a 320°C per 7 min.

Le condizioni sperimentali dello spettrometro di massa erano le seguenti: voltaggio 70 eV, corrente di emissione 20 µA, 1 scan/sec, range di analisi della massa 40-550 Da, temperatura della trappola 150°C, temperatura della transfer-line 300°C.

Oltre al confronto tra i dati ottenuti dalla massa di ciascun composto con librerie di spettri di massa citate precedentemente a disposizione dello strumento, i componenti sono stati comparando i relativi tempi di ritenzione, i KI (Indici di Kovats) e i dati della massa (grado di frammentazione) con composti standard e dati di letteratura (Radice et al., 2014).

Preparazione di estratti

Per preparare il decotto, in una beuta sono stati pesati 2.54 g di frutti interi di *A. leucotrichus*, a cui sono stati aggiunti 50 mL di acqua distillata, ottenendo un rapporto droga/solvente pari a 1:20. La preparazione è stata eseguita in doppio. Le beute sono state poste su piastra riscaldante sotto agitazione magnetica, e una volta raggiunti i 100°C, sono

state lasciate in tali condizioni per 15 minuti (Makhloufi et al., 2012). Il decotto è stato poi filtrato con filtro di carta a pieghe, congelato e liofilizzato a temperatura di -60 °C e a pressione di 10-1 mBar per 24 ore.

Per preparare l'estratto in etanolo dai frutti di *A. leucotrichus*, sono stati pesati 1.02 g di frutti sminuzzati con bisturi e posti in una bottiglia autoclavabile in vetro con tappo a vite a cui sono stati aggiunti 50 mL di EtOH (rapporto droga/solvente pari a 1:50). L'estrazione è stata effettuata in doppio mediante ultrasuoni (Ultrasonik 104X, Ney Dental International, MEDWOW, Cyprus; volume totale 10.4 L; dimensioni interne: 146 x 292 x 241 mm; frequenza di analisi: 48 kHz) per 1 ora a 25 °C. L'estratto è stato poi filtrato con filtro Gooch, concentrato a rotavapor.

Tramite distillazione in corrente di vapore acqueo, eseguita in doppio, è stato preparato l'olio essenziale dai frutti di *A. leucotrichus*. Per ogni distillazione sono stati pesati 20.61 g di droga in un pallone da 1000 mL, a cui sono stati aggiunti 500 mL di acqua distillata e alcune sferette di vetro per evitare un'ebollizione violenta. Il pallone è stato inserito in un mantello riscaldante, che consente la formazione di vapore *in situ*, e successivamente collegato all'apparato di distillazione Clevenger. Il tempo ottimale di distillazione era di 3 ore.

È stato infine preparato un estratto in etere etilico, seguendo le indicazioni Muckenstrum *et al.* (1997).

Isolamento di ammolattone

L'estratto etero è stato analizzato mediante HPTLC con eluente esano:acetato di etile (80:20). La lastra è stata poi visualizzata alla lunghezza d'onda di 366 nm e 254 nm mediante CAMAG Visualizer e successivamente spruzzata con una miscela ossidante costituita da 1 g di acido fosfomolibdico in 10 mL di etanolo, seguita da essiccazione in stufa a 105°C.

Per l'isolamento dell'ammolattone dall'estratto etanolo è stata effettuata una cromatografia flash su gel di silice (Silica gel 60 mesh; dimensione particelle: 0,035-0,070 mm) a partire da 0.500 g di estratto etanolo. La colonna (altezza: 30 cm; diametro: 4,5 cm) è stata preparata con il metodo ad umido ed il campione da separare è stato caricato in testa alla colonna, sciolto nel minimo volume di fase mobile. Il sistema eluente utilizzato è stato una miscela di esano:acetato di etile in proporzione 80:20.

Le frazioni pure sono state ricercate attraverso TLC, con il metodo sopra riportato, e poi analizzate mediante GC-MS: la presenza di ammolattone è stata confermata attraverso GC-

MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR e DEPT e per confronto con la letteratura (Muckensturm et al., 1997).

Analisi mediante GC-MS e GC-FID di ammolattone e olio essenziale

Le analisi sono state eseguite con cromatografo Varian 3800 equipaggiato con una colonna Varian Factor Four VF-5ms (5%-fenil-95%-dimetil-polisilossano; diametro interno: 0.25 mm; lunghezza: 30 m) interfacciato con uno spettrometro di massa Varian Saturn MS-4000, con ionizzazione ad impatto elettronico, analizzatore a trappola ionica e software provvisto del database NIST per l'identificazione dei componenti. Le analisi sono state effettuate introducendo 1 µL di una soluzione costituita da un'aliquota di analita (olio essenziale o frazioni pure) sciolta in 1 mL di cloruro di metilene nell'iniettore del gas cromatografo (T iniettore: 250 °C; rapporto di split 1:20). Il flusso del gas carrier, elio, era di 1 mL/min.

Per le analisi delle frazioni pure è stata impostata una programmata di temperatura del forno: a partire da una temperatura iniziale di 70 °C, la temperatura è stata portata da 70 a 230 °C con un incremento di 4 °C/min, è stata mantenuta a 230 °C per 10 minuti ed infine è stata portata da 230 a 280 °C con un incremento di 5 °C/min. Il tempo totale di acquisizione del cromatogramma è stato di 70 minuti.

Per l'analisi dell'olio essenziale è stata eseguita una programmata di temperatura da 55 a 100 °C con una velocità di 1°C/min, da 100 a 250 °C con una velocità di 5°C/min, mantenendo poi questa temperatura per 15 minuti. La durata totale di acquisizione del cromatogramma è stata di 90 minuti.

In entrambi i casi le condizioni operative dello spettrometro di massa sono state: energia di ionizzazione (EI) 70eV, corrente in emissione 10 µA, velocità di campionamento 1 scan/sec, range di massa 40-400 Da, temperatura della trappola ionica 150°C, temperatura della transfer line 300°C.

Gli spettri delle singole molecole sono stati confrontati con gli spettri della libreria NIST, della letteratura relativa e mediante l'ausilio degli indici di Kovats.

Per l'analisi quantitativa è stato utilizzato un gas-cromatografo ThermoQuest GC-Trace equipaggiato con un rilevatore FID e la stessa colonna sopra descritta. Le condizioni operative per il gas-cromatografo sono state riportate sopra. La temperatura del FID era di 250 °C. La composizione percentuale dell'olio è stata eseguita mediante il metodo di normalizzazione dalle aree di picco del GC, senza utilizzare fattori di correzione (Guerrini et al., 2011).

Analisi quali-quantitativa degli estratti mediante RP-HPLC-DAD

Gli estratti etanolici e i decotti di *A. leucotrichus* sono stati caratterizzati utilizzando uno strumento HPLC modulare JASCO (Tokyo, Japan), PU-2089Plus, con rivelatore a fotodiodi DAD MD-2010Plus, e un loop di 20 μ l. Per le analisi si è utilizzata una colonna Agilent Eclipse-PLUS-C18 (5 μ m, 250x4.6 mm).

Per la quantificazione di perillaldeide (Sigma-Aldrich) e di ammolattone, molecola pura isolata dall'estratto etanolico di *A. leucotrichus*, il metodo ha previsto un'eluizione a gradiente delle seguenti soluzioni: acqua/acido fosforico (pH:2.9; solv. A) e acetonitrile (solv. B), con un flusso di 1.0 ml/min (metodo interno). La curva di taratura è stata costruita su 5 soluzioni standard di ammolattone in un range di concentrazione da 0.0025 mg/mL a 1 mg/mL e 5 soluzioni standard di perillaldeide in un range di concentrazione da 0.02 mg/mL a 2 mg/mL.

Tutte le analisi sono state effettuate con il seguente gradiente:

STEP	Tempo (minuti)	Solvente A	Solvente B
1	0	75%	25%
2	10	75%	25%
3	30	20%	80%
4	35	0%	100%
5	45	0%	100%
6	55	75%	25%
7	60	75%	25%

2.4.2 Attività biologica di *A. leucotrichus*

Valutazione dell'attività antimicrobica

L'attività antimicrobica della droga è stata valutata per il decotto, per l'estratto etanolico e per l'olio essenziale di *A. leucotrichus* e per le due molecole pure, ammolattone e perillaldeide, isolate dall'estratto etanolico mediante cromatografia flash su gel di silice. I test sono stati effettuati su due batteri gram positivi e due batteri gram negativi, rispettivamente *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e su un lievito, *Candida albicans* (ATCC 10231).

Preparazione colture cellulari

Per eseguire i test di attività antimicrobica è necessario preparare le colture cellulari almeno 24 ore prima per i batteri e 48 nel caso dei lieviti. La tecnica consiste nel far proliferare le cellule d'interesse in ambienti controllati, con appositi nutrienti. È stato effettuato l'inoculo dei ceppi microbici nei rispettivi brodi di coltura, precedentemente sterilizzati in autoclave per 15 minuti a temperatura di 121 °C; le colture sono state poi

lasciate in incubazione per 24 ore per i batteri o 48 per la *Candida*, a 37 °C. Successivamente, per quantificare la concentrazione raggiunta dai microrganismi è stata effettuata la conta microbica. Per ogni ceppo cellulare sono state eseguite otto diluizioni seriali (fattore 1:10) con acqua distillata, di cui un volume noto delle 5 diluizioni è stato seminato su delle piastre Petri, contenenti il terreno solido appropriato per ciascun microrganismo. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C per i batteri o 48 per la *Candida* si è passati alla conta del numero di colonie sviluppatesi nelle piastre per poter risalire alla concentrazione presente nel brodo di partenza. Le beute con le sospensioni microbiche in terreno liquido, sono state poste in frigo a +4 °C per rallentare la crescita cellulare e sono state riposte in agitazione per 2 ore prima di effettuare il test, in modo da riattivare i microrganismi.

Microrganismo	Terreno	Temperatura	
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	TSB/TSA	37°	Presente comunemente nella flora batterica intestinale; provoca infezioni nel tratto urinario, endocarditi subacute, sia su valvole naturali sia su quelle protesiche (Bistoni et al., 2008).
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	TSB/TSA	37°	E' responsabile di infezioni suppurative acute che possono essere dislocate in diversi distretti dell'organismo. Possibili localizzazioni sono cute, apparato scheletrico, apparato respiratorio, apparato urinario, sistema nervoso centrale (Trenev et al., 1998)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	NB/NA	37°	Anche se è comunemente presente nell'intestino umano, può dare infezioni del tratto urinario, meningiti, peritoniti, setticemia e polmoniti (Bistoni et al., 2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	NB/NA	37°	Microorganismo ubiquitario che si trova nel suolo, ma anche in ambienti ospedalieri e nell'acqua. Si ritrova in condizioni normali in circa il 10% dei campioni di feci umane e questi possono rappresentare fonti di epidemie e di contaminazione cutanea. E' soprattutto un patogeno nosocomiale. Infetta solitamente soggetti immuno-depressi (Bistoni et al., 2008).
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	YEPD	37°	Provoca candidosi a livello degli apparati vaginale (vaginite), del cavo orale o della pelle. In un fisico debilitato, immunodepresso o sottoposto a lunghe cure antibiotiche, la candida si moltiplica in modo anomalo e, attraverso l'intestino, può raggiungere il sangue dove libera le proprie tossine provocando la candidemia (Bistoni et al., 2008).

Tabella 3. Microrganismi utilizzati per l'attività antimicrobica e rispettivi terreni TSB/TSA: Tryptone Soy Broth/Agar; NB/NA: Nutrient Broth/Agar; YEPD: Yeast Extract Peptone Dextrose



Figura 31- Piastre Petri preparate per la conta delle colonie batteriche.

Test del microplate sui batteri

Le analisi per l'attività antibatterica dei campioni di *A. leucotrichus* sono state effettuate in triplo su micropiastre a 96 pozzetti a fondo piatto, con capacità di 200 μL per pozzetto. Come controlli positivi sono stati utilizzati due farmaci antibatterici ossia cloramfenicolo e gentamicina per *P. aeruginosa* (range di concentrazione 20-0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100–0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rispettivamente); come controllo negativo sono stati utilizzati 2 μL di dimetilsolfossido per pozzetto; come bianco e verifica di eventuali contaminazioni, il solo terreno di inoculazione Mueller Hinton Broth (MHB).

Seguendo le linee guida del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) delle sostanze da testare sono state fatte otto diluizioni seriali con fattore 1:2 partendo da 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in terreno MHB per gli estratti, i decotti, gli oli e da 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per le sostanze pure, con un volume di 100 μL per pozzetto. A questi sono stati aggiunti 100 μL di inoculo batterico a concentrazione di 10⁶ UFC/mL. Le micropiastre sono state poste in incubazione per 24 ore a 37 °C in agitazione (110 rpm). Dopo l’incubazione è stata determinata visivamente la minima concentrazione inibente (MIC), considerandola come la concentrazione più bassa di sostanza in grado di inibire la crescita batterica (CLSI, 2012).

Test del microplate sul *C.albicans*

Per l'attività antifungina è stato effettuato inizialmente uno screening su micropiastre a 96 pozzetti a fondo tondo testando in doppio una singola concentrazione per ogni sostanza (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mettendo 2 μL per pozzetto di una soluzione madre di 200 mg/mL in dimetilsolfossido. Successivamente sono stati aggiunti 198 μL di inoculo fungino ad una concentrazione di 1.5x10³ UFC/mL in terreno RPMI-1640, tamponato con MOPS (acido 3-(N-morfolino)propansulfonico) 0.165 M e aggiustato a pH 7.0 con idrossido di sodio 1

M. Le micropiastre sono state poste in incubazione a 35 °C per 48 ore. Come controllo positivo è stato utilizzato un farmaco ad attività antifungina, il fluconazolo; come controllo negativo sono stati utilizzati 2 µL di dimetilsolfossido per pozzetto e come bianco e verifica di eventuali contaminazioni il solo terreno RPMI-1640. Dopo il periodo di incubazione è stata determinata la crescita fungina per osservazione visiva di torbidità dei pozzetti.

Le sostanze risultate attive dallo screening sono state sottoposte in seguito al test delle microdiluizioni seguendo le linee guida del “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI). Per ciascun campione sono state effettuate in doppio otto diluizioni seriali con fattore 1:2 partendo da 2000 µg/mL per un volume di RPMI-1640 di 100 µL per pozzetto. A questi sono stati aggiunti 100 µL di inoculo fungino a concentrazione di 5x10³ UFC/mL. Come controllo positivo è stato utilizzato il fluconazolo (range di concentrazione: 20-0.16 µg/mL) e come controllo negativo 2 µL di dimetilsolfossido per pozzetto. Le micropiastre sono state poste in incubazione a 35 °C per 48 ore. Dopo l’incubazione è stata determinata visivamente la minima concentrazione inibente (MIC), considerandola come la più bassa quantità di sostanza in grado di inibire la crescita di *Candida* (CLSI, 2012).

Attività antifungina: metodo dell’agar vapour assay

Attraverso questo test è stata saggiata l’azione antifungina dell’olio essenziale di *A. leucotrichus* e di una sua formulazione cosmetica (che sarà descritta più avanti) nei confronti di tre funghi fitopatogeni e due funghi dermatofiti (**tabella 4**). Il test mette in evidenza l’attività antifungina della componente volatile dell’olio essenziale, poiché l’inoculo del fungo è messo a contatto con i soli vapori dell’olio essenziale.

FUNGO	TEMPERATURA E TERRENO	PATOGENICITA’
FITOPATOGENI		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici (CBS 123668)	24 °C PDA	Vive normalmente nel terreno e diventa parassita solo quando trova condizioni ambientali favorevoli. È dotato di una specifica attività patogena nei confronti del pomodoro che si esplica prevalentemente a temperature fra 27-30 °C; provoca la tracheofusariosi: iniziale ingiallimento delle foglie fino a necrotizzazione dei tessuti e morte della pianta (Kamilova et al., 2008).
<i>Pythium ultimum</i> (CBS 29131)	28 °C PDA	Fitopatogeno ubiquitario nel terreno; porta le radici delle piante a marcire per l’umidità; attacca diverse piante (mais, soia, patata, grano e abete) (Hendrix et al., 1973).

<i>Botrytis cinerea</i> (ATCC 48339)	24 °C PDA	Parassita che attacca molte varietà di piante, tra cui la più importante dal punto di vista economico è la vite (in particolare aggredisce i grappoli d'uva); nota come “muffa grigia” della vite (Daferera et al., 2003).
DERMATOFITI		
<i>Nannizzia gypsea</i> (ATCC 48982)	30°C SDA	Sinonimo: <i>Arthroderma gypseum</i> ; fungo geofilo, vive e si moltiplica nel terreno, provoca dermatofitosi soprattutto (<i>tinea corporis</i> , <i>tinea barbae</i> e <i>tinea capitis</i>) (Iwasawa et al., 2009).
<i>Tricophyton mentagrophytes</i> (CBS 160.66)	30°C SDA	Zoofilo (vive e si moltiplica sugli animali dai quali può essere trasmesso all'uomo); ospiti abituali sono: coniglio, cane e gatto; causa <i>tinea capitis</i> , <i>tinea barbae</i> , <i>tinea corporis</i> , <i>tinea pedis</i> e <i>tinea unguium</i> (Santos et al., 2006).

Tabella 4. Funghi fitopatogeni e dermatofiti testati

Attività antinfiammatoria: test di inibizione della 5-lipossigenasi

Per valutare l'attività antinfiammatoria è stato effettuato il test di inibizione della 5-lipossigenasi, enzima adibito alla conversione dell'acido arachidonico in leucotrieni, molecole lipidiche coinvolte nei processi infiammatori. Per il test è stata utilizzata la 5-lipossigenasi ricavata dalla soia, analoga a quella umana, e come substrato dell'enzima, l'acido linoleico, dimostrato essere catalizzato dall'enzima in maniera del tutto simile all'acido arachidonico, ma molto più agevole da manipolare.

L'attività antinfiammatoria è stata determinata sull'olio essenziale, sull'estratto etanolic e sul decotto e su due sostanze pure, perillaldeide e ammolattone. Il test enzimatico è stato eseguito mediante analisi allo spettrofotometro (ThermoSpectronic, Helios λ) utilizzando cuvette di quarzo e leggendo alla lunghezza d'onda di 234 nm. Tutti i campioni sono stati diluiti a cinque diverse concentrazioni (da 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$) in etanolo. Per ogni campione è stata preparata una miscela di reazione contenente 290 μL di tampone borato (12.37 mg/mL) a pH 9.0, 84 μL di acido linoleico in etanolo (1 $\mu\text{L/mL}$) e 6 μL della diluizione di campione in etanolo. La miscela è stata successivamente incubata in ghiaccio per 7 minuti ed a temperatura ambiente per 3 minuti, in modo da facilitare il contatto tra sostanza e substrato. La reazione è stata infine innescata tramite l'aggiunta di 4.5 μL di enzima e monitorata in cinetica continua per 1 minuto. Come controllo negativo è stato utilizzato etanolo mentre come controllo positivo acido nordiidroguaiaretico preparato alle stesse concentrazioni dei campioni. La percentuale di inibizione è stata calcolata comparando la pendenza della cinetica del campione con la pendenza del controllo negativo (El-Readi et al., 2013). Per valutare l'attività sono stati considerati i seguenti parametri: forte attività

con IC_{50} minore di 10 $\mu\text{g/mL}$; discreta con $10 \mu\text{g/mL} \leq IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$; moderata con $31 \mu\text{g/mL} < IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$; debole con $51 \mu\text{g/mL} < IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$; inattiva con IC_{50} maggiore di 100 $\mu\text{g/mL}$ (Baylac & Racine, 2003).

Presso i laboratori della prof.ssa Ilaria Lampronti dell'Università di Ferrara sono stati effettuati test di approfondimento dell'attività antinfiammatoria su cellule IB3-1 (cellule bronco-epiteliali fibrocistiche) e test di attività antiproliferativa su cellule eritroleucemiche umane K562. Verranno solo discussi brevemente i risultati ad oggi raggiunti.

2.5 Approfondimento di *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*

2.5.1 Composizione e proprietà chimico- fisiche della gomma

Purificazione del polisaccaride

I grani di gomma vengono macinati in un mortaio. 10 g di materiale vengono sciolti in 20 ml di acqua distillata per 6 ore a temperatura ambiente e centrifugati (1000 rpm, 15min) per rimuovere le parti insolubili. Il surnatante viene decantato, con agitazione costante, in 3 volte il suo volume di etanolo con agitazione costante. Il polisaccaride viene isolato mediante centrifugazione, trattato con etere e acetone quindi filtrato sotto vuoto ed essiccato sotto vuoto a temperatura ambiente.

Determinazione delle proprietà chimico-fisiche

Per il campione di gomma di *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* sono stati i seguenti parametri: solubilità, ceneri, potere rotatorio specifico, pH, contenuto di azoto e proteine (analisi elementale) sulla base della letteratura pregressa (Bisht et al., 2013; Lakhera & Kumar, 2017).

Determinazione del peso molecolare: analisi GPC

È stato utilizzato un GPC (gel permeation chromatography) Waters con colonna aquagel H&M tenuta a 35° ed equipaggiato con tre rivelatori: indice di rifrazione (Smartline 2300, Knauer) viscosimetro (Viscotek, Model 2700, Malvern) e light scattering (LALS e RALS mod. Viscotek 270 dual detector, Malvern). L'eluente era costituito da un tampone Tris pH= 7.4, 1M CaCl_2 con un flusso di 1mL/min. La concentrazione testata del campione era 27.5 mg/mL e il volume iniettato 200 μl . I dati sono stati raccolti ed analizzati dal software OmniSEC v.4.6.

Analisi termogravimetrica

Le analisi termogravimetriche (TGA) sono state eseguite utilizzando un strumento Mettler Toledo TGA/SDTA 851. I crogioli, in allumina, sono stati riscaldati con due diverse velocità: riscaldamento rapido (20 °C/min) se la perdita di peso del campione era inferiore all'1% in peso e riscaldamento a 2 °C/min quando la perdita di peso rilevata era superiore all'1% in peso in flusso di azoto (70 mL/min). A temperatura di 600 °C il flusso di azoto è sostituito con aria.

Peso equivalente apparente e acido uronico totale

Il polisaccaride della gomma contiene residui di acidi uronici in parte presenti come sali di sodio, potassio, calcio e magnesio. Gli acidi uronici nel campione sono stati quantificati dai parametri peso equivalente e acido uronico totale.

Il peso equivalente (o equivalente di neutralizzazione) del polisaccaride è stato determinato per titolazione, con una soluzione standard di idrossido di sodio, di una soluzione contenente un peso noto del polisaccaride con i residui uronici portati tutti in forma acida.

Il polisaccaride in forma acida è stato ottenuto per trattamento di una soluzione al 3% p/v di gomma con una resina Amberlite IR-120 a scambio cationico fortemente acida. La soluzione filtrata è stata titolata con una soluzione standard di idrossido di sodio 0.01 N usando come indicatore fenolftaleina. Il peso equivalente è stato calcolato come segue:

La percentuale di acido uronico totale è stata calcolata nel modo seguente:

Acido uronico totale = $194 \times 100 / \text{peso equivalente}$

dove 194 è il peso molecolare dell'acido glucuronico

Analisi dei metalli

È stata condotta secondo il metodo descritto le altre droghe al paragrafo 2.2

Idrolisi e caratterizzazione GC-MS della gomma di acacia idrolizzata

100 mg di campione di gomma purificata sono stati trattati con acido trifluoroacetico 2M (TFA) per 3 ore a 120 °C in un flacone di vetro sigillato. L'acido residuo è stato in seguito rimosso mediante liofilizzazione.

Alcuni milligrammi di gomma di acacia idrolizzata sono stati ridisciolti in 200 µL di piridina e derivatizzati con 200 µL BSTFA/TMCS a 80°C per 1 ora. Al termine il

campione è stato portato a secco sotto flusso di azoto e ripreso in 300 μL di esano 1 μL di campione è stato iniettato in GC-MS.

Il cromatografo Varian 3800 equipaggiato con una colonna Varrian Factor Four VF-5ms interfacciato con uno spettrometro di massa Varian SATURN MS-4000, con ionizzazione ad impatto elettronico, analizzatore a trappola ionica è stato già descritto in precedenza, come pure le condizioni sperimentali dello spettrometro di massa: Il gas-cromatografo è stato settato nelle seguenti modalità: flusso del gas carrier, elio, a 1.2 mL/min, temperatura dell'iniettore a 300 °C, rapporto di split 1:50. Un microlitro di gomma idrolizzata o zucchero standard derivatizzati sono stati iniettati: l'analisi è stata eseguita impostando una programmata di temperatura, da 130 a 170 °C con una velocità di 2 °C/min, da 170 a 220 °C a 10°C/min, da 220 a 300 °C a 20°C/min, mantenendo poi questa temperatura per 5 minuti. La durata totale di acquisizione del cromatogramma era pari a 34 minuti (Medeiros & Simoneit, 2007).

Caratterizzazione spettroscopica IR e NMR

La spettroscopia IR (infrared) e NMR (nuclear magnetic resonance) sono tecniche non distruttive che offrono una risposta analitica riproducibile con una minima preparazione del campione e sono ampiamente utilizzate per il *fingerprinting* di miscele complesse.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrometro Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500, gli spettri NMR con uno spettrometro Varian Mercury Plus 400 operante a 400 MHz per il protone e 100 MHz per il carbonio-13.

2.5.2 Attività biologica della gomma di *A. tortilis* subsp. *raddiana*

Per dimostrarne l'attività cicatrizzante è stato preliminarmente svolto un test di attività citotossica su cheratinociti e, una volta individuato il range di concentrazioni non tossiche, provata la capacità di rimarginazione della ferita con il test del wound healing.

Per la valutazione dell'attività citotossica della gomma di acacia grezza e purificata, sono state utilizzate le cellule HaCaT, cheratinociti umani immortalizzati (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna). Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM (4.5 g/L di glucosio) arricchito con 10% di FBS, 2mM di L-glutammina (Sigma-Aldrich), 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomina (Sigma-Aldrich) (terreno completo). Le cellule HaCaT sono state coltivate in fiasche da 75 cm² e mantenute in incubatore ad una temperatura di 37°C in un'atmosfera satura di umidità, contenente aria-CO₂ (95%-5%).

Successivamente le cellule HaCaT (20.000 cellule) sono state seminate in 200 μ L di terreno al 10% di FBS, utilizzando una piastra da 96 pozzetti. La piastra è stata poi incubata a 37°C per 4 ore in modo da permettere alle cellule di aderire al fondo del pozzetto; trascorso il tempo stabilito il terreno completo è stato sostituito da terreno ridotto al 2% di FBS. Le cellule sono state esposte per 24 e 48 ore ad un ampio range di concentrazioni (da 10 a 2000 μ g/mL) di gomma di acacia grezza ed elaborata, al fine di valutare un possibile effetto citotossico mediante il test MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro).

Tale saggio colorimetrico è basato sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale succinato (Mosmann, 1983). Dal punto di vista sperimentale l'MTT è stato disciolto in PBS ad una concentrazione finale di 0.5 mg/mL e, dopo 24 e 48 ore, le cellule sono state trattate con MTT ad una quantità pari ad 1/10 del volume finale presente in ciascun pozzetto. Dopo 4 ore di incubazione a 37°C, sono stati aggiunti 150 μ l/pozzetto di DMSO al fine di sciogliere i cristalli di formazano. Infine è stata eseguita una lettura spettrofotometrica in un lettore di piastre 680 XR ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software GraphPad PRISM versione 4 (GraphPad Inc.) I valori medi dei controlli e delle cellule trattate sono stati confrontati utilizzando un test ANOVA seguito dal test post-hoc di Dunnett per identificare le differenze significative. Il limite di significatività considerato è stato $p < 0.05$.

2.6 Formulazioni cosmetiche di acacia e *A. leucotrichus*

Presso il centro di Cosmetologia dell'Università di Ferrara sono state preparate alcune formulazioni a differenti concentrazioni di droga: un gel al 5% e al 10% di acacia purificata, un oleolita e un lipogel al 1% e al 2% di olio essenziale di *A. leucotrichus*, secondo lo schema in **tabella 5, 6, 7**.

	Componenti	%	INCI
1	Acqua demineralizzata	q.b. a 100	Aqua
2	Glicerina	3.000	Glycerin
3	Bioscontrolsenenergy BAS	1.000	Benzyl alcohol, Dehydroacetic acid, Aqua
4	Acacia	5.000-10.000	
5	Gomma xantana trasparente	1.000	Xanthangum
6	Soluzione di soda 10%	q.b.	Aqua, sodium hydroxide
	Totale	100.000	

Tabella 5. Composizione scalare quali-quantitativa delle materie prime e relative liste ingredienti per la formulazione di acacia

Sono stati pesati i componenti 1, 2, 3 e mescolati insieme. È seguito un riscaldamento a 40-50°C, poi sotto agitazione è stato aggiunto il componente 4 fino ad ottenere una soluzione trasparente e limpida, infine il 5. Si è proceduto a controllare il pH e a portarlo in un range compreso fra 5 e 5.5 con soda (6).

	Componenti	%	INCI
1	Cetiol CC	98	Dicaprylyl carbonate
2	Olio essenziale di <i>A. leucotrichus</i>	2.000	
	Totale	100.000	

Tabella 6. Composizione scalare quali-quantitativa delle materie prime e relative liste ingredienti per la formulazione di oleolita con olio essenziale di *A. leucotrichus*

E' stato pesato il componente 1 sotto agitazione è stato aggiunto il 2.

	Componenti	%	INCI
1	Cetiol CC	q.b. a 100	Dicaprylyl carbonate
2	Myritol	20.000	Caprylic capric triglyceride
3	Cera d'api bianca	5.000	Cera alba
4	Cutina HR	4.000	Hydrogenated castor oil
5	Olio essenziale di <i>A. leucotrichus</i>	1.000-2.000	
	Totale	100.000	

Tabella 7. Composizione scalare quali-quantitativa delle materie prime e relative liste ingredienti per la formulazione di lipogel con olio essenziale di *A. leucotrichus*

Sono stati pesati i componenti 1, 2, 3, 4 e mescolati insieme. È seguito un riscaldamento a 80°C fino a fusione dei solidi. La miscela è stata raffreddata omogeneizzando con Turrax fino ad ottenimento di un gel anidro omogeneo e privo di grumi. Si è proceduto ad aggiungere il componente 5 sotto agitazione.

L'oleolita al 2% e il gel di acacia al 10% sono stati sottoposti a Patch test, attività antibatterica e attività antiossidante con metodo strumentale della fotochemilumiscenza secondo metodi interni al laboratorio, mentre è stata testata l'attività antifungina con vapour agar assay, precedentemente descritto.

3. Risultati e discussione

3.1 Raccolta, essiccamento e autenticazione della droga

Le droghe, raccolte a Bir Lehlu nel marzo 2016, sono state pesate subito e dopo 15 giorni, tempo impiegato per l'essiccamento all'aria. Nella seguente **tabella (8)** si riportano i pesi delle droghe raccolte allo stato fresco e dopo essiccazione per determinarne il contenuto d'acqua che potrà essere utile per discutere i valori nutrizionali.

Droga	peso fresco droga	peso secco droga	% acqua
<i>A. leucotrichus</i>	28.59	9.60	66.42
<i>A. halimus</i>	30.04	6.06	79.83
<i>M. pubescens</i>	30.44	7.50	75.36
<i>C. ambyocarpa</i>	30.10	11.38	62.19
<i>N. perrinii</i>	30.04	8.06	73.17
<i>A. hierochuntica</i>	27.29	6.60	75.82
<i>A. garcinii subsp. radiata</i>	30.69	12.78	58.36

Tabella 8. Percentuale d'acqua delle droghe

Le droghe hanno un contenuto d'acqua che va dal 58.36% al 79.83%.

A titolo esemplificativo si riporta l'autenticazione in laboratorio di alcune droghe.



Figura 32 *A. leucotrichus* (frutti)



Figura 33. *A. halimus* (foglie)

Nei campioni di droga è stata rilevata la presenza di altre parti della stessa pianta, di terriccio e residui di altre specie. Prima di sottoporle ad analisi successive è stata eseguita un'operazione manuale di cernita, di separazione del materiale estraneo dalla droga propriamente detta.

Osservando i caratteri macroscopici dei campioni delle due droghe allo stereomicroscopio (**figura 34**) e confrontandoli con le specifiche riportate in letteratura (**tabella 9**) si è potuto confermare la loro autenticità.

	<i>A. leucotrichus</i>	<i>A. halimus</i>
Droga	frutti essiccati	foglie essiccate
Colore	giallo-marrone	verdi
Odore	aromatico (simile a anice)	nessuno
Aspetto	i frutti, di colore giallo, sono diaceni di forma ovale, lunghi 6-10 mm e fittamente ricoperti da peli bianchi e setosi (IUNC Centre for Mediterranean Cooperation, 2005)	le foglie (10-30 mm lunghe e 5-20 mm larghe) hanno forme variabili dalla deltoide, sferica alla lanceolata (Walker et al., 2014)

Tabella 9. Caratteri organolettici e morfologici delle due droghe

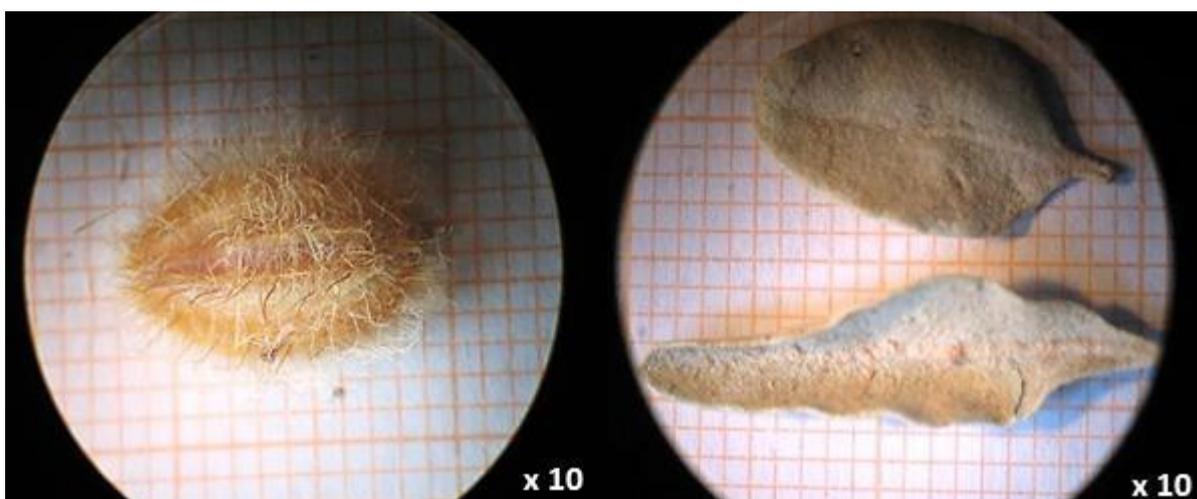


Figura 34 *A. leucotrichus* (frutti) e *A. halimus* (foglie)

Operando allo stesso modo si è proceduto ad effettuare operazioni di cernita e osservazione allo stereo microscopio delle altre droghe-

3.2 Analisi bromatologica

Operando secondo i metodi descritti nel paragrafo 2.2 sono stati ottenuti i dati relativi ai macro e micronutrienti presenti nelle droghe, alla umidità e alle ceneri (**tabella 10**).

Come controllo positivo per i risultati ottenuti sulle droghe oggetto di studio sono stati considerati i valori determinati in letteratura sulle foglie di *Moringa oleifera*, specie oggetto di sperimentazione nelle singole case sahwari (ogni famiglia ha una piccola pianta ad integrazione della dieta) (Leone et al, 2015).

	<i>A. halimus</i> (foglie)*	<i>A. leucotrichus</i> (frutti)*	<i>N. perrini</i> (foglie)*	<i>A. garcinii</i> (parti aeree)*	<i>C. amblyocarpa</i> (parti aeree)*	<i>A. hierochuntica</i> (parti aeree)*	<i>M. pubescens</i> (parti aeree)*	<i>Moringa oleifera</i> (foglie) lett.**	Fabbisogno giornaliero***
Umidità (g/100g)	5.39 ± 0.29	10.59 ± 0.33	4.71 ± 0.10	6.50 ± 0.25	6.29 ± 0.16	4.79 ± 0.55	8.18 ± 0,25	-	
Proteine (g/100g)	12.15 ± 0.78 (9.69)	9.14 ± 0.62 (6.07)	11.84 ± 0.31 (8.66)	11.31 ± 1.12 (6.60)	12.77 ± 0.18 (7.94)	5.69 ± 0.28 (4.31)	7.98 ± 0.17 (6.01)	27.98 ± 0.12	43-50 g
Lipidi (g/100g)	2.42 ± 0.23 (1.93)	11.30 ± 0.14 (7.51)	1.57 ± 0.11 (1.45)	7.51 ± 0.08 (4.38)	4.85 ± 0.06 (3.02)	1.16 ± 0.02 (0.88)	3.86 ± 0.04 (2.91)	4.85 ± 0.30	20-35% energia totale dieta
Fibra totale (g/100g)	39.13±0.44 (31.24)	60.12±2.96 (39.93)	38.25±0.05 (27.99)	60.10±1.06 (35.07)	47.25±0.09 (29.38)	77.44±1.04 (58.72)	57.99±1.33 (43.71)	31.88 ± 0.34	25g
Fibra solubile (g/100g)	8.39±0.19 (6.70)	6.81±0.38 (4.52)	16.84±0.22 (12.32)	12.96±0.68 (7.56)	6.30±0.20 (3.92)	8.12±0.38 (6.16)	9.81±0.70 (7.39)	3.94 ± 0.07	
Fibra insolubile (g/100g)	30.75±0.25 (24.55)	53.31±3.34 (35.41)	21.41±0.26 (15.67)	47.14±0.39 (27.51)	40.95±0.29 (25.47)	69.30±1.44 (52.61)	48.18±0.63 (36.31)	27.94 ± 0.27	
CENERI (g/100g)	27.63 ± 1.45 (22.06)	10.00 ± 0.01 (6.64)	35.66 ± 0.11 (26.09)	10.14 ± 0.56 (5.92)	18.61 ± 1.05 (11.57)	5.09 ± 0.16 (3.86)	9.10 ± 0.16 (8.86)	13.38 ± 0.05	
Ca (mg/g)	17.49 ± 0.45 (13.96)	6.91 ± 0.18 (4.59)	33.76 ± 0.40 (24.70)	17.89 ± 0.79 (10.43)	12.81 ± 0.49 (7.97)	7.99 ± 0.42 (6.06)	12.22 ± 0.20 (9.21)	27.43 ± 0.39	1.0-1.2 g
Mg (mg/g)	15.55 ± 0.02 (12.41)	2.34 ± 0.07 (1.55)	8.35 ± 0.05 (6.10)	3.02 ± 0.07 (1.76)	2.24 ± 0.07 (1.39)	2.35 ± 0.07 (1.78)	3.39 ± 0.01 (2.55)	4.90 ± 0.09	240 mg
Fe (mg/g)	0.99 ± 0.03 (0.79)	0.86 ± 0.11 (0.57)	0.12 ± 0.02 (0.09)	0.47 ± 0.01 (0.27)	1.24 ± 0.04 (0.77)	0.23 ± 0.01 (0.17)	0.31 ± 0.02 (0.23)	0.42 ± 0.01	10 – 18 mg (27 mg gravidanza)
Na (mg/g)	49.36 ± 0.35 (39.40)	1.56 ± 0.04 (1.04)	90.48 ± 2.31 (66.20)	1.52 ± 0.02 (0.89)	0.65 ± 0.05 (0.40)	7.81 ± 0.21 (5.92)	11.77 ± 0.01 (8.87)	7.91 ± 0.04	1.2 – 1.5 g
K (mg/g)	23.48 ± 0.31 (18.74)	16.36 ± 0.88 (10.87)	18.79 ± 0.06 (13.75)	16.50 ± 0.89 (9.63)	13.95 ± 0.13 (8.68)	9.89 ± 0.42 (7.50)	13.71 ± 0.08 (10.39)	-	3.9 g
Zn (µg/g)	18.59 ± 4.26 (14.84)	29.84 ± 2.89 (19.81)	16.89 ± 4.12 (12.36)	18.85 ± 1.38 (11.05)	17.94 ± 2.81 (11.16)	7.99 ± 0.01 (6.06)	11.97 ± 2.81 (9.02)	30.90 ± 0.10	9-12 mg (900-1200 µg)
Cu (µg/g)	5.20 ± 0.01 (4.15)	6.37 ± 0.01 (4.23)	6.36 ± 1.65 (4.65)	9.81 ± 0.13 (5.73)	4.89 ± 0.14 (3.04)	3.40 ± 0.57 (2.58)	8.29 ± 0.29 (6.25)	12.2 ± 0.80	0.9 mg (900 µg) (1.2 mg gravidanza)
Mn (µg/g)	307.74 ± 2.41 (245.66)	29.34 ± 0.36 (19.49)	69.41 ± 0.18 (50.79)	54.7 ± 0.50 (31.93)	46.95 ± 2.98 (29.20)	11.59 ± 0.01 (8.79)	93.74 ± 0.07 (70.64)	-	2.3 – 2.7 mg (2300-2700 µg)
Cr (µg/g)	25.78 ± 0.53 (20.58)	114.78 ± 5.34 (76.24)	29.29 ± 0.68 (21.43)	28.34 ± 3.56 (16.54)	79.64 ± 3.56 (49.53)	45.06 ± 3.53 (34.16)	15.56 ± 3.09 (11.73)		20-35 µg
Ni (µg/g)	4.90 ± 0.43 (3.92)	24.57 ± 0.65 (16.32)	nr	nr	5.78 ± 0.57 (3.59)	2.40 ± 0.85 (1.82)	Nr		

Tabella 10. Risultati ottenuti dall'analisi bromatologica

*i valori tra parentesi sono riferiti alla droga allo stato fresco; **dati di letteratura (Leone et al., 2015); ***dati della tabella LARN 2014 per la popolazione italiana adulta

Due principali considerazioni possono essere estrapolate dai risultati ottenuti:

1. Per quanto concerne i macronutrienti *A. leucotrichus*, data la sua natura di pianta aromatica avente frutti ricchi di sostanze con carattere apolare, ha dato una buona percentuale lipidica (11.30%) quasi confrontabile ai semi di “semi” di finocchio (14.87%), pianta della stessa famiglia, e molto più elevata di *M. oleifera* foglie; *A. halimus*, *N. perrinii*, *C. amblyocarpa* hanno invece mostrato il più alto apporto proteico (12.15%, 11.84%, 12.77%, rispettivamente), ma inferiore a *M. oleifera* (27.98%); *A. hierochuntica* ha mostrato un elevato contenuto di fibra totale (77.44%) rispetto a *M. oleifera* (31.88%); le ceneri erano elevate per *N. perrinii* e *A. halimus* (35.66%, 27.63% e se riferite allo stato fresco 26.09%, 22.06%) rispetto a *M. oleifera* (13.38%), indice di un elevato contenuto in macro e oligoelementi, percentuale determinata principalmente da una grande quantità di calcio e sodio per *N. perrinii* (33.7 mg/g, 90.48 mg/g).

2. Per quanto riguarda il contenuto dei singoli macroelementi, *N. perrinii* presentava quantità di calcio, sodio e magnesio superiori a *M. oleifera*, anche *A. halimus* per sodio, ferro, magnesio e quantità di potassio superiori alle altre piante. *A. halimus* è nota come piante xero-alofita capace di assorbire grandi quantità di sali e crescere in ambienti salini.

In particolare, per i macroelementi:

-Calcio: è indispensabile per la regolazione della contrazione muscolare (compreso il muscolo cardiaco), la coagulazione sanguigna (attiva la protrombina o vitamina K), la trasmissione degli impulsi nervosi, la regolazione della permeabilità cellulare, l'attività di numerosi enzimi (favorisce la liberazione di insulina da parte delle cellule pancreatiche) e per la crescita e la fortificazione dei denti e delle ossa.

Gli alimenti che contengono la maggiore quantità di calcio sono il latte e i derivati, uova, legumi e pesci. Secondo la Società Italiana di Nutrizione Umana, l'assunzione raccomandata è per gli adulti di circa 1.0-1.2 g.

La carenza di calcio può causare nel bambino rachitismo, caratterizzato da un'insufficiente calcificazione delle ossa, e nell'adulto l'osteomalacia, con impoverimento della sola componente minerale, e l'osteoporosi, con impoverimento anche della componente proteica del tessuto osseo. Al contrario, un eccesso di questo macroelemento è collegato, soprattutto, all'insorgenza di calcoli renali (Cabras & Martelli, 2004).

Il contenuto di calcio risultava essere per *N. perrinii* (33.76 mg/g, 24.70 mg/g allo stato fresco), migliore di *M. oleifera*.

- Magnesio: è necessario per la costituzione dello scheletro, per l'attività nervosa e muscolare (antagonizzando il calcio), per il metabolismo dei grassi e per la sintesi proteica e degli acidi

nucleici, essendo catalizzatore di molti enzimi; ha azione lassativa ad alti dosaggi e antiacida a bassi dosaggi. Il 60% del magnesio presente in un organismo è localizzato nelle ossa.

Questo minerale è generalmente assunto con la dieta perché il magnesio è largamente diffuso in molti alimenti. I valori di assunzione raccomandati sono pari a 240 mg al giorno.

Risultano particolarmente ricchi di questo minerale: noci, cacao, cereali e derivati e, dal momento che il magnesio è un costituente essenziale della clorofilla, tutti i vegetali verdi.

Vari sono i sintomi da carenza alimentare, soprattutto aumento dell'eccitabilità muscolare, ma è abbastanza rara e di solito associata a condizioni che ne riducono l'assorbimento o ne aumentano l'eliminazione. Al contrario sindromi da eccesso provocano la depressione del sistema nervoso centrale con disturbi all'attività cardiaca e respiratoria (Cabras & Martelli, 2004).

Il suo contenuto più alto nelle droghe è risultato essere di 15.55 mg/g in *A. halimus*.

- **Potassio:** è presente in forma di ione principalmente all'interno delle cellule, ma anche nei liquidi extracellulari, dove influenza l'attività dei muscoli scheletrici e del miocardio. In particolare il potassio intracellulare (attraverso la pompa sodio/potassio) controlla la pressione osmotica e mantiene l'equilibrio acido-base; quello extracellulare, partecipa alla trasmissione degli impulsi nervosi, alla regolazione della pressione arteriosa, alla contrattilità muscolare (con effetto miorelassante).

È contenuto in quasi tutti gli alimenti, ma abbonda soprattutto in patate, cavoli, spinaci e banane. Il fabbisogno giornaliero medio è di circa 3.9 g.

La carenza di potassio è abbastanza rara, data la sua diffusione negli alimenti, ed è legata all'assunzione di forti dosi di alcuni diuretici o ad alcune manifestazioni patologiche come il vomito o la diarrea, si manifesta con crampi muscolari, aritmie e tachicardia.

La sindrome da eccesso comporta invece ipotensione e bradicardia (Cabras & Martelli, 2004).

Il suo contenuto più alto è risultato essere di 23-48 mg/g in *A. halimus*.

- **Sodio:** contenuto nel sangue e nei liquidi intracellulari, è il regolatore fondamentale della permeabilità delle membrane cellulari e dei liquidi corporei. Interviene nella trasmissione dell'impulso nervoso e nella contrazione muscolare e, insieme al potassio contribuisce al mantenimento dell'equilibrio acido-base, al controllo della pressione osmotica e alla regolazione della pressione sanguigna;

È contenuto soprattutto nel sale da cucina (1 g di sale contiene circa 400 mg di sodio), ma ne sono ricchi anche i formaggi e la maggior parte degli alimenti conservati (salumi, insaccati, ecc.). Il fabbisogno raccomandato è compreso tra 1.2-1.5 g ma nella dieta degli italiani e delle popolazioni che vivono in climi caldi (come i Sahrawi) il sodio è presente in quantità maggiori per compensare le perdite attraverso le urine e il sudore; infatti, oltre che essere naturalmente presente negli alimenti, il sodio, è aggiunto ad essi sia nella cucina casalinga come NaCl per

umentare la conservabilità dei prodotti alimentari, sia sotto forma di glutammato monosodico per esaltarne il sapore e per la preparazione di dadi da brodo.

La carenza di sodio è molto rara nelle condizioni di vita degli italiani, ma per i saharawi nella stagione estiva, può divenire un fattore importante, e potrebbe essere dovuta a disidratazione, a diarrea e vomito profusi, sudorazioni eccessive e disfunzioni renali.

Quantità di dosi eccessive introdotte con la dieta possono predisporre all'insorgenza dell'ipertensione arteriosa (Cabras & Martelli, 2004).

N. perrinii risultava avere un contenuto molto alto di Na (90.48 mg/g), *A. halimus* (49.36 mg/g).

Tra gli oligoelementi, importanti risultati sono stati ottenuti per:

- **Ferro:** la sua funzione fondamentale è quella di trasportare l'ossigeno e il biossido di carbonio attraverso l'emoglobina e la mioglobina; inoltre è presente, come coenzima, in numerosi sistemi enzimatici (per la sintesi delle basi puriniche e del collagene, per la produzione di anticorpi e per la trasformazione del β -carotene in vitamina A).

Il fabbisogno giornaliero prevede un'assunzione pari a 10-18 mg per adulti; per la donna in gravidanza le quantità consigliate sono di 27 mg, ma sono difficilmente raggiungibili anche con un'alimentazione equilibrata, per cui viene consigliata una supplementazione.

Le principali fonti alimentari di ferro sono il fegato, le carni, il pesce, le uova, i cereali, spinaci e radicchio; poveri invece sono il latte e i suoi derivati, infatti i lattanti sono soggetti a rischio di carenza di ferro.

I valori giornalieri consigliati tengono conto del fatto che l'assorbimento di questo elemento riguarda solo una piccola quota (attorno al 10%) di quello ingerito con gli alimenti; inoltre il nostro organismo riesce ad assorbire principalmente il ferro emico (cioè quello che fa parte del gruppo eme), presente negli alimenti di origine animale. Negli alimenti vegetali, invece, esso è presente in genere come Fe^{3+} , che per essere assorbito deve subire una riduzione a Fe^{2+} ; oltretutto se da un lato la presenza di acido ascorbico (vitamina C) negli alimenti ne favorisce l'assorbimento contribuendo ad abbassare il pH e a favorire conseguentemente la riduzione del Fe^{3+} , dall'altro, la presenza di acido fitico (ricco nei cereali) e di acido ossalico (in alcune verdure come gli spinaci) ne limita l'assorbimento poiché questi acidi complessano gli ioni bivalenti (Fe^{2+}).

Anche se la quantità di ferro eliminata dal nostro organismo è minima, la carenza di ferro è abbastanza diffusa e può essere causata sia da un apporto dietetico ridotto, per esempio per una dieta rigorosamente vegetariana, sia da patologie che ne provocano un insufficiente assorbimento o un'eccessiva eliminazione (malassorbimento, celiachia ecc.). La celiachia è

una patologia diffusa nei Sahrawi che essendo una comunità chiusa presentano il rischio di una maggiore trasmissione genetica di generazione in generazione.

La carenza di ferro provoca astenia, affaticabilità e anemia. L'eccesso di ferro provoca invece danni agli organi in cui si accumula (siderosi) ma ha una base prevalentemente genetica (Evangelisti, 2011).

Il suo contenuto è risultato essere di 1.24 mg/g in *C.amblyocarpa*, 0.99 mg/g in *A. halimus* e 0.86 mg/g in *A. leucotrichus*, valori più elevati rispetto a *M. oleifera*.

- **Manganese:** cofattore di numerosi enzimi come la superossido-dismutasi (potente antiossidante), la DNA-sintetasi e la RNA-sintetasi; è anche indispensabile per il corretto sviluppo delle ossa.

Questo minerale si trova sia in alimenti di origine vegetale (cereali, legumi e ortaggi) sia in quelli di origine animale (pesci e carni).

Il fabbisogno raccomandato varia tra gli 2.3 e i 2.7 mg perché solo una piccola quota (circa il 5-10%) di esso viene assorbita.

La carenza di manganese, anche se rara, provoca ritardo nella crescita; l'eccesso è stato correlato a effetti neurotossici (Evangelisti, 2011).

Il suo contenuto risulta particolarmente elevato pari a 307.74 µg/g in *A. halimus*, mentre più basso 93.74 µg/g in *M. pubescens*.

Scarsi risultati rispetto a *M. oleifera* sono stati ottenuti per:

- **Zinco:** nel plasma è presente sotto forma di aggregati con varie proteine e aminoacidi ed è cofattore di numerosi e importanti enzimi.

Il fabbisogno raccomandato per l'uomo adulto è di circa 9-12 mg.

La quantità realmente assorbita di zinco equivale a circa il 25-40% di quello ingerito; le concentrazioni maggiori sono presenti nella carne e nel pesce; è presente anche, in quantità minore, nella verdura, nella frutta e nei cereali, ma la presenza di acido fitico ne riduce l'assorbimento.

La carenza di zinco può dipendere da insufficiente o cattivo assorbimento (età avanzata, dieta ricca di cereali e povera di carne) o da un'eccessiva eliminazione urinaria (epatopatia, somministrazione di sostanze chelanti, ecc.). La sintomatologia da carenza di zinco è quanto mai complessa: danni all'accrescimento dei bambini, nanismo, ipogonadismo, infertilità, alterazioni cutanee e difettosa cicatrizzazione delle ferite.

Un'assunzione eccessiva di questo minerale provoca invece febbre, nausea, vomito e diarrea (Evangelisti, 2011).

Il suo contenuto nelle piante oggetto di studio è stato rivelato più alto in *A. leucotrichus* (0.029 mg/g rispetto a 0.031 mg/g per *M.oleifera*).

- **Rame:** ha un ruolo essenziale nel corretto funzionamento di numerosi enzimi.

La quantità di rame assunto con la dieta è generalmente sufficiente a coprire il fabbisogno giornaliero, stimato per l'adulto intorno a 0.9 mg e 1-2 mg per le donne in gravidanza. Ne sono particolarmente ricchi legumi, cereali, pesci, crostacei e carne.

La carenza di rame può essere un fattore di rischio per aterosclerosi e malattie cardiovascolari. Al contrario un'intossicazione acuta dà anemia emolitica (Evangelisti, 2011).

Le droghe maggiormente ricche sono *A. radiata* e *M. pubescens*, ma il valore è più basso a quello di *M. oleifera*.

Per quanto riguarda i metalli pesanti

- **Cromo:** l'analisi è stata eseguita principalmente per determinare il contenuto di cromo, coinvolto nel metabolismo glicemico, così da poter trovare una giustificazione scientifica sull'utilizzo tradizionale di alcune droghe, come *A. halimus*, *A. radiata*, *N. perrinii* soprattutto, nella cura del diabete. I valori trovati per grammo sono comparabili alla dose giornaliera raccomandata. Per *A. leucotrichus* i valori sono molto alti per grammo, più di 3 volte la dose giornaliera, di 20-35 µg.

Tra i metalli pesanti che la farmacopea richiede di analizzare per il piombo (< 3 ppm) i valori si aggiravano tra 0.70-7.46 µg/g: per *N. perrinii* con 7.46±0.38 µg/g il valore superava il limite di farmacopea, come per *A. halimus* (4.10±0.71 µg/g), per *A. garcinii* subsp. *radiata* (3.87±0.71 µg/g), *M. pubescens* 3.69±0.43 µg/g. Rientravano invece nei limiti per *A. leucotrichus* 2.09±0.42 µg/g, per *C. amblyocarpa* 0.70±0.14 µg/g, per *A. hierochuntica* 1.70±0.27 µg/g.

Tali risultati meritano attenzione per quanto riguarda il possibile sfruttamento come integratori alimentari delle droghe studiate: dovranno essere raccolti in natura un maggior numero di campioni e reperiti altri sui mercati per valutarne meglio il contenuto. Dovrà anche essere effettuata una valutazione dei siti eventualmente inquinati da metalli pesanti nei territori liberati, dove sono stati raccolti i campioni.

Il Cd ha mostrato valori tutti inferiori al limite di rivelabilità (0.01 ppm), quindi inferiori a 1.0 ppm previsto in farmacopea.

Le determinazioni eseguite hanno quindi permesso una caratterizzazione del profilo nutrizionale delle piante prese in esame. I valori ottenuti dovrebbero essere contestualizzati all'interno della dieta della popolazione sahwawi, e dovrebbero essere eseguite ulteriori

analisi per determinare, per esempio, come cambiano i valori nutrizionali dopo la cottura delle piante o quanto e come l'acqua utilizzata possa influire su tali cambiamenti.

In letteratura non si ha alcun riferimento riguardo queste analisi e ciò conferisce ai nostri test un carattere di innovatività.

Profilo degli acidi grassi via GC-MS

Acido grasso	<i>A. leucotrichus</i> Area%	<i>A. halimus</i> Area%	<i>C. amblyocarpa</i> Area%	<i>M. pubescens</i> Area%	<i>N. perrini</i> Area%	<i>A. garcinii</i> Area%	<i>A. hierochuntica</i> Area%
Palmitico	3.33	35.80	11.52	14.43	22.11	38.13	15.93
Palmitoleico	0.33	nr	3.96	nr	0.95	nr	nr
Stearico	nr	nr	5.93	2.60	1.47	nr	3.51
Oleico	86.70	1.71	21.29	5.46	2.72	nr	24.79
Linoleico ($\omega 6$)	9.27	17.48	44.58	48.36	21.12	20.55	24.60
Linolenico ($\omega 3$)	0.38	45.00	11.72	29.15	51.63	41.33	31.17
Arachidonico	nr	nr	1.00	nr	nr	nr	nr

Tabella 11. Profilo degli acidi grassi nelle droghe

Come descritto in tabella 10, il contenuto maggiore di lipidi è stato determinato in *A. leucotrichus* (11.30 ± 0.14 %), seguito da *A. garcinii* subsp. *radiata* (7.51 ± 0.08 %), *C. amblyocarpa* (4.85 ± 0.06 %) che uguaglia il contenuto nelle foglie di *M. oleifera*. Il profilo degli acidi grassi di *A. leucotrichus* è molto simile a quello di un olio di oliva (acido oleico non $<73\%$ e acido linoleico non $>10\%$) con 86.70% di acido oleico e 9.27% di acido linoleico, mentre in *A. garcinii* subsp. *radiata* prevale acido linolenico ($\omega 6$, 41.33%) e in *C. amblyocarpa* acido linoleico ($\omega 3$, 44.58%), caratteristiche importanti per un utilizzo nell'integrazione alimentare.

L'acido oleico viene ritenuto estremamente desiderabile nella dieta ed in particolare il suo ridotto livello di insaturazione rende gli oli che ne sono particolarmente ricchi più stabili nei confronti dell'ossidazione, cosa estremamente importante negli usi a caldo (Cabras & Martelli, 2004).

Di particolare interesse è la presenza dell'acido linoleico e linolenico, comunemente indicati come EFA (Essential Fatty Acid) poiché il nostro organismo non è in grado di sintetizzarli e per assimilarli è necessario introdurli con la dieta. Da questi grassi l'uomo è in grado di sintetizzare tutti gli altri polinsaturi, tramite enzimi che consentono di allungare la catena carboniosa e di aumentare il numero di doppi legami, ottenendo due specie di

composti: gli acidi grassi polinsaturi della famiglia degli omega-3 e quelli della famiglia degli omega-6.

Gli acidi grassi polinsaturi, se da un lato conferiscono all'olio una minore stabilità, dall'altro ne determinano un valore aggiunto poiché sono fondamentali per molte funzioni dell'organismo: per la crescita, la produzione di energia, la sintesi dell'emoglobina, la corretta funzione sessuale e riproduttiva e per la prevenzione delle patologie della pelle. Inoltre si è visto come molte patologie mammarie e di alterazione del ciclo mestruale derivino da una eccessiva assunzione di acidi grassi saturi in rapporto agli omega-3 e omega-6 (Simopoulos, 2008). In aggiunta studi sia in vitro che in vivo hanno comprovato l'ipotesi dei benefici che apportano gli acidi grassi polinsaturi alla salute delle ossa; in particolare, persone che non assumono abbastanza acidi grassi essenziali con la dieta, sono più soggetti a fratture ossee rispetto a persone con livelli normali di acidi grassi (Griel et al., 2007).

Diverse ricerche hanno dimostrato che gli omega 3 inducono una riduzione del colesterolo totale, di quello LDL e dei trigliceridi nel sangue con l'aumento del colesterolo HDL portando ad una riduzione del tasso di mortalità dovuta a malattie del cuore (infarto del miocardio o ictus) (Psota et al., 2006).

Alcuni studi hanno dimostrato l'utilizzo degli acidi grassi omega-6 nel trattamento delle vampate di calore durante la menopausa, azione in particolare determinata dall'acido γ -linolenico (derivante dalla conversione dell'acido linoleico nell'organismo umano) (Farzaneh et al., 2013); è stato dimostrato anche, che donne con cancro al seno che assumevano acido γ -linolenico rispondevano meglio alla terapia con tamoxifene rispetto a quelle che assumevano solo il farmaco (Manni et al., 2011).

3.3 Valutazione quali-quantitativa del contenuto di polifenoli e attività antiossidante

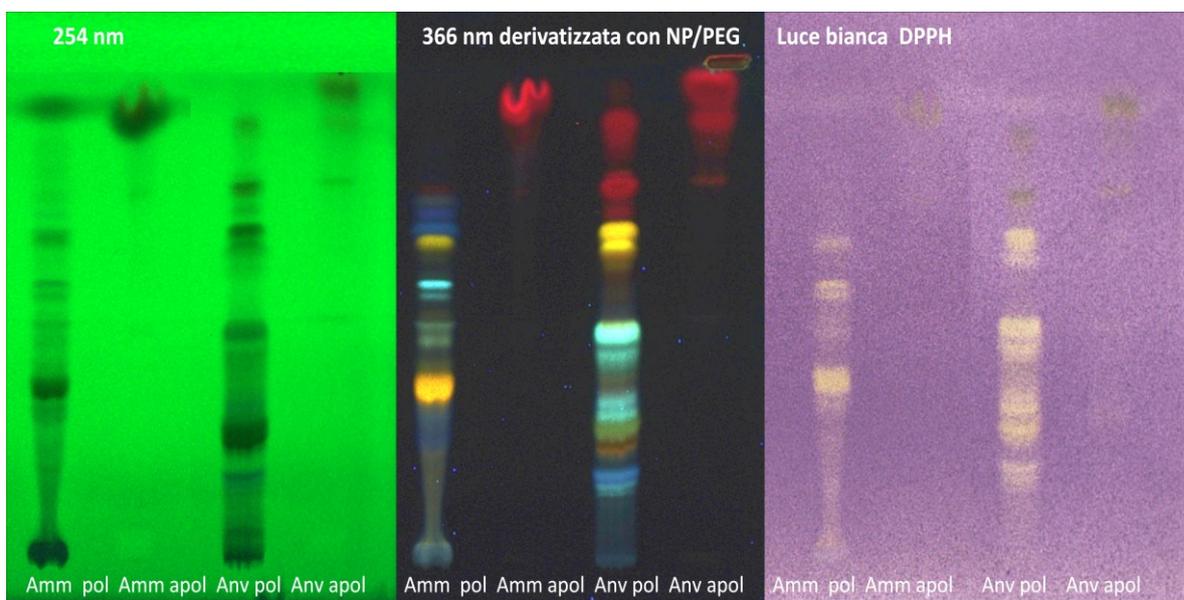
Utilizzando un'estrazione selettiva proposta da Andrewes *et al.* (2003), dalle droghe oggetto di studio sono state ottenute due soluzioni, una apolare (con esano, miscelato in piccole porzioni con etanolo) e una polare (con solvente misto etanolo-acqua), che conseguentemente hanno estratto componenti apolari nel primo caso e polari nel secondo.

Dopo un primo screening qualitativo in TLC che ha rivelato uno scarso interesse nella composizione e nell'attività della frazione apolare, mentre più interessante si è rivelata la frazione polare, su quest'ultima è stato determinato il contenuto di polifenoli totali e IC₅₀ per il test del DPPH.

Screening in HPTLC di fenoli e attività antiradicalica (DPPH)

Nella lastra cromatografica di **figura 35** è stato evidenziato che le frazioni apolari delle due droghe *A.leucotrichus* (frutti) e *A. garcinii* subsp. *radiata* (foglie) erano per lo più costituite da clorofille (bande rosse a 366 nm); per la prima droga, ricca di lipidi, probabilmente i gliceridi apparivano sul fronte del solvente e erano responsabili della sbavatura evidente ad entrambe le lunghezze d'onda 254 e 366 nm; infine la macchia scura a 254 nm potrebbe essere dovuta a perillaldeide che, come si vedrà successivamente, è il metabolita secondario principale della droga.

Entrambe le frazioni apolari non hanno mostrato attività antiossidante che invece è evidente nelle frazioni polari nelle bande gialle su sfondo porpora. Tale decolorazione è dovuta a molecole come i flavonoidi, visibili come macchie gialle, arancio o verdi nelle frazioni polari osservate a 366 nm dopo derivatizzazione con NP/PEG, e a derivati di acidi cinnamici o cumarine evidenti come macchie azzurro-blu.

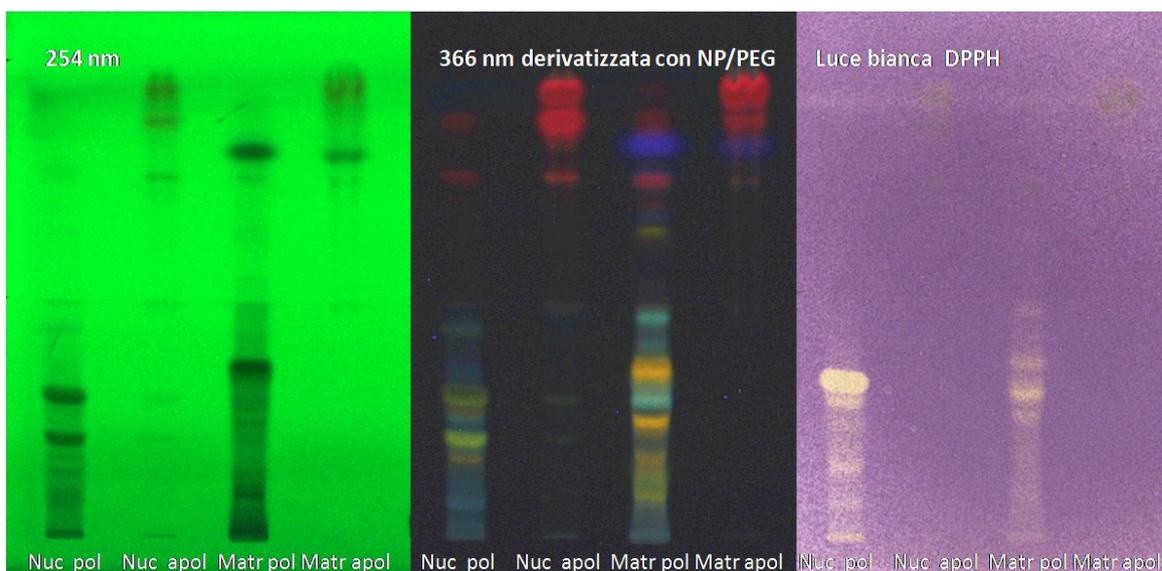


Legenda: Amm pol=Ammodaucus frazione polare in etanolo/acqua; Amm apol= Ammodaucus frazione apolare in esano; Anv pol= Anvillea frazione polare in etanolo/acqua; Anvillea apol= Anvillea frazione apolare in esano

Figura 35. Screening in HPTLC di fenoli e attività antiradicalica (DPPH) per *A.leucotrichus* (frutti) e *A. garcinii* subsp. *radiata* (foglie)

La lastra di **figura 36** mostra che le frazioni apolari delle due droghe *N. perrinii* (foglie) e *M. pubescens* (parti aeree) erano per lo più costituite da clorofille (bande rosse a 366 nm).

Entrambe le frazioni apolari non hanno mostrato attività antiossidante che invece è evidente nelle frazioni polari nelle bande gialle su sfondo porpora. Anche in tal caso l'attività può essere attribuita a flavonoidi e a derivati di acidi cinnamici o cumarine.

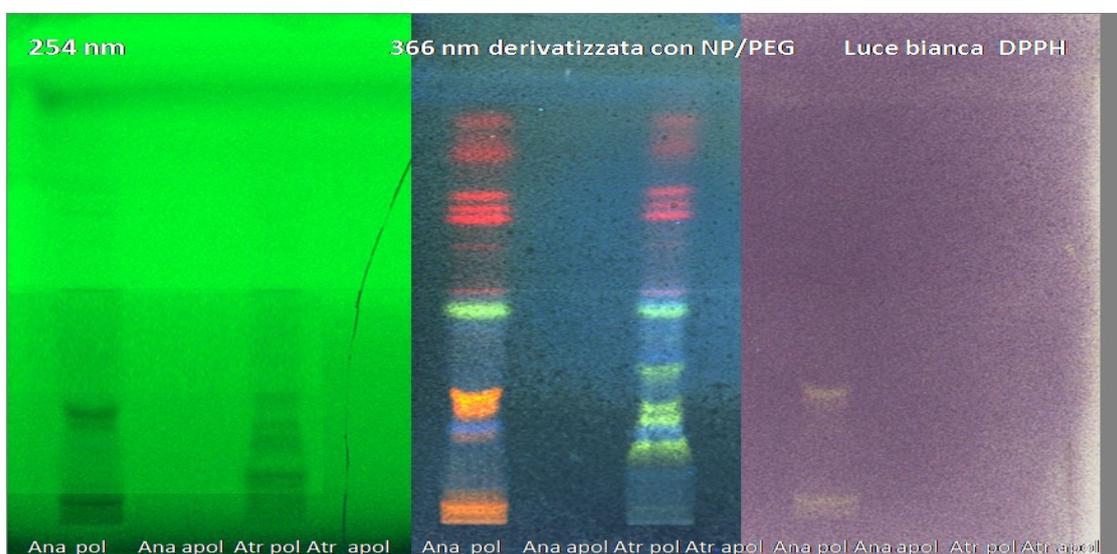


Legenda: Nuc pol= Nucularia frazione polare in etanolo/acqua; Nuc apol= Nucularia frazione apolare in esano; Matr pol= Matricaria frazione polare in etanolo/acqua; Matr apol= Matricaria frazione apolare in esano

Figura 36. Screening in HPTLC di fenoli e attività antiradicalica (DPPH) di *N. perrinii* (foglie) e di *M. pubescens* (parti aeree)

La lastra di **figura 37** mostra che nelle frazioni apolari delle due droghe *A. hierochuntica* (parti aeree) e *A. halimus* (foglie) non si evidenziano molecole in queste condizioni operative.

Entrambe le frazioni polari non hanno mostrato attività antiossidante che invece è solo minima nella frazione polare di *A. hierochuntica*.

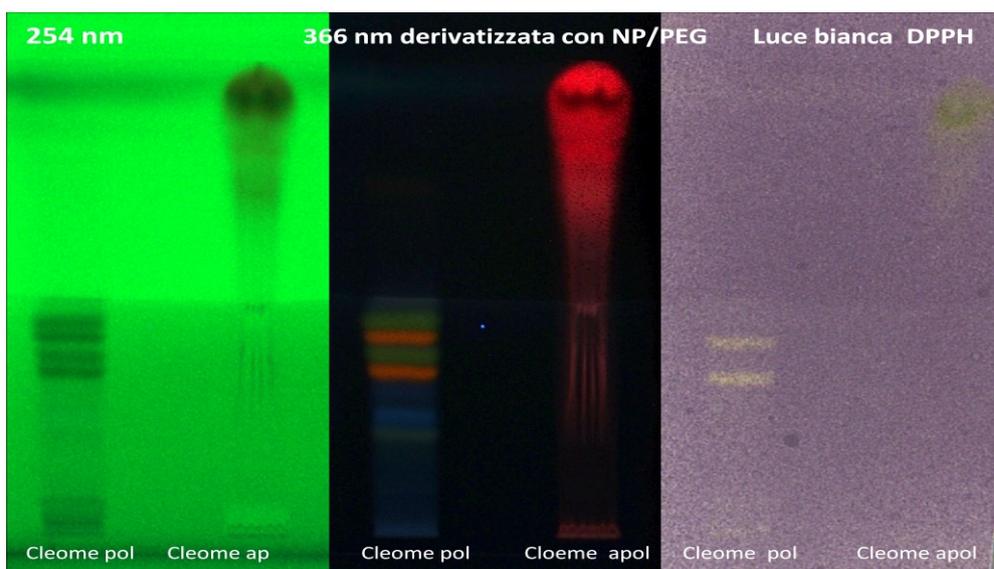


Legenda: Ana pol= Anastatica frazione polare in etanolo/acqua; Ana apol= Anastatica frazione apolare in esano; Atr pol= Atriplex frazione polare in etanolo/acqua; Atr apol= Atriplex frazione apolare in esano

Figura 37. Screening in HPTLC di fenoli e attività antiradicalica (DPPH) di *A. hierochuntica* (parti aeree) e *A. halimus* (foglie)

La lastra di **figura 38** mostra che la frazione polare di *C. amblyocarpa* (parti aeree), era per lo più costituita da clorofille (bande rosse a 366 nm); inoltre era presente una macchia

scura a 254 nm, che dovrà essere indagata con altri approcci analitici per comprenderne la struttura. Solo la frazione apolare ha mostrato una lieve attività antiradicalica.



Legenda: Cleome pol= Cleome frazione polare in etanolo/acqua; Cleome apol= Cleome frazione apolare in esano

Figura 38. Screening in HPTLC di fenoli e attività antiradicalica (DPPH) di *C. amblyocarpa* (parti aeree)

Determinazione quantitativa di polifenoli e attività antiradicalica (DPPH)

Per via spettrofotometrica mediante il saggio di Folin-Ciocalteu è stato calcolato il contenuto di polifenoli totali negli estratti secchi ricavati dalla frazione polare. L'estratto più ricco di polifenoli è risultato essere *N. perrinii* (**Figura 39**).

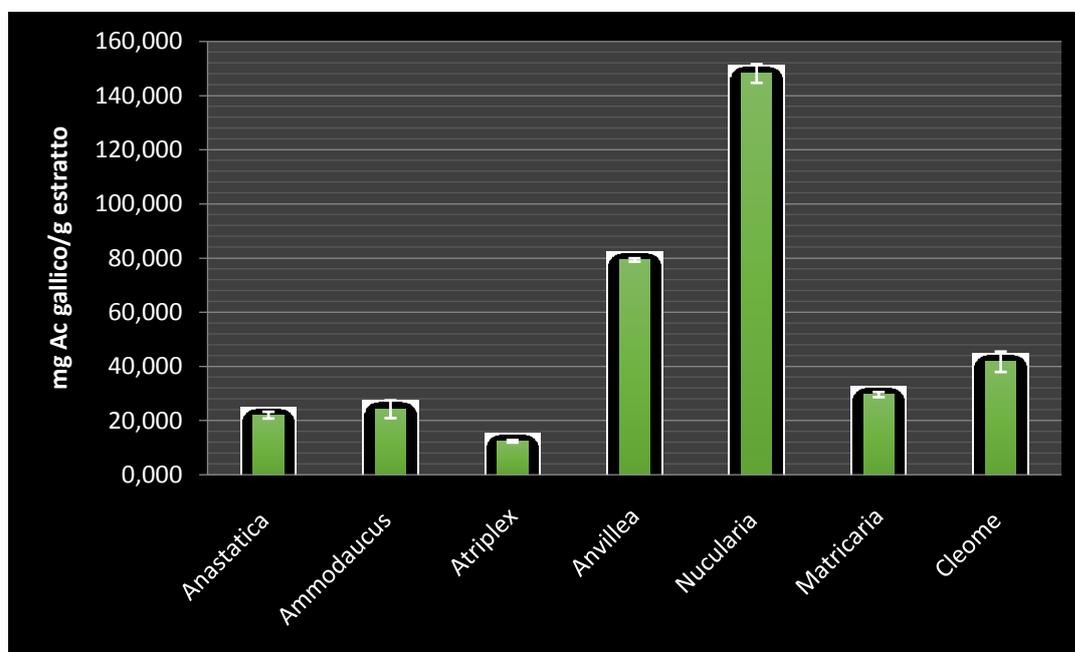


Figura 39. Istogramma relativo ai polifenoli contenuti negli estratti polari delle droghe

Per quanto riguarda l'attività antiradicalica *N. perrinii* si conferma essere la droga con maggior attività antiossidante, sebbene di moderato interesse se confrontata con Trolox,

assunto come controllo positivo. Va comunque rilevato che esiste una buona correlazione tra contenuto di polifenoli e attività antiradicalica per tutte le droghe (**Figura 40**).

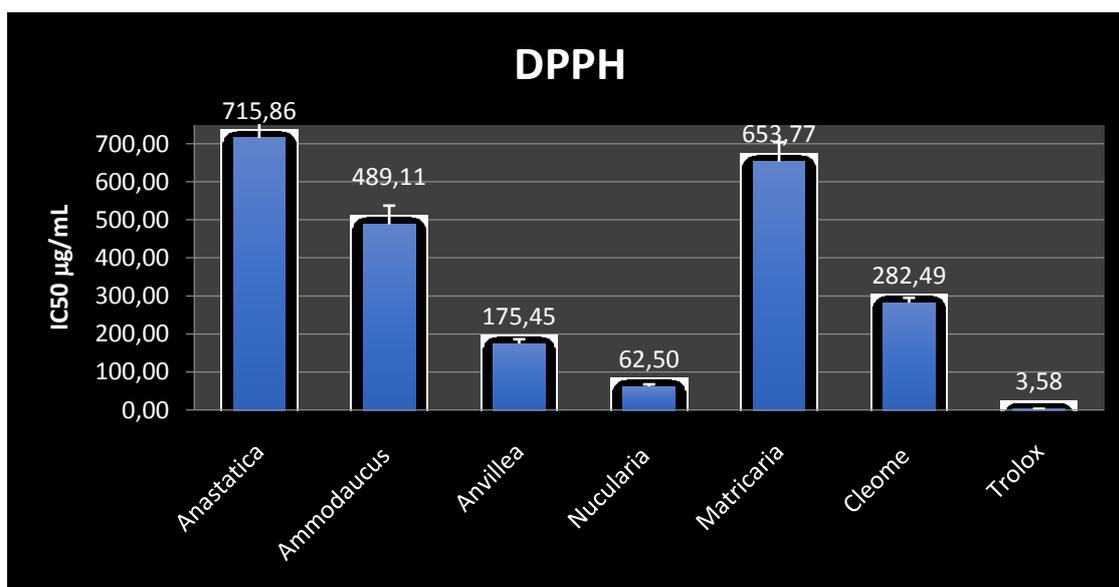


Figura 40. Istogramma relativo all'attività antiradicalica (espressa come IC₅₀) negli estratti polari delle droghe

3.4 Approfondimento su *A. leucotrichus*

Resa degli estratti

Gli estratti decotto ed etanolicco hanno fornito una resa in sostanza secca pari a $14.69 \pm 0.32\%$ e $17.84 \pm 0.53\%$. L'olio essenziale, ottenuto per idrodistillazione ha restituito una resa di 38.8 ± 0.4 mL/Kg (3.80% p/v), maggiore di quanto ottenuto da Abu Zarga *et al.* (2013) con un valore del 3.0% (p/v%), Velasco-Negueruela *et al.* (2006) 2.76% (p/v%), Halla *et al.* (2018) 2.58% (v/v%), Dahmane *et al.* (2016) 2.0% e 2.1% (v/v), El-Haci *et al.* (2014) 1.6% (p/p%), Gherraf *et al.* (2017) 0.7% (p/p%).

3.4.1 Metaboliti secondari di *A. leucotrichus*

Estrazione ed isolamento dell'ammolattone

L'obiettivo era di isolare l'ammolattone, un guaianolide appartenente ad una classe di sesquiterpeni lattonici che presenta caratteristiche moderatamente polari, già descritto in letteratura, ma le cui possibili attività biologiche ad oggi non sono ancora state studiate. Dalle lastre TLC è stato riscontrato che la miscela in grado di separare meglio i componenti dell'estratto etereo era costituita da esano:acetato in rapporto 80:20.

L'estratto etereo concentrato è stato analizzato attraverso spettroscopia ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃). Dallo spettro del protone è stata confermata la presenza di perillaldeide, un

componente dell'olio essenziale, i cui segnali tipici cadono a 4.8 ppm (protoni del doppio legame presente nel sostituente in para all'aldeide), 6.8 ppm (protoni del doppio legame in α all'aldeide) e 9.4 ppm (protone dell'aldeide) (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich). Sono apparsi evidenti anche trigliceridi, i cui segnali di riferimento cadono a 4.2 ppm e 5.2 ppm (Vlahov, 1999). E' stata inoltre osservata la presenza di tre segnali che potrebbero coincidere con quelli di ammolattone, come riportato da Muckensturm *et al.* (1997). I segnali sono: protone in α al lattone, in posizione 6, a 4.56 ppm; protone del doppio legame, in posizione 3 a 5.51 ppm; protone in posizione 7, a 3.04 ppm.

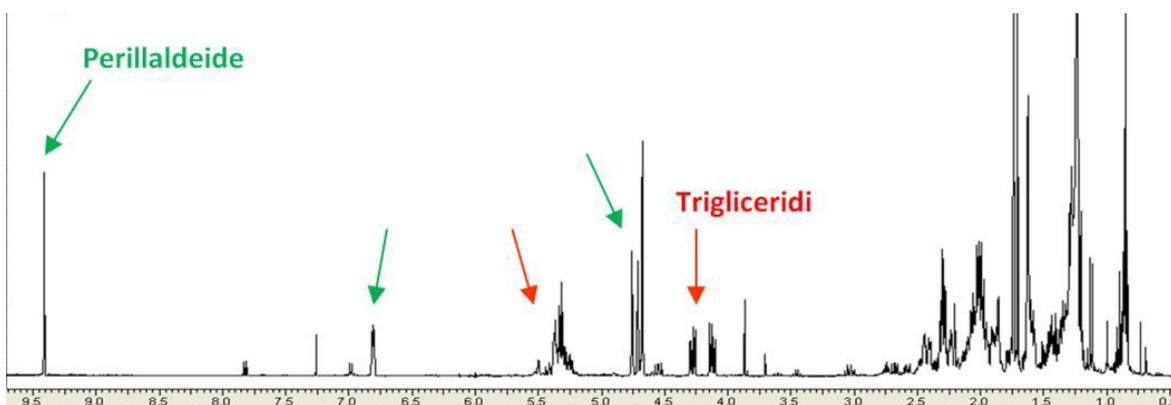


Figura 41. Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'estratto etero; segnali di perillaldeide e di trigliceridi

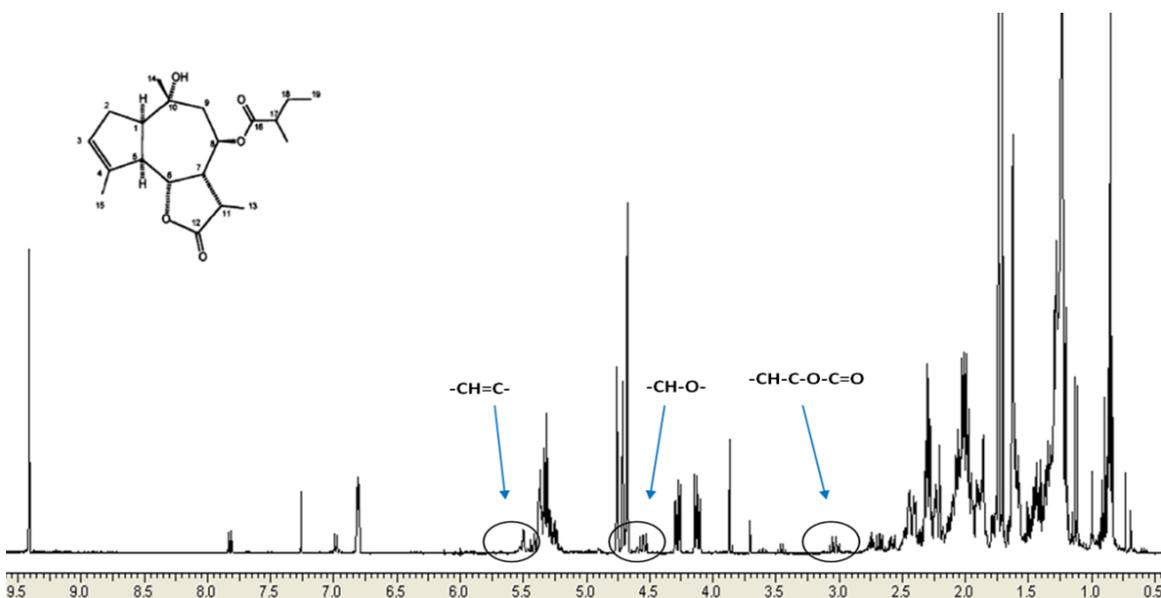


Figura42. Spettro $^1\text{H-NMR}$ dell'estratto etero; segnali dell'ammolattone

L'isolamento di ammolattone è stato effettuato con flash cromatografia su gel di silice; sono state separate due frazioni pure principali; la cui purezza è stata valutata mediante TLC e GC-MS.

L'identificazione della prima frazione è avvenuta confrontando lo spettro di massa con i dati presenti nella libreria NIST e con i dati presenti in letteratura: è risultato che il composto isolato corrisponde a perillaldeide, un monoterpene contenente un gruppo aldeidico (KI: 1272; picco base: 79 m/z) (Adams, 2007).

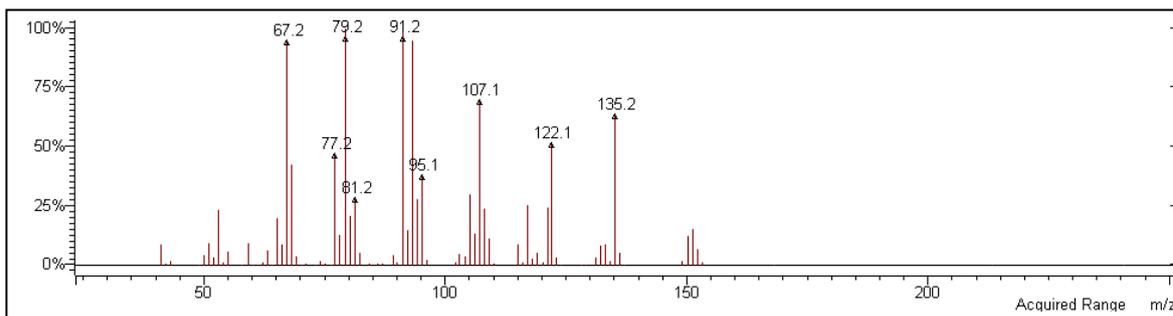


Figura 43. Spettro MS di perillaldeide.

La seconda frazione pura analizzata al GC-MS presentava una frammentazione che corrisponde a quella riportata in letteratura (Muckensturm et al., 1997).

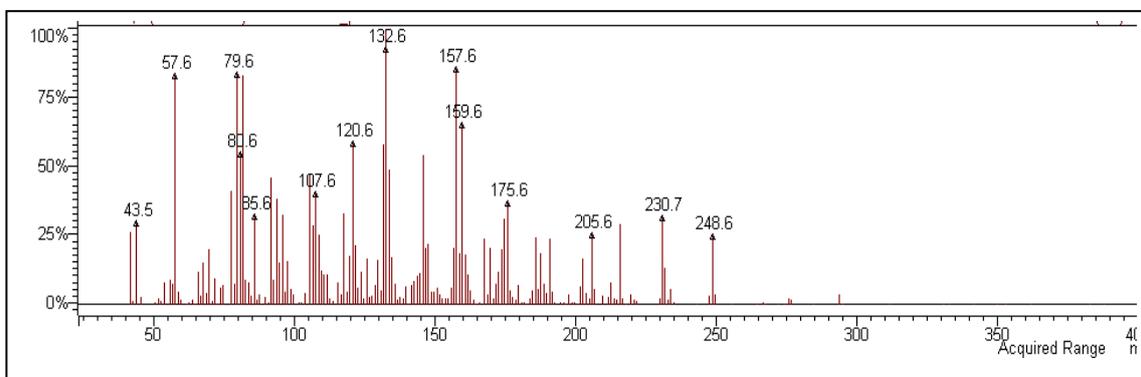


Figura 44. Spettro GC-MS di ammolattone

La frazione isolata è stata ulteriormente purificata attraverso cristallizzazione in cicloesano. Sono stati 72 mg di cristalli bianchi puri di ammolattone a forma di ago.

La struttura chimica di ammolattone è stata attribuita attraverso esperimenti $^1\text{D-NMR}$ (^1H , ^{13}C , DEPT; 300 MHz) usando come solvente cloroformio deuterato. L'analisi degli spettri e la delucidazione della struttura è stata facilitata dal confronto con i dati degli spettri $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ presenti in letteratura (Muckensturm et al., 1997). Lo spettro $^{13}\text{C-NMR}$, descritto in maniera non esaustiva in letteratura, è stato interpretato con l'aiuto dell'esperimento DEPT.

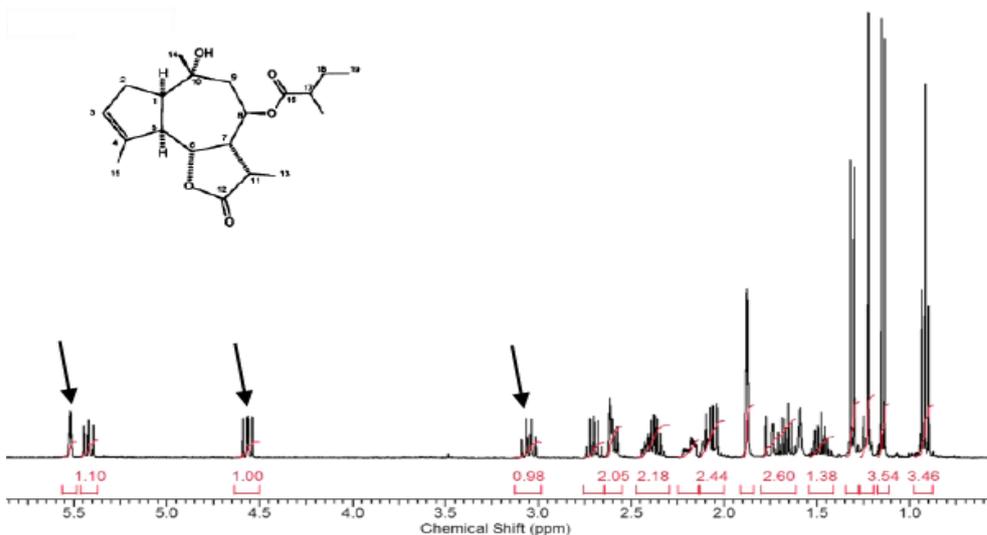


Figura 45. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di ammolattone

I segnali dello spettro $^1\text{H-NMR}$ maggiormente diagnostici per la molecola vengono confermati e sono: protoni in α al lattone, in posizione 6, a 4.56 ppm; protoni del doppio legame, in posizione 3 a 5.51 ppm; protoni in posizione 7, a 3.04 ppm, deschermato dalla presenza del gruppo estereo.

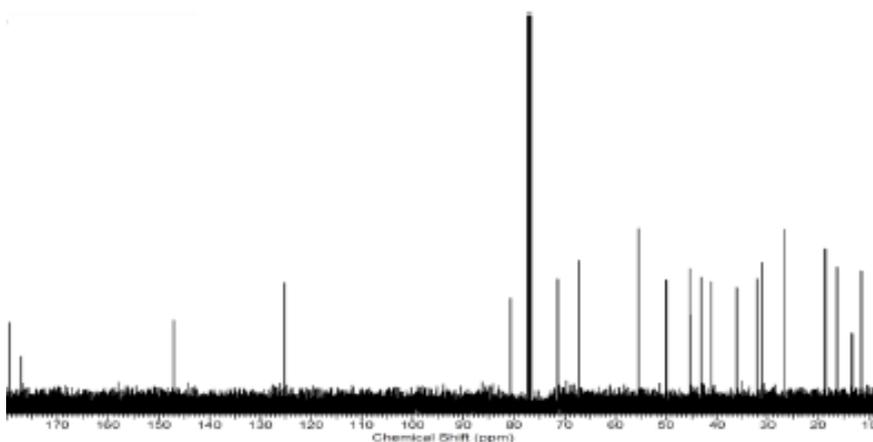


Figura 46. Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ di ammolattone

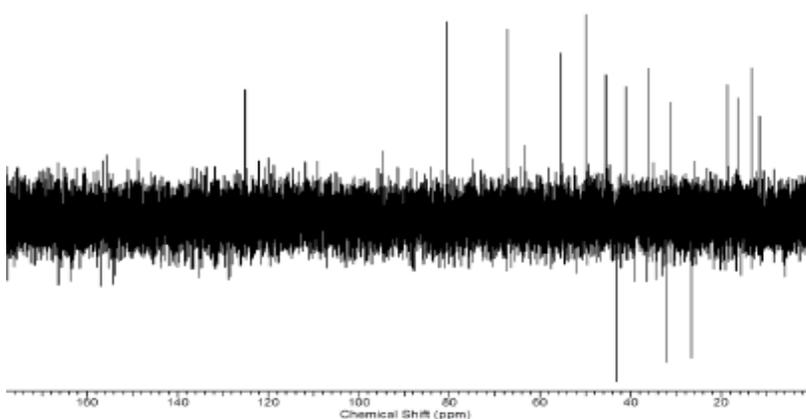


Figura 47. Spettro DEPT NMR Ammolattone

Gli spettri bidimensionali hanno invece permesso le attribuzioni riportate di seguito.

8-(2-Metilbutano il-)-10-idrossi-3-guaien-12,6-olide. White crystals.

^1H _NMR (400MHz, CDCl_3): 5.52 (1H, m, H-3), 5.42 (1H, td, $J = 10,8\text{Hz}$; $J = 10,0\text{Hz}$, H-8), 4.56 (1H, dd, $J = 11,6\text{Hz}$, $J = 9,2\text{Hz}$, H-6), 2.70 (1H, m, H-5), 2.58 (1H, m, H-11), 2.41 (1H, m, H-1), 2.38 (1H, m, H-7), 2.18 (1H, dd, $J = 15,6\text{Hz}$, $J = 1,6\text{Hz}$, H-2'), 2.09 (1H, m, H-2), 2.09 (1H, dd, $J = 14,8\text{Hz}$, $J = 9,6\text{Hz}$, H-9), 1.87 (3H, m, CH_3 C-4), 1.75 (1H, dd, $J = 14,8\text{Hz}$, $J = 1,2\text{Hz}$, H-9'), 1.68 (1H, dd, $J = 7,6\text{Hz}$, $J = 6,4\text{Hz}$, H-18'), 1.48 (1H, m, H-18), 1.31 (3H, d, $J = 8,0\text{Hz}$, CH_3 C-13), 1.22 (3H, s, CH_3 C10), 1.14 (3H, d, $J = 7,2\text{Hz}$, CH_3 C-17), 0.92 (3H, t, $J = 7,6\text{Hz}$, CH_3 C-18).

^{13}C _NMR (400MHz, CDCl_3): 179.4 (C12), 177.4 (C16), 147.2 (C4), 125.4 (C3), 80.8 (C6), 71.6 (C10), 67.3 (C8), 55.7 (C17), 50.2 (C5), 45.6 (C7), 43.3 (C9), 41.3 (C1), 36.3 (C11), 32.4 (C2), 31.3 (C14), 26.8 (C18), 18.9 (C15), 16.6 (C20), 13.6 (C13), 11.8 (C19).

Analisi dei componenti della droga mediante GC-MS

L'olio essenziale ottenuto tramite idrodistillazione è stato caratterizzato qualitativamente mediante GC-MS e quantitativamente mediante GC-FID.

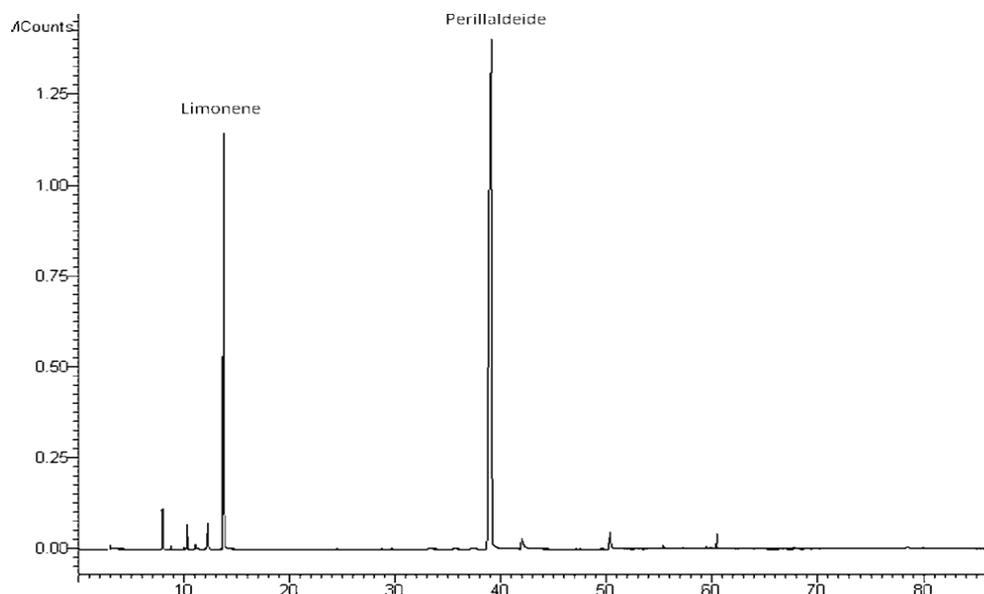


Figura 48. Gas cromatogramma dell'olio essenziale di *A. leucotrichus*

Per la determinazione qualitativa, gli spettri di massa e gli indici di Kovats ottenuti sono stati comparati con quelli della libreria NIST e con i dati presenti in letteratura; per la determinazione quantitativa, le concentrazioni dei singoli costituenti sono state espresse come area percentuale relativa.

Composto	Area%	KI
α -pinene	1.28 \pm 0.02	928
Canfene	0.09 \pm 0.01	943
β -pinene	0.90 \pm 0.04	972
mircene	0.21 \pm 0.02	986
3-carene	1.15 \pm 0.01	1005
limonene	19.90 \pm 1.86	1024
perillaldeide	74.01 \pm 1.75	1272
perillalcol	1.01 \pm 0.11	1296
metilperillato	0.91 \pm 0.02	1395
δ -amorfene	0.10 \pm 0.02	1514
non identificato	0.09 \pm 0.01	1658
non identificato	0.35 \pm 0.05	1696
Picchi totali identificati	99.57	

Tabella 12. Composizione qualitativa e quantitativa dell'olio essenziale di *A. leucotrichus*

Dall'analisi dell'olio essenziale di *A. leucotrichus* si è potuto evidenziare il seguente profilo fitochimico: i composti identificati appartengono principalmente alla classe dei monoterpeni ossigenati, tra cui la perillaldeide come componente maggioritario (74.01%), seguiti da monoterpeni idrocarburici, con limonene come composto principale (19.90%).

Dal confronto con la caratterizzazione dell'olio essenziale di *A. leucotrichus* presente in diversi articoli scientifici, è emerso che i risultati ottenuti con le nostre analisi sono molto simili a quelli della letteratura sotto il profilo qualitativo, ma dal punto di vista quantitativo ci sono notevoli differenze, probabilmente dovute al diverso periodo di raccolta delle piante, alla latitudine, al clima e al tipo di terreno. Le aree percentuali relative ottenute per limonene e perillaldeide sono state paragonate con quelle presenti negli articoli esaminati e i dati sono stati riassunti della tabella che segue:

Composti	OE <i>A.leucotrichus</i>	A	B	C	D	E
limonene %	19.90	28.82	1.71	26.8	8.2	7.8
perillaldeide %	74.01	56.4	84.43	63.6	87.9	85.6

A = (Gherraf et al., 2017); B = (Abu Zarga et al., 2013); C = (Velasco-Negueruela et al., 2006); D = (El-Haci et al., 2014); E = (Halla et al., 2018)

Tabella 13. Confronto della composizione di OE (olio essenziale) di *A. leucotrichus* con articoli scientifici.

Il contenuto di perillaldeide in *A. leucotrichus* si è rivelato elevato ma più basso che gli studi di Abu Zarga *et al.* (2013), El-Haci *et al.* (2014), Halla *et al.* (2018). Il contenuto di limonene invece è risultato moderato, inferiore a quello ottenuto da Gherraf *et al.* (2017) e

Velasco-Negueruela *et al.* (2006), ma circa otto volte superiore a quello dello studio di Abu Zarga *et al.* (2013).

La frazione insaponificabile di *A. leucotrichus* è stata studiata anch'essa mediante GC-MS. L'identificazione degli steroli nei cromatogrammi è stata determinata mediante il confronto con gli spettri della libreria NIST e con standard puri, il contenuto in percentuale dei composti individuati è stato riassunto nella tabella che segue:

Steroli	Retention time (min)	% in <i>A. leucotrichus</i> frutti
colesterolo	13.28	2.05±0.03
campesterolo	14.00	6.76±0.32
stigmasterolo	14.76	28.04±1.04
β -sitosterolo	15.45	41.10±1.66
β -amirina	15.78	14.83±0.72
Δ -7-sitosterolo	16.17	3.66±0.06
Δ -7-avenasterolo	16.33	3.56±0.04

Tabella 14. Analisi della composizione in steroli di *A. leucotrichus*

I dati ottenuti rivelano β -sitosterolo al 41.10% e stigmasterolo al 28.04%. Altro composto presente in buona percentuale è il campesterolo (6.76%).

L'interesse nutrizionale per queste tre sostanze deriva principalmente dal fatto che i fitosteroli hanno una struttura simile al colesterolo e hanno la capacità di abbassarne i livelli nel plasma. Dal momento che la mortalità da malattie cardiovascolari è stata drammaticamente ridotta usando farmaci che abbassano i livelli di colesterolo (statine), aumenta l'interesse per gli steroli vegetali e per le piante che ne sono ricche (come *A. leucotrichus*), in qualità di potenziali prodotti dietetici naturali di prevenzione (Piironen *et al.*, 2000).

Un altro componente della frazione insaponificabile presente in percentuale considerevole, è la β -amirina (14.83%). Dallo studio di Maiyo *et al.* (2016) è emerso che questo fitosterolo possiede un'attività antiapoptotica e citotossica nei confronti di linee cellulari tumorali epatiche e del colon-retto, dati preliminari di interesse per lo studio di un potenziale antitumorale.

Quantificazione dei componenti di ammolattone e nel decotto e nell'estratto etanolic

Dall'analisi TLC dell'estratto etanolic dei frutti di *A. leucotrichus* è stata osservata la presenza di due macchie predominanti, corrispondenti ad ammolattone, con fattore di

ritenzione intermedio, e perillaldeide, con fattore di ritenzione più alto per il carattere maggiormente apolare. Per confermare questa ipotesi, l'estratto etanolico è stato caratterizzato avvalendosi dell'uso di RP-HPLC-DAD. Successivamente è stata ricercata la presenza di questi due composti anche nel decotto.

Per mezzo di curve di taratura costruite con gli standard isolati, per validare le procedure analitiche, sono stati calcolati sia per ammolattone che per perillaldeide il limite di rivelabilità e il limite di quantificazione, sfruttando il metodo che si basa sul rapporto segnale/rumore previsto dalle linee guida dell'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA, 1995). Per entrambi i composti, i cromatogrammi sono stati osservati alla massima assorbanza, in un range di variazione di lunghezza d'onda compreso tra 195 e 599 nm.

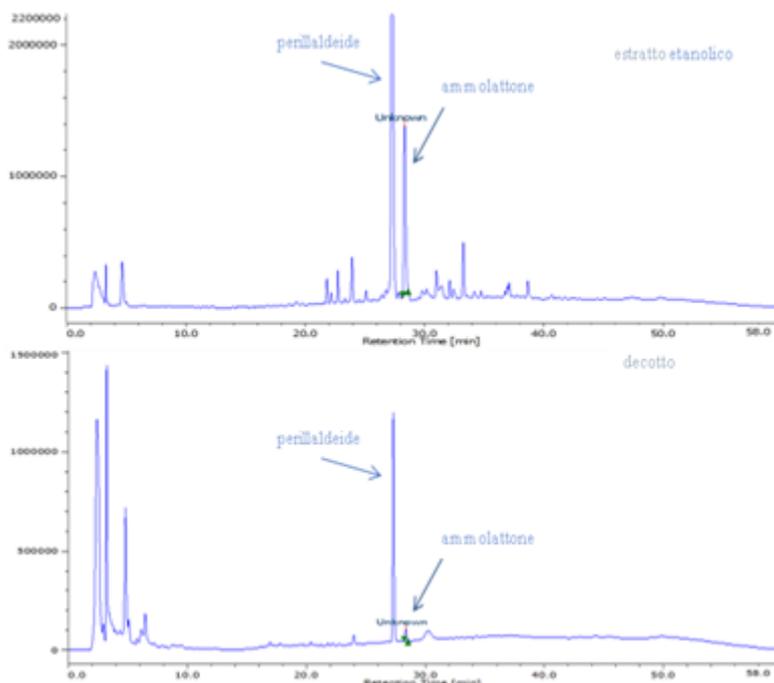


Figura 49. Cromatogrammi osservati alla massima assorbanza di estratto etanolico e decotto

È stato confermato che sia nell'estratto etanolico che nel decotto di *A. leucotrichus* sono presenti perillaldeide e ammolattone.

Per la quantificazione di perillaldeide la retta ottenuta è $y = 85596111x - 293470$ con coefficiente di correlazione lineare $R^2 = 0.994$.

Basandosi sul metodo rapporto segnale/rumore, il limite di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono risultati essere: $LOD = 0.0020$ mg/mL e $LOQ = 0.0066$ mg/mL.

Per ammolattone la curva la retta ottenuta è $y = 15807080x + 139679$ con indice di correlazione lineare $R^2 = 0,999$. Basandosi sul metodo rapporto segnale/rumore, il limite di

rivelabilità e di quantificazione sono risultati essere: LOD = 0.0025 mg/mL, LOQ = 0.0075 mg/mL.

Grazie alla costruzione delle curve di taratura, si è potuto quantificare le due molecole nelle due diverse preparazioni ed i dati ottenuti sono stati riassunti nella seguente tabella:

	Decotto		Estratto etanologico	
	mg/g e.secco	g/100g droga	mg/g e.secco	g/100g droga
ammolattone	3.32 ± 0.22	0.049 ± 0.003	111.62 ± 1.86	1.99 ± 0.032
perillaldeide	35.88 ± 0.60	0.53 ± 0.01	221.36 ± 0.27	3.95 ± 0.005

Tabella 15. Quantificazione di perillaldeide e ammolattone negli estratti

Tutti i risultati apparivano al di sopra del rispettivo limite di rivelabilità e quantificazione. I dati ottenuti hanno dimostrato che l'estratto etanologico rivela un maggior quantitativo sia di ammolattone che di perillaldeide.

Va sottolineato che in letteratura non sono presenti riferimenti, in quanto le due molecole indagate non sono ancora state identificate in questi due tipi di preparazioni. L'identificazione di altre sostanze che costituiscono l'estratto etanologico ed il decotto di *A. leucotrichus* sarà oggetto di ulteriori approfondimenti.

3.4.2 Attività biologica di *A. leucotrichus*

Valutazione dell'attività antimicrobica

L'attività antimicrobica è stata saggiata sulle preparazioni estratto etanologico, decotto, olio essenziali di *A. leucotrichus* e su due molecole pure isolate (perillaldeide e ammolattone) mediante l'utilizzo del test del microplate. Il test è stato effettuato nei confronti di cinque patogeni, scelti tra i più diffusi per l'uomo, che spesso sviluppano resistenze ai farmaci per la cura.

L'attività è stata valutata determinando la minima concentrazione inibente (MIC) e considerando la scala di reattività proposta per gli oli essenziali da Baser e Buchbauer nel 2010: MIC > 20000 µg/mL = inattività; 5000 < MIC < 20000 µg/mL = debole attività; 500 < MIC < 5000 µg/mL = moderata attività; MIC < 500 µg/mL = forte attività. Per le molecole pure si è considerato che un valore di MIC > 500 µg/mL non fosse degno di nota. I risultati del test hanno dimostrato una moderata attività di tutti i campioni testati contro i patogeni *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, per i quali non è stata calcolata la MIC. I dati maggiormente degni di nota sono stati quelli ottenuti per *S. aureus* e *C. albicans*, riassunti nella tabella che segue:

Campione	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>
olio essenziale	1000	2000	>2000	>2000	>2000
decocto	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
estratto	> 2000	2000	>2000	>2000	>2000
perillaldeide	> 2000	> 2000	>2000	> 2000	> 2000
ammolattone	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
C+	10	5	5	100	2.5

Tabella 16. Attività antimicrobica; C+: controllo positivo, cloramfenicolo per *S. aureus*, fluconazolo per *C. albicans*.

I migliori risultati sono stati ottenuti per l'olio essenziale di *A. leucotrichus* nei confronti di *S. aureus* con MIC pari a 1000 $\mu\text{g/mL}$, mentre ha dimostrato una più moderata attività verso *C. albicans* con MIC pari a 2000 $\mu\text{g/mL}$.

Attività antifungina con metodo dell'agar vapour assay

L'olio essenziale è stato saggiato su 3 funghi fitopatogeni e 2 dermatofiti ad una concentrazione del 50% in DMSO. La componente volatile dell'olio essenziale di *A. leucotrichus* ha inibito la totale crescita dei funghi (**Figura 50**).

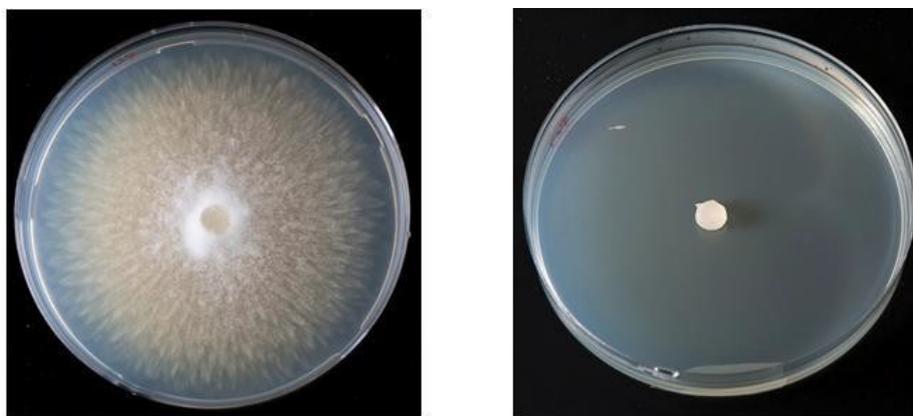


Figura 50. A sinistra crescita del fungo con solo DMSO, a destra inibizione totale con olio essenziale di *A. leucotrichus*

I risultati in tabella mostrano una percentuale di inibizione di crescita del 100%, quasi per tutti e cinque i funghi da parte dell'olio essenziale.

% di inibizione della crescita		
Patogeni	Olio essenziale di <i>A.leucotrichus</i>	DMSO
<i>Botrytis cinerea</i>	100	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	93.9	0
<i>Pythium ultimum</i>	100	0
<i>Nannizia gypsea</i>	100	0
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	100	0

Tabella 17. Valori di percentuale di inibizione di crescita dei fitopatogeni e dei dermatofiti in presenza dell'olio essenziale di *A. leucotrichus*

Si è proceduto se l'azione potesse essere fungicida o fungo statica, reimpiantando l'inoculo in terreno fresco in assenza di olio essenziale per osservare un'eventuale ripresa di crescita o meno.

L'attività è di tipo fungostatica verso i tre fitopatogeni, poiché il fungo è cresciuto sul terreno fresco (**Figura 51**), mentre fungicida verso i due dermatofiti poiché non si osserva crescita in terreno nuovo.

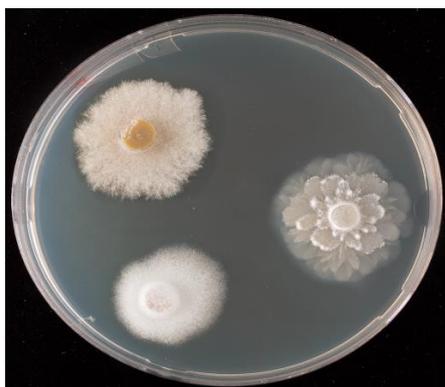


Figura 51. Reimpianto dell'inoculo dei tre fitopatogeni in terreno fresco in assenza di olio essenziale.

Si è proceduto infine alla determinazione dell' EC_{50} (concentrazione in grado di inibire del 50% la crescita del fungo), ripetendo l'agar vapour test più volte con diverse concentrazioni scalari di olio essenziale in un range compreso tra il 50% e l'1.25% (**Figura 52**) e al calcolo della MFC (minima concentrazione fungicida).



Figura 52. Inoculi di *F. oxysporum* in presenza di vapori a concentrazioni scalari dell'olio essenziale di *A. leucotrichus*. Si nota come all'aumentare della concentrazione di olio essenziale si ha l'aumento di inibizione della crescita del fungo.

	Fitopatogeni			Dermatofiti	
	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>N. gypsea</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
EC₅₀ µg/mL	262.6±4.0	271.8±1.3	345.1±9.0	25.1±2.15	16.1±2.1
MIC µg/mL	500	500	500	25	25
MFC µg/mL	>500	>500	>500	25	25

MIC>20000 µg/ml = inattivo; 5000< MIC < 20000 µg/ml =debole attività; 500< MIC < 5000 µg/ml = moderata attività; MIC < 500 µg/ml = forte attività (Baser, Buchbauer, 2010).

Tab.18 Valori di EC₅₀ dell'olio essenziale di *A. leucotrichus* verso i funghi.

I risultati ottenuti, riportati in **Tabella 18**, mostrano l'alta attività inibitoria dell'olio essenziale di *A. leucotrichus* verso la crescita dei dermatofiti e una moderata attività nei confronti dei fitopatogeni.

Inoltre le MIC e le MFC risultano coincidere, per quanto riguarda i dermatofiti perché alla concentrazione di 25 mg/ml l'olio essenziale è in grado di uccidere i dermatofiti mentre, avendo mostrato un'attività fungostatica nei confronti dei tre fitopatogeni, le MFC risultano superiori alle MIC.

È nota in letteratura l'attività fungicida di perillaldeide (Tian et al., 2015).

Valutazione dell'attività antinfiammatoria

L'attività antinfiammatoria è stata valutata per mezzo del test di inibizione della 5-lipossigenasi.

Il test è stato effettuato sull'olio essenziale, sull'estratto etanolic, sul decotto e su perillaldeide ed ammolattone, con lo scopo di fornire un preliminare riscontro scientifico all'uso tradizionale di *A. leucotrichus* come rimedio in caso di febbre e disturbi delle vie

aeree superiori. Gli esiti del test sono stati interpretati mediante il confronto con i parametri suggeriti da Baylac (Baylac & Racine, 2003).

I campioni che hanno dimostrato una debole attività sono stati: l'estratto etanolicò con IC₅₀ pari a 80.94 ± 23.8 µg/mL e l'olio essenziale con IC₅₀ di 51.99 ± 5.7 µg/mL. Il miglior risultato si è ottenuto con la perillaldeide, che ha mostrato una discreta attività antinfiammatoria con IC₅₀ pari a 14.82 µg/mL. Probabilmente la debole attività dell'estratto e dell'olio è proprio da attribuirsi alla perillaldeide, componente principale dell'olio essenziale e presente in elevate quantità anche nell'estratto etanolicò.

	IC ₅₀ (µg/mL)	Dev. St.
OE Ammodaucus	51.99	5.7
decotto <i>A. leucotrichus</i>	> 100	0.0
estratto etanolicò <i>A. leucotrichus</i>	80.94	23.8
perillaldeide*	14.82	2.5
ammolattone	> 100	0.0

Parametri considerati: forte attività con IC₅₀ minore di 10 µg/mL; discreta con 10 µg/mL ≤ IC₅₀ ≤ 30 µg/mL; moderata con 31 µg/mL < IC₅₀ ≤ 50 µg/mL; debole con 51 µg/mL < IC₅₀ ≤ 100 µg/mL; inattività con IC₅₀ maggiore di 100 µg/mL (Baylac and Racine, 2003). Controllo positivo: acido nordiidroguaiaretico

Tabella 19. Riassunto risultati attività antinfiammatoria.

Anche l'attività citotossica di un olio essenziale ricco di perillaldeide verso le linee cellulari dell'adenocarcinoma umano del seno e della leucemia mieloblastica si è rivelata degna di nota (Sonboli et al., 2010). Gli esiti di questo studio hanno offerto uno spunto interessante per approfondire le ricerche e le indagini sull'attività biologica dell'olio essenziale di *A. leucotrichus*.

Attività della formulazione oleolita al 2%

La semplice formulazione di oleolita è stata testata per la sua attività antifungina contro uno dei dermatofiti utilizzati: *T. mentagrophytes*. L'olio essenziale testato alla concentrazione del 50% aveva dato proprietà fungicide al saggio dell'agar vapour assay: testando l'oleolita al 2% e il solo olio essenziale diluito al 2% si è ottenuta solo una debole inibizione pari a 8.98% e 9.38%, rispettivamente. La scelta di formulare il prodotto con il 2% di olio essenziale, deriva dal fatto che solitamente nei prodotti ad uso topico gli oli essenziali vengono aggiunti in quantità non superiori al 1-2%, per evitare problemi di irritazione cutanea.

La formulazione è stata poi sottoposta presso il Centro di Cosmetologia dell'università di Ferrara ad un test di attività antimicrobica su *S.aureus* e *C. albicans*, mediante il test di diffusione su agar, inibendo la crescita batterica del 90.8% e del 88.1%, rispettivamente, mentre l'olio essenziale la riduceva del 99.9% e del 99.4%. La formulazione è stata

definita mediamente sensibile verso candida e sensibile verso stafilococco, confermando i risultati moderati che erano stati ottenuti nei nostri laboratori.

È stato effettuato anche un test di attività antiossidante con il metodo strumentale della fotochemiluminescenza che non ha restituito risultati degni di nota, come peraltro già osservato nelle nostre indagini preliminari.

Infine il patch test ha resituito una sicurezza d'uso.

Attività su linee cellulari

Il laboratorio della prof.ssa Ilaria Lampronti dell'università di Ferrara ha studiato l'effetto antiproliferativo degli estratti e delle molecole pure su cellule eritroleucemiche K562. L'olio essenziale e l'estratto etanolic hanno dimostrato effetti antiproliferativi quasi sovrapponibili (IC_{50} : $6.76 \pm 1.37 \mu\text{g/mL}$ e $6.01 \pm 0.75 \mu\text{g/mL}$, rispettivamente), il decotto possiede IC_{50} simile ($10.72 \pm 1.70 \mu\text{g/ml}$); le due molecole pure, ammolattone e perillaldeide, hanno attività a livello micromolare ($26.86 \pm 14.14 \mu\text{M}$ e $42.05 \pm 7.13 \mu\text{M}$, rispettivamente): i risultati sono indice di attività moderata, in quanto le molecole più utilizzate a livello terapeutico esplicano attività a livello nanomolare. Gli estratti e le molecole non hanno mostrato invece capacità di indurre differenziamento eritroide, cioè di far produrre ai globuli rossi emoglobina, che nelle cellule tumorali K562 non viene prodotta.

Si è notato inoltre che l'effetto antiproliferativo sembra essere associato ad evidente capacità di indurre apoptosi quando le cellule K562 sono trattate con l'estratto etanolic (25-100 $\mu\text{g/ml}$) e con l'ammolattone (25-100 μM).

Per indagare la potenziale attività antinfiammatoria delle molecole principali contenute nella droga, sono state trattate sia con perillaldeide che con ammolattone cellule IB3-1 (cellule bronco-epiteliali fibrocistiche), in cui l'infiammazione è stata indotta attraverso infezione con *Pseudomonas aeruginosa* (ceppo PAO-1), il batterio che più frequentemente colpisce l'apparato bronco-polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica (CF). L'effetto delle singole molecole è stato valutato utilizzando la PCR quantitativa e valutando l'accumulo di RNA messaggero (mRNA) per interleuchina 8 (IL-8), citochina profinfiammatoria, che gioca un ruolo importante e noto nei processi di infiammazione nella fibrosi cistica (CF) (Lampronti et al., 2017). I risultati ottenuti hanno dimostrato che perillaldeide, anche su cellule fibrocistiche, ha evidenziato attività antinfiammatoria, in questo caso riducendo del 50% l'espressione di IL-8, marcatore dell'infiammazione. Anche ammolattone ha determinato una riduzione dell'effetto infiammatorio indotto da PAO-1, anche se in misura leggermente minore rispetto alla perillaldeide (**Figura 53**).

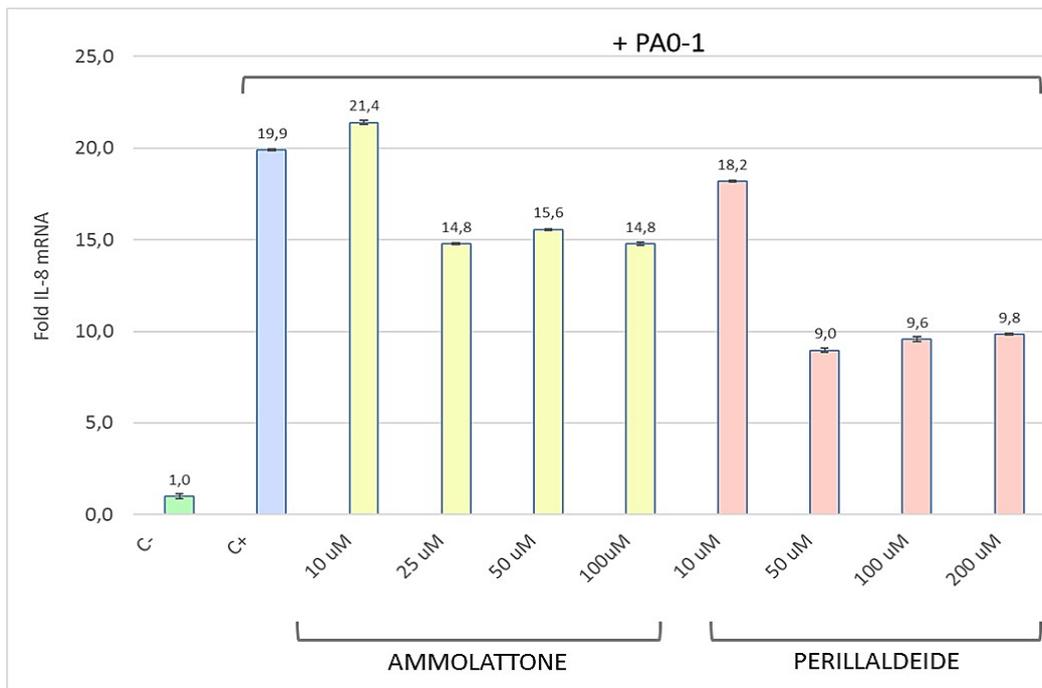


Figura 53: nell'istogramma in figura viene mostrato l'effetto delle molecole pure, ammolattone e perillaldeide, sui livelli del trascritto della chemochina pro-infiammatoria IL-8 delle cellule IB3-1 indotta dall'infezione con PAO-1. L'espressione del messaggero è riportata come fold rispetto alle cellule non trattate e non infettate (controllo negativo posto arbitrariamente uguale a 1) ottenuta tramite RT-PCR per ciascun campione.

Entrambe le molecole, perillaldeide e ammolattone, possono essere considerate, promettenti composti per controllare l'infiammazione nella malattia polmonare della fibrosi cistica. Questi aspetti comprovano l'utilizzo etnomedico della droga per il trattamento di infiammazioni alle vie aeree superiori, dovute ad infezioni (Abu Zarga et al., 2013).

Sebbene perillaldeide sia una molecola con promettenti proprietà salutistiche, va rilevato che nel 2015 EFSA (European Food Safety Authority) ha ritirato tale composto dalla lista degli aromatizzanti dell'Unione Europea, in quanto esiste un potenziale pericolo di genotossicità, più precisamente un pericolo nella sicurezza d'uso (EFSA, 2015).

A seguito di questo provvedimento, ancora vigente, la comunità scientifica è intervenuta con nuove pubblicazioni che sembrano negare questa tesi di tossicità. Va inoltre sottolineato che FDA (Food and Drug Administration) ha mantenuto perillaldeide nella lista degli aromatizzanti.

3.5 Approfondimenti su *A. tortilis* subsp. *raddiana*

3.5.1 Composizione e proprietà chimico-fisiche della gomma

Le gomme sono essudati naturali dal tronco, dai rami o dai frutti degli alberi a causa di scissione, lesioni (casuali o intenzionali) o infezioni fungine. Sono utilizzate in campo alimentare (Daoub et al., 2018) e farmaceutico e in molti altri settori (FAO, 1996). Le gomme sono polisaccaridi idrocolloidi (Williams & Phillips, 2001). Il tipo di gomma più utilizzato è Gomma arabica (GA) ottenuta dagli alberi di *Acacia senegal* var. *senegal*.

La gomma essudata di *A. tortilis* subsp. *raddiana* si presenta come un solido di colore da bianco a giallo-ambrato, che si rompe con una frattura vetrosa. In soluzione o mucillagine, essa è frequentemente usata in preparazioni medicinali per tosse, raffreddore, raucedine, faringite, irritazione e infiammazione gastrica, diarrea, dissenteria, tubercolosi polmonare, lenitivo alle ustioni e scottature della bocca e del canale alimentare, sollievo del dolore da ustioni. E' inoltre usata come vermifugo e possiede proprietà ipotensive e diuretiche. E' stato inoltre dimostrato in vitro che il polisaccaride dell'*Acacia tortilis* risulta un buon inibitore dell' α -D-glucosidasi (Bisht et al. 2013).

La gomma è un polisaccaride idrocolloide altamente ramificato costituito principalmente da L-arabinosio, D-galattosio, L-ramnosio e acidi uronici in particolare galatturonico e glucuronico.

L'ossatura è costituita da unità di galattosio unite mediante legami β -1,3- e 1,6-glicosidici. Su queste si innestano catene di arabinosio e acidi uronici come residui terminali (**Figura 54**).

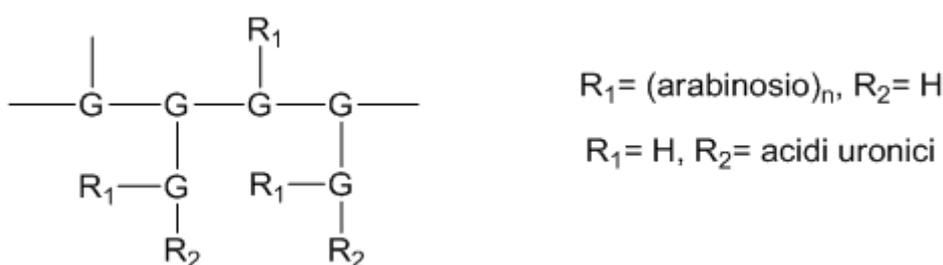


Figura 54. Catene di arabinosio e acidi uronici

Inoltre sono presenti polisaccaridi coniugati con proteine (proteine – arabinogalattani) (Gammon et al., 1986).

Per esempio la composizione in monosaccaridi riportata da Lakhera *et al.* (2016) per la gomma di *A. tortilis* ssp. *raddiana* risulta essere L-arabinosio (78%), D-galattosio (18%), D-glucosio (0.6%), L-ramnosio (1.71) e D-mannosio (0.7%). Gli acidi galatturonico e

glucoronico sono stati stimati entrambi attorno al 4%. Altri studi sulla composizione di essudati di varie sottospecie di *A. tortilis* sono stati compiuti da Anderson & Bell (1974).

La gomma, dopo purificazione, è stata caratterizzata mediante registrazione di spettri ^1H - e ^{13}C -NMR, IR, analisi termogravimetria e la determinazione di alcune proprietà fisiche e chimiche quali, pH, potere rotatorio specifico, azoto e contenuto di proteine, metalli, peso molecolare, rapporto arabinosio/galattosio, peso equivalente e acido uronico totale.

Proprietà fisico-chimiche

La gomma, insolubile nella maggior parte dei solventi organici, risultava invece molto solubile in acqua e poteva dare soluzioni fino al 50% p/v di concentrazione. Queste ultime presentavano una notevole viscosità.

Il contenuto di ceneri è una misura del residuo inorganico che rimane, generalmente ossidi metallici, dopo la rimozione della componente organica per termo-ossidazione (combustione). Il tipo di terreno influenza significativamente il contenuto di ceneri. Dall'analisi termogravimetrica si ottiene un contenuto di ceneri pari all'1.36%

L'analisi elementare ha fornito un contenuto di azoto dello 0.86% per la gomma purificata e dell'1.1% per quella grezza che corrispondeva ad un contenuto di proteine rispettivamente del 5.65 e 7.23 %. Di norma più alto è il contenuto di proteico di una gomma maggiore è la sua capacità emulsionante.

Il potere rotatorio specifica (α) è una proprietà dei composti chimici chirali che deriva dalla capacità di questi di ruotare il piano della luce polarizzata. Viene detto destrogiro il composto che ruotano il piano la luce in senso orario e il valore di α è indicato positivo, mentre viene detto levogiro se ruota la luce in senso antiorario e il valore di α è indicato negativo. Lakhera et al. (2016) per la gomma di *A. tortilis* subsp. *raddiana* hanno riportato un potere rotatorio specifico di $+70^\circ$, mentre Anderson et al. (1974) per gomme di diverse altre specie di *A. tortilis* riporta valori che vanno da $+74^\circ$ a $+97^\circ$. Valori simili sono stato riscontrati per il nostro campione: $+79.4^\circ$ per gomma purificata e $+73.5^\circ$ per quella grezza. La più nota gomma arabica da *A. senegal* risulta invece levogira con un potere rotatorio specifico variabile tra -25° e -35° (Williams & Phillips, 2001).

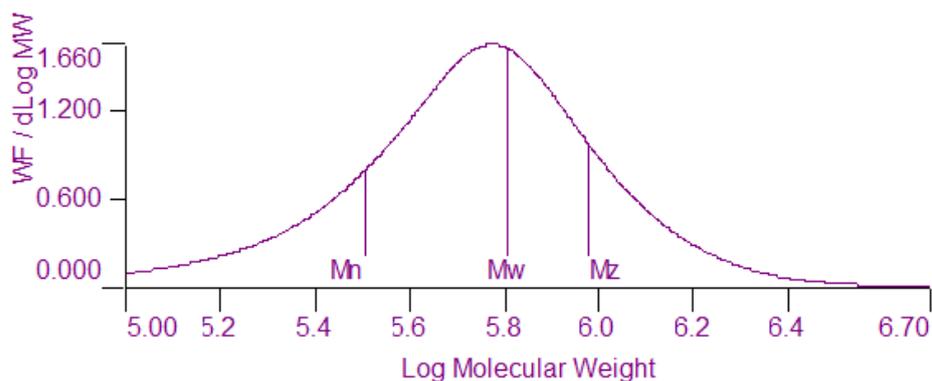
Il valore del pH è stato misurato per soluzioni acquose di gomma all'1% p/v; risultava essere di 5.01 per la gomma grezza e 5.20 per la purificata.

Lakhera et al. (2016) per la gomma di *A. tortilis* subsp. *raddiana* riportava un valore di pH di 5.02 mentre Daoub et al. (2018) riportavano un pH di 4.45.

Il peso molecolare

Il peso molecolare è stato valutato mediante cromatografia di permeazione di gel (GPC) con un apparecchio a triplo detector: indice di rifrazione, viscosimetro differenziale e light scattering.

La gomma presentava un peso molecolare medio ponderale (M_w) di circa 640.000 Daltons e un indice di polidispersione (M_w/M_n) di circa 2.



Data File: Gum1_tris		
Peak RV - (ml)	14.993	
Mn - (Daltons)	320.353	
Mw - (Daltons)	638.354	
Mz - (Daltons)	954.232	
Mp - (Daltons)	579.588	
Mw / Mn	1.993	
IV - (dl/g)	0.0922	
Rh - (nm)	9.595	
Mark-Houwink a	-0.052	
Mark-Houwink logK	-0.778	
Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	27.500	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	0.000
dn/dc - (ml/g)	0.0000	0.1060
Solvent	Tris buffer Ph=7.4, 1M CaCl2	
Column Set	aquagel H&M	
System	TD_270	
Flow Rate - (ml/min)	1.000	
Inj Volume - (ul)	200.0	
Volume Increment - (ml)	0.00333	
Detector Temp. - (deg C)	22.0	
Column Temp. - (deg C)	35.0	

Figura 55. Peso molecolare ponderale

E' importante sottolineare che l'analisi GPC, seppur indicativa dell'indice di polidispersione, è poco accurata per la determinazione delle masse molecolari nel caso dei copolimeri ad architettura dendronizzata. Questo perché la calibrazione dello strumento è generalmente effettuata usando standard lineari e di conseguenza i polimeri analizzati dovrebbero avere la stessa struttura degli standard.

L'analisi termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA) misura il peso della sostanza mentre essa è soggetta al riscaldamento con crescita controllata della temperatura.

Scaldando il campione da 25 a 500 °C sotto azoto risultavano evidenti tre eventi di perdita di massa. Il primo fino a 125 °C era attribuibile al desorbimento di acqua legata mediante legame idrogeno al polisaccaride. Da 125 a 220 °C si aveva una prima contenuta decomposizione (4%), mentre una seconda importante decomposizione (67 %) avveniva intorno a 280 °C. A 600 °C a seguito della sostituzione dell'azoto con aria si aveva un'ulteriore perdita di massa (18%) per la combustione dei residui carboniosi. Il residuo fisso (ceneri) risulta intorno all'1.3% ed era attribuibile ad ossidi metallici.

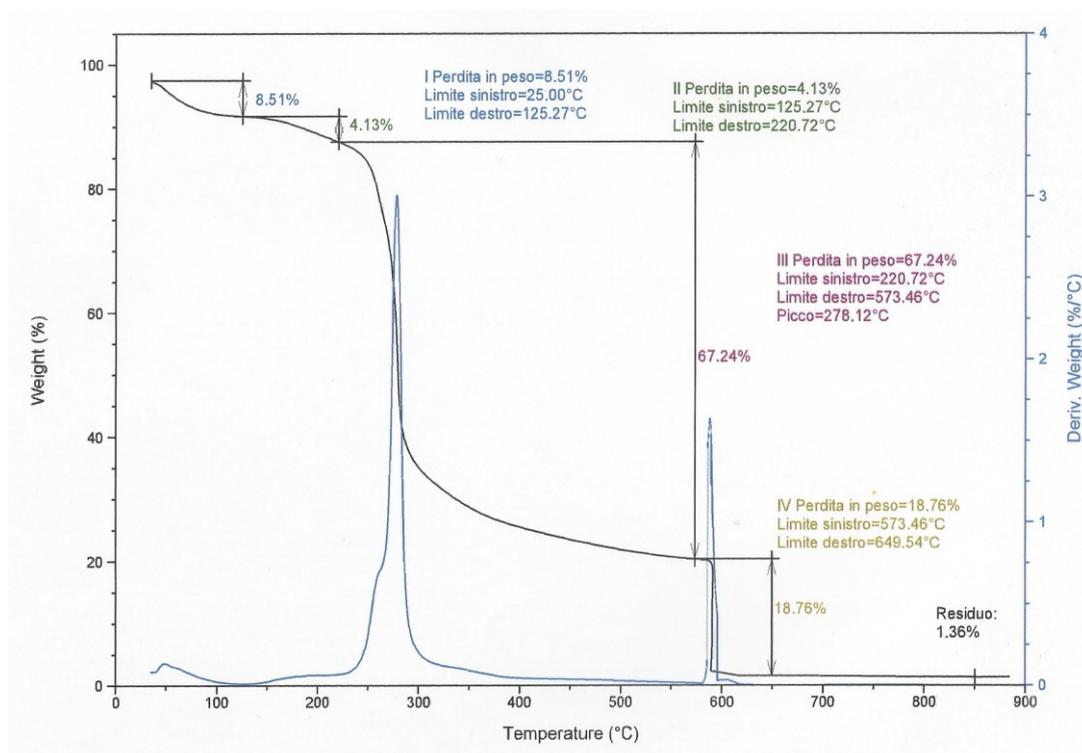


Figura 56. Analisi termogravimetrica

	Cenere %	C/H/S %	N %	Proteine % ^a	pH	$[\alpha]_D^{20}$	Mw (Mw /Mn)
purificata	1.36	38.736 5.468 0	0.857	5.66	5.20	+79.4°	638.354 (1.99)
Grezza		40.106 6.120 0-009	1.096	7.23	5.02	+73.5°	

^a N% x 6.6 (Anderson, 1986)

Tabella 20. Riassunto delle proprietà fisico-chimiche

Per gomme di varie specie di *A. tortilis* Anderson & Bell (1974) riportavano valori di peso equivalente compresi tra 1590 e 2440 con valori di acido uronico tra 11.1 e 7.2, Karamalla *et al.* (1998) per la gomma di *A. senegal* riportava valori medi di peso equivalente e di acido uronico rispettivamente di 1436 e 13.7%. I valori trovati per la gomma oggetto del presente studio sono stati di 1818 per il peso equivalente e 10.6 % per l'acido uronico totale.

Analisi dei metalli

Normalmente una buona parte dei residui carbossilici dei polisaccaridi acidi sono come sali calcio, magnesio, potassio e sodio.

Tuttavia, altri elementi pesanti come Zn, Al, Cd, Cu, Cr, Pb e Co possono anche essere presenti ma in quantità molto piccole.

La quantificazione dei metalli di interesse bromatologico è mostrata in **Tabella 21**. Il nichel e il cadmio sono risultati essere sotto il limite di rivelabilità.

Calcio	5.29±0.19 g/mg
Potassio	3.92±0.31 mg/g
Magnesio	0.24±0.02 mg/g
Sodio	0.19±0.01 mg/g
Ferro	40.36±12.63 µg/g
Manganese	16.26±0.03 µg/g
Zinco	15.70±2.05 µg/g
Cromo	6.28±1.20 µg/g
Rame	2.85±0.01 µg/g
Piombo	2.28±0.41 µg/g
Cadmio	/
Nichel	/

Tabella 21. Quantificazione dei metalli nella gomma

Il piombo secondo Farmacopea deve essere inferiore ai 3 ppm. Il valore trovato nella gomma rispettava il limite prescritto.

Principali monosaccaridi

L'L-arabinosio, il D-galattosio e l'L-ramnosio sono i monosaccaridi più abbondanti che si ottengono per idrolisi acida della gomma. L'analisi GC/MS del nostro campione dopo idrolisi ha fornito un rapporto percentuale relativo arabinosio/galattosio/ramnosio 56.5/40.8/2.7. In particolare il rapporto arabinosio/galattosio è un parametro molto significativo; il suo valore varia notevolmente da specie a specie ma è anche influenzato, seppure in misura minore, dal clima, dalla stagione, l'età dell'albero e dal suo habitat.

Per esempio la gomma arabica da *A. Senegal* presenta generalmente un rapporto di 0.61 mentre quella da *A. seyal* di 1.21 (Azzaoui et al., 2015).

L'analisi GC/MS e ¹H-NMR del nostro campione fornisce un rapporto arabinosio/galattosio intorno a 1.4. Rapporti variabili tra 1.1 e 3.2 si ricavano dal lavoro di Anderson & Bell (1974) per gomme di varie sottospecie di *A. tortilis*.

RT	Area%	Composto
11.825	18.75	D-arabinosio (alfa)
12.248	2.22	L-ramnosio
12.953	28.15	D-arabinosio (beta)
21.354	14.03	D-galattosio (alfa)
22.462	19.92	D-galattosio (beta)

Tabella 22. Analisi dei monomeri in GC-MS

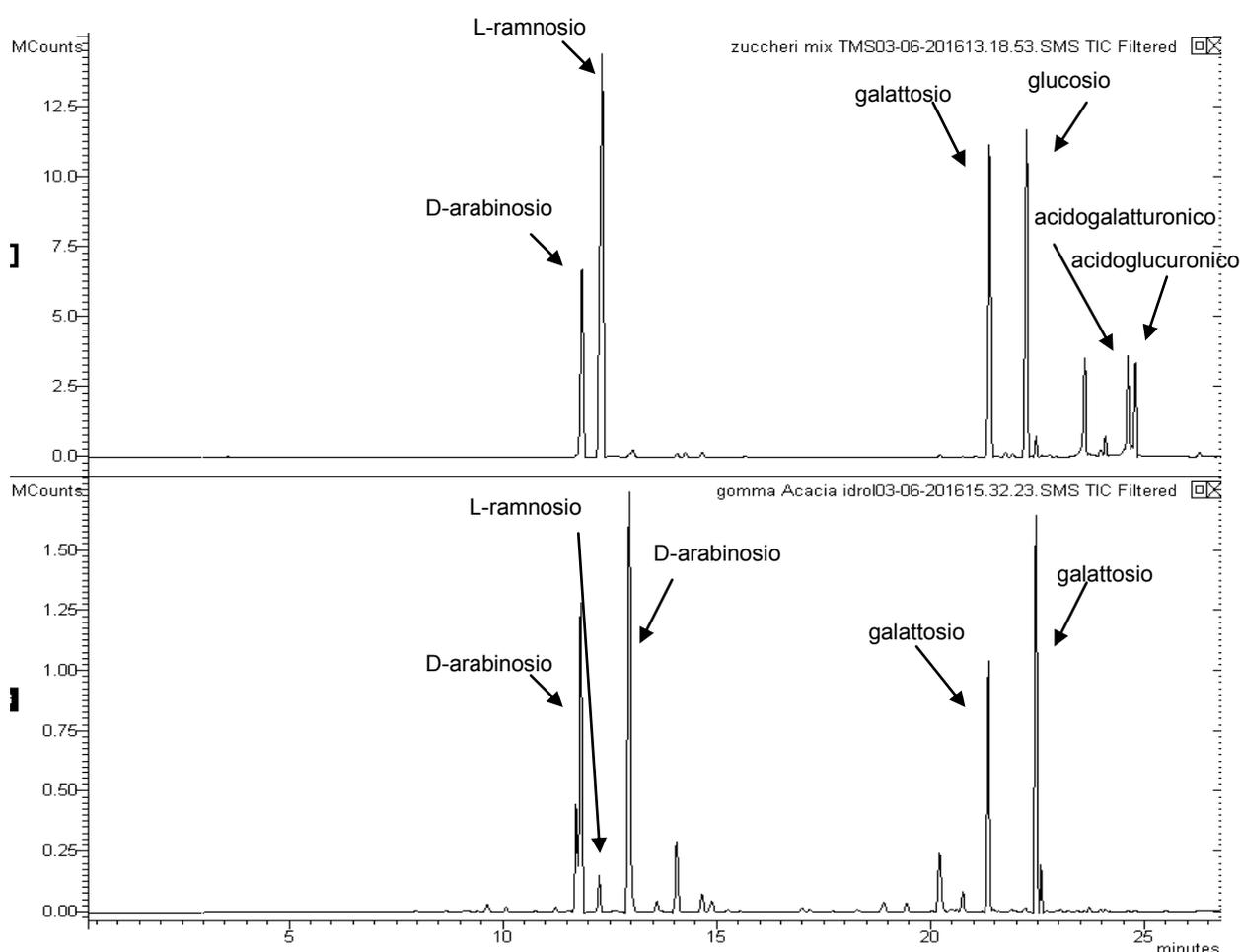


Figura 57. Cromatogrammi dei monomeri standard e della gomma purificata idrolizzata

Caratterizzazione spettroscopica

La spettroscopia IR e NMR sono tecniche non distruttive che offrono una risposta analitica riproducibile con una minima preparazione del campione e sono ampiamente utilizzate per il *fingerprinting* di miscele complesse.

Lo spettro infrarosso in trasformata di Fourier (FT-IR) è mostrato in **figura 58**. L'ampia banda di assorbimento a circa 3300 cm^{-1} è stata assegnata principalmente allo stretching dei gruppi O-H mentre quella a circa 2920 cm^{-1} è stata attribuita a quello dei C-H. La banda a 1370 poteva essere assegnata al bending simmetrico del $-\text{CH}_3$, mentre le bande intorno al 1610 e 1415 cm^{-1} agli stretching del carbossilato. La larga ed intensa banda incentrata a circa 1015 cm^{-1} derivava dallo stiramento dei vari gruppi C-O endociclici ed esociclici.

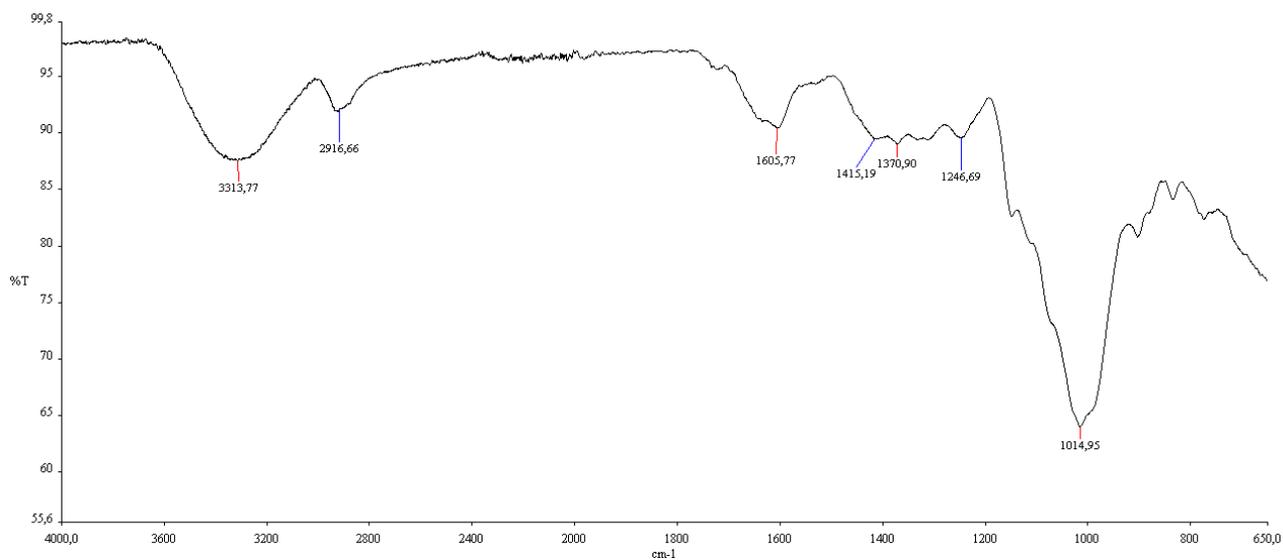


Figura 58. Spettro IR della gomma

^1H e ^{13}C -NMR

Gli spettri NMR della gomma purificata sciolta in D_2O sono presentati in **figura 59**.

Lo spettro ^1H -NMR presentava un affollamento di segnali nella zona tra 3 e 5.5 ppm che è tipico dei polisaccaridi (Fig. 59a). I segnali dei protoni non-anomerici ($\text{H}_2\text{-H}_6$) sono stati assegnati tra 3.3 e 4.4 ppm mentre nella zona tra 4.6 e 5.5 ppm comparivano i segnali dei protoni anomeric (H_1). L'intenso picco a 4.6 ppm era parzialmente dovuto alla presenza di H_2O . Il segnale a 1.07 ppm era assegnabile al gruppo metile del ramnosio e quello a 1.96 ppm era indicativo della presenza del gruppo acetile con il relativo segnale ^{13}C rispettivamente a 16.5 e 20.1 ppm (Fig. 59b). I segnali dei carboni non anomeric apparivano tra 58 e 85 ppm, mentre i segnali dei carboni anomeric risuonavano nella zona tra 95 e 110 ppm. Erano presenti inoltre vari segnali intorno a 175 ppm attribuibili a carboni carbonilici di gruppi acetilici e al C6 di acidi uronici.

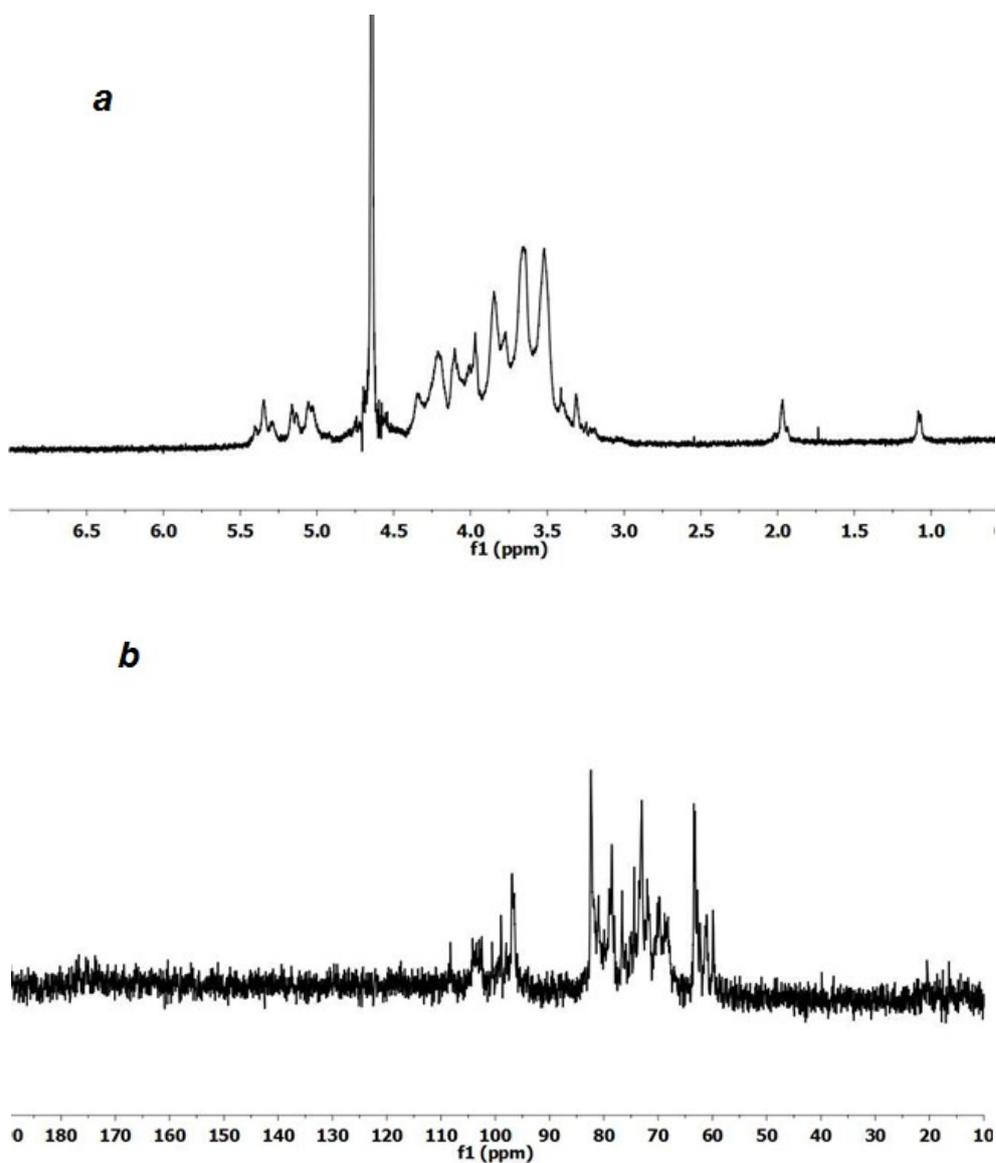


Figura 59. Spettri ^1H e ^{13}C -NMR della gomma

3.5.2 Attività biologica di *A. tortilis* subsp. *raddiana*

Per dimostrarne l'attività cicatrizzante è stato preliminarmente svolto un test di attività citotossica su cheratociti HaCaT e una volta individuato il range di concentrazioni non tossiche provata la capacità di rimarginazione della ferita con il test del woundhealing.

I risultati ottenuti, tramite il test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), un saggio colorimetrico basato sulla riduzione intracellulare dei sali di tetrazolio da parte dell'enzima mitocondriale succinato (Mosmann 1983), esponendo le cellule HaCaT ad un ampio range di concentrazioni (da 10 a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) di gomma di Acacia grezza ed purificata, hanno evidenziato che entrambi i campioni testati determinano una diminuzione della vitalità cellulare dose dipendente dopo 24 e 48 ore. La gomma di Acacia purificata è risultata più citotossica sui cheratinociti di quella grezza poiché, a partire dalla

concentrazione di 600 $\mu\text{g/mL}$, determinava una diminuzione significativa della vitalità cellulare rispetto alla coltura controllo, trattata con il solo veicolo. La gomma di Acacia grezza è risultata citotossica a partire dalla concentrazione di 800 $\mu\text{g/mL}$ dopo 24 e 48 ore di trattamento.

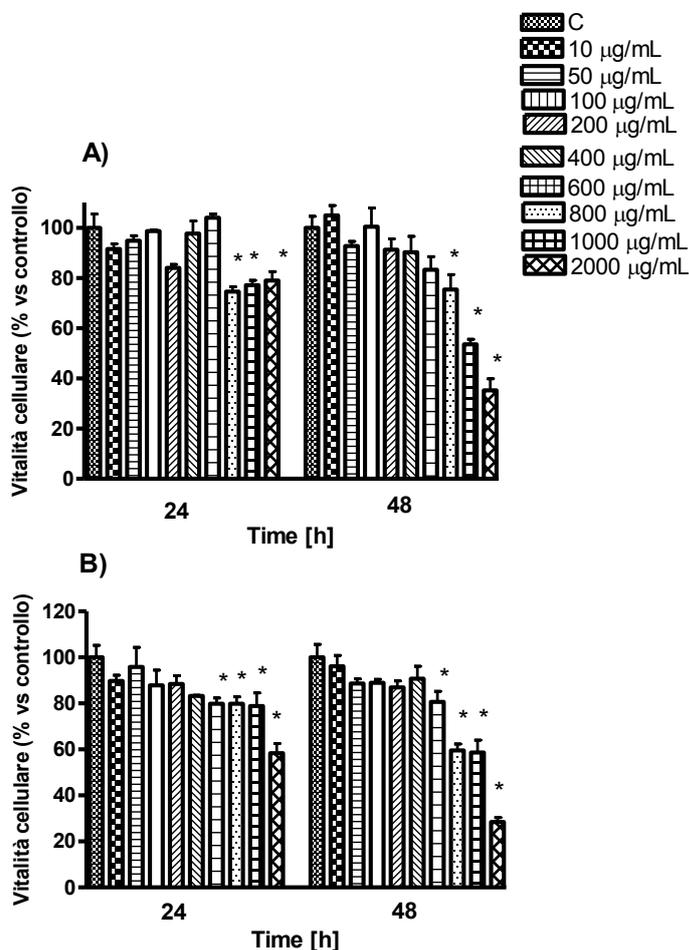


Figura 60. Attività citotossica sulle cellule HaCaT dopo 24 e 48 ore di trattamento con gomma di Acacia grezza (A) ed purificata (B). I valori sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo (C) esposto al solo veicolo, e riportati come media \pm SEM (n=3 esperimenti).

A partire da queste indicazioni è stato effettuato il test del wound-healing (Fox et al., 2017). La capacità di migrazione dei cheratinociti per la rimarginazione della ferita, dopo 24 ore di trattamento con diverse concentrazioni di gomma di Acacia grezza (A) ed resina di Acacia purificata (B) in confronto ad un controllo non trattato con Acacia, ha dimostrato risultati del 98% di chiusura per la gomma purificata a concentrazioni non citotossiche pari a 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$, mentre per quella grezza tra 80-90% (**Figura 61**).

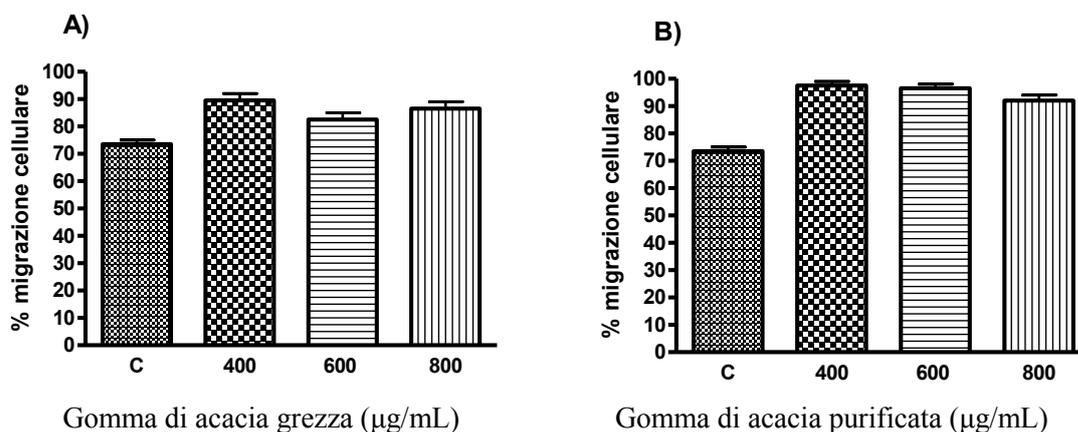


Figura 61. Istogrammi relative al test del wound-healing.

La gomma purificata formulata come gel al 10% ha mostrato una sicurezza d'uso topico tramite il patch test, eseguito presso il centro di cosmetologia all'Università di Ferrara.

4 Conclusioni

Quattro dei 17 global goals dell'Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile costituiscono gli obiettivi generali del progetto di ricerca: la lotta alla fame nel mondo, la buona salute, la lotta alla povertà, l'istruzione di qualità. Tali obiettivi sono stati per lo più raggiunti attraverso il progetto di dottorato. Considerando infatti le condizioni di malnutrizione della popolazione sahwawi, dovute alla condizione di profughi da oltre 40 anni, questi obiettivi generali sono stati declinati in obiettivi specifici che erano:

- 1) individuare alcune piante del Sahara Occidentale con adeguato contenuto di micro e macro-nutrienti che potessero essere suggerite per l'integrazione della dieta sahwawi
- 2) valutare il contenuto di metaboliti secondari e l'attività antiossidante
- 3) indagare dal punto di vista fitochimico e biologico più approfonditamente alcune droghe
- 4) formulare alcuni prodotti salutistici ad uso topico che potessero poi essere preparati direttamente nel laboratorio "M. Embarek Fakal-la", nei campi rifugiati sahwawi.

L'analisi bromatologica, non documentata in letteratura per queste piante, ha consentito di individuare risultati interessanti su alcune droghe, come *A. leucotrichus*, *A. halimus*, *N. perrini* per il contenuto di macro e micronutrienti: tali risultati dovranno essere vagliati da nutrizionisti per valutare l'applicabilità dell'integrazione di queste droghe nella dieta sahwawi. Contestualmente verrà approfondita la qualità di quelle già presenti sui mercati locali per valutare il contenuto di metalli pesanti, soprattutto piombo, che in alcuni casi è risultato essere maggiore dei limiti imposti dalla Farmacopea europea.

La valutazione del contenuto di fenoli e di attività antiossidante non ha restituito risultati interessanti: solo moderata l'attività di *N. perrini*, che merita di essere comunque ulteriormente approfondita in studi ulteriori.

Per quanto riguarda *A. leucotrichus* è stata valutata la composizione chimica dell'olio essenziale, già noto in letteratura, e di due preparazioni, una tradizionale il decotto, e l'altra più tipica della medicina occidentale, estratto etanolico che aveva lo scopo di produrre un fitocomplesso arricchito nelle due molecole perillaldeide e ammolattone. Tali composti puri, isolati sono stati quantificati negli estratti mediante HPLC-DAD. L'attività biologica ha messo in evidenza un potere fungicida verso dermatofiti con MIC di 25 µg/mL e fungistatico verso fitopatogeni con MIC 500 µg/mL dell'olio essenziale. Tuttavia l'olio inserito in formulazione cosmetica, oleolita al 2%, ha fornito solo una debole attività, pur essendo risultato sicuro per l'uso topico. Si dovrà valutare se provare ad aumentare ulteriormente la concentrazione nel prodotto formulato.

Lo stesso oleolita ha rivelato moderata attività antibatterica verso *S. aureus* e *C. albicans*, suggerendo la possibilità di uso come antibatterico topico. Potrebbe essere interessante come sviluppo futuro valutarne l'attività in associazione ad antibiotici di sintesi per proporre applicazioni terapeutiche nel caso di farmaco-resistenze.

Perilladeide è risultata essere interessante per la sua attività antinfiammatoria con il test enzimatico della 5-lipossigenasi e insieme ad ammolattone ha mostrato capacità di ridurre l'infiammazione su cellule IB3-1, inibendo l'espressione dell'IL-8 (attività a concentrazioni non tossiche per le colture). Le due molecole possono essere considerate promettenti composti per controllare l'infiammazione nella fibrosi cistica.

Questi risultati hanno inoltre offerto un contributo alla validazione dell'utilizzo etnomedico della droga per il trattamento di infiammazioni alle vie aeree superiori, dovute ad infezioni. È emerso inoltre un moderato effetto antiproliferativo dei composti puri in cellule tumorali eritroleucemiche K562: le molecole non hanno indotto però alcun differenziamento eritroide.

La gomma di *A. tortilis* subsp. *raddiana*, dopo purificazione, è stata oggetto di una approfondita caratterizzazione chimica. L'attività biologica incentrata sul test del wound-healing ha comprovato l'uso tradizionale della gomma come cicatrizzante. La formulazione in idrogel al 10% si è rivelata sicuro per l'uso topico.

I risultati emersi aprono dunque prospettive di formulazione di alcuni prodotti a livello locale e la possibile integrazione della dieta sahwari con alcune delle droghe studiate.

Bibliografia

Abd-Ellatif S., Rahman S. M., Deraz S. F., “Promising antifungal effect of some folkloric medicinal plants collected from El-Hammam habitat, Egypt against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi”, *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, vol. 6, pp. 25-32, 2011

Abdel-Rahman S. M., Abd-Ellatif S. A., Deraz S. F., Khalil A. A., “Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment” *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, pp. 10733-10743, 2011

Abu Zarga M.H., Al-Jaber H.I., Baba Amer Z.Y., Sakhril L., Al-Qudah M. A., Al-Humaidi J.Y.G., Abaza I.F., Afifi F.U., “Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of Essential Oil of *Ammodaucus leucotrichus* Growing in Algeria”, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, vol. 3, pp. 224-231, 2013.

Adams R.P., “Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry”, Allured Publishing Co.: Carol Stream, Illinois, USA, 2007.

Alaoui M.S.B., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Amusant N., El Antry S., Chaouch A., “Bioactivity and chemical quality of *Ammodaucus leucotrichus* ssp. *leucotrichus* Coss. & Durieu essential oils from Morocco” *Natural Products*, vol. 10(6), pp. 208–214, 2014

Al Gamdi N., Mullen W., Crozier A., “Tea prepared from *Anastatica hierochuntica* seeds contains a diversity of antioxidant flavonoids, chlorogenic acids and phenolic compounds”, *Phytochemistry*, vol. 72(2–3), pp. 248-254, 2011

Al-Humaidi J.Y., Al-Qudah M.A., Al-Saleem M.S., Alotaibi S.M., “Phytochemical Investigation and *in vitro* Antioxidant Activities of *Cleome amblyocarpa* Barratte & Murb and *Cleome ramosissima* Parl. Growing in Saudi Arabia”, *Jordan Journal of Chemistry* vol. 12(4), pp. 241-254, 2017

Anderson D.M.W. and Bell P.C., “The composition and properties of gum exudates from subspecies of *Acacia tortilis*”, *Phytochemistry*, vol.13, pp. 1875–1877, 1974

Anderson D. M. W. “Nitrogen conversion factors for the proteinaceous conten of gums permitted as food additives”, *Food Additives & Contaminants*, vol. 3(3), pp. 321-234, 1986

Andrewes P., Busch J. L. H. C., De Joode T., Groenewegen A., Alexandre H., “Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 51, pp. 1415-1420, 2003

Atanasov A.G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Hiess E.H., Rollinger J.M., Schuster D., Breuss J.M., Bochkov V., Mihovilovic M.D., Kopp B., Bauer R., Dirsch V.M., Stuppner H., “Discovery and resupply of pharmacologically active plant-dreived naotural products: A review”, *Biotechnology Advances*, vol. 33, pp. 1582-1614, 2015

Azzaoui K., Hammouti B., Lamhamdi A., Mejdoubi E., Berrabah M., “The gum Arabic in the southern region of Morocco”, Moroccan Journal of Chemistry, vol. 3 (1), pp. 99–107, 2015

Barrera Martínez I., Ron Alvarez M.E., Pajaron Sotomayor S., Sidi Mustapha R. Sahara Occidental, “Plantas y Usos. Usos y costumbres del pueblo saharauí relacionados con los recursos vegetales. Estudio etnobotánico del Sahara Occidental”, Universidad Complutense de Madrid y Ministerio de Cultura de la República Árabe Saharaui Democrática, Madrid, 2007

Baylac S. and Racine P., “Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts”, International Journal of Aromatherapy, vol. 13, pp. 138–142, 2003

Beghalia M., Ghalem S., Allali H., Belouatek A. and Marouf A., “Effects of an aqueous extract from *Ammodaucus leucotrichus* on calcium oxalate crystallization *in vitro*”, Medicinal Plants, vol. 1, pp. 37-39, 2009

Bhateja P.K. and Singh R., “Antidiabetic Activity of *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *Raddiana*. Polysaccharide on Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats”, BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 572013, 2014

Bhatnagar M., Parwani L., Sharma V., Ganguli J., Bhatnagar A., “Hemostatic, antibacterial biopolymers from *Acacia arabica* (Lam.) Willd. and *Moringa oleifera* (Lam.) as potential wound dressing materials”, Indian Journal of Experimental Biology, vol. 51(10), pp. 804-810, 2013

Bisht S., Kant R., Kumar V., “ α -D-glucosidase inhibitory activity of polysaccharide isolated from *Acacia tortilis* gum exudates”, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 59, pp. 214-220, 2013

Bistoni F., Nicoletti G., Nicolosi V.M., “Microbiologia e microbiologia clinica”; Elsevier Masson, 2008

Boukhris M.A., Destandau E., El Hakmaoui A., El Rhaffari L., Elfaki C., “A dereplication strategy for the identification of new phenolic compounds from *Anvillea radiata* (Coss. & Durieu)”, Comptes Rendus Chimie, vol. 19(9), pp. 1124-1132, 2016

Cabras P. and Martelli A.; “Chimica degli alimenti”; Piccin, 2004

Cheng Z., Moore J., Yu L., “High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay”, Journal of Agricultural Food Chemistry, vol. 54, pp. 7429–7436, 2006

Chikhi I., Allali H., El Amine Dib M., Medjdoub H., Tabti B., “Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in streptozotocin-induced diabetic rats”, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, vol. 4, pp. 181-184, 2014

CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 9th ed.”, Approved Standard M07-A9, Wayne, USA, 2012

Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S. L., Duke J. A., Brielmann H. L. “Natural products from plants” (second edition), Taylor & Francis Group, CRC Press, 2006

- Colonna S., Folco G., Marangoni F.; “I cibi della salute: le basi chimiche di una corretta alimentazione”; Springer, 2012
- Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G., “The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*”, Crop Protection, vol. 22(1), 39-44, 2003
- Dahmane D., Dob T., Krimat S., Nouasri A., Metidji H., Ksouri A., “Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of medicinal plant *Ammodaucus leucotrichus* from Algeria”, Journal of Essential Oil Research, vol. 29 (1), pp. 48–55, 2017
- Daoub R.M.A., Elmubarak A.H, Misram M., Hassan E.A., Osman M.E., “Characterization and functional properties of some natural *Acacia* gums”, Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, vol. 17, pp. 241-249, 2018
- Destandau E., Boukhris M.A., Zubrzycki S., Akssira M., El Rhaffari L., Elfakir C., “Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillea radiata*”, Journal of Chromatography B, vol. 985, pp. 29-37, 2015
- Djellouli M., Moussaoui A., Benmehdi H., Ziane L., Belabbes A., Badraoui M., Slimani N., Hamidi N., “Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of South west Algeria”, Asian Journal of Natural & Applied Sciences, vol. 2, pp. 159-165, 2013
- Edziri H., Mastouri M., Aouni M., Anthonissen R., Verschaeve L., “Investigation on the genotoxicity of extracts from *Cleome amblyocarpa* Barr. and Murb, an important Tunisian medicinal plant” South African Journal of Botany, vol. 84, pp. 102-103, 2013
- EFSA, “ Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 208 Revision 1 (FGE.208Rev1): Consideration of genotoxicity data on representatives for 10 alicyclic aldehydes with the α,β -unsaturation in ring / side-chain and precursors from chemical subgroup 2.2 of FGE.19”, EFSA Journal, vol. 13(7), pp.4173, 2015
- El-Haci I. A., Bekhechi C., Atik-Bekkara F., Mazari W., Gherib M., Bighelli A., Casanova J., Tomi F., “Antimicrobial Activity of *Ammodaucus leucotrichus* Fruit Oil from Algerian Sahara”, Natural Product Communications, vol. 9, pp. 711-712, 2014
- El Hassany B., El Hanbali F., Akssira M., Mellouki F., Haidour A., Barrero A.F., “Germacranolides from *Anvillea radiata*”, Fitoterapia, vol. 75(6), pp. 573-576, 2004
- El-Readi M.Z., Eid H.H., Ashour M.L, Eid S.Y., Rola Labib M., Sporer F., Wink M., “Variations of the chemical composition and bioactivity of essential oils from leaves and stems of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae)”, Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 65(11), pp. 1653-1663, 2013
- El Shaer H. M., “Halophytes and salt-tolerant plants as potential forage for ruminants in the Near East region”, Small Ruminant Research, vol. 91, pp. 3-12, 2010
- Emam S. S., “Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant”, Journal of Natural Products, vol. 4, pp. 25-41, 2011
- Evangelisti F. and Restani P.; “Prodotti dietetici”, Piccin, 2011

- Farzaneh F., Fatehi S., Sohrabi M. R., Alizadeh K.; “The effect of oral evening primrose oil on menopausal hot flashes: a randomized clinical trial”; *Archives of Gynecology and Obstetrics*; vol. 288, pp. 1075-1079, 2013
- Gherboudj O., Benkiki N., Seguin E., Tillequin F., Kabouche Z., “Components of *Matricaria pubescens* from algerian septentrional Sahara”, *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 48 (3), pp. 470-471, 2012
- Fox L.T., Mazumder A., Dwivedi A., Gerber M., du Plessis J., Hamman J.H., “*In vitro* wound healing and cytotoxic activity of the gel and whole-leaf materials from selected aloe species”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 22, pp. 200:1-7, 2017
- Gammon D.W., Churmsa S.H., Stephen A.M., “Arabinogalactan- protein components of *Acacia tortilis* gum”, *Carbohydrate Research*, vol. 151, pp. 135-146, 1986
- Gherra N., Zellagui A., Kabouche A., Lahouel M., Salhi R., Rhouati S., “Chemical constituents and antimicrobial activity of essential oils of *Ammodaucus leucotrichus*” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, S2476–S2478, 2017
- Griel A. E., Kris-Etherton P. M., Hilpert K. F., Zhao G., West S. G. and Corwin R. L.; “An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans”; *Nutrition Journal*, vol. 16, pp. 2-6, 2007
- Guerrini A., Rossi D., Paganetto G., Tognolini M., Muzzoli M., Romagnoli C., Antognoni, F., Vertuani S., Medici A., Bruni A., Useli C., Tamburini E., Bruni R., Sacchetti G., “Chemical characterization (GC/MS and NMR fingerprinting) and bioactivities of South-African *Pelargonium capitatum* (L.) L'her. (Geraniaceae) essential oil”, *Chemistry and Biodiversity*, vol. 8(4), pp. 624-642, 2011
- Hagos M., Samuelsson G., Kenne L., Modaw B.M., “Isolation of smooth muscle relaxing 1, 3-diaryl-propan-2-ol derivatives from *Acacia tortilis*”, *Planta Medica*, vol. 53(1), pp. 27-31, 1987
- Haj Said A.A., Derfoufi S., Sbai I., Benmoussa A., “Ethnopharmacological survey of traditional medicinal plants used for the treatment of infantile colic in Morocco”, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 7, pp. 664-671, 2015
- Halla N., Heleno S.A., Costa P., Fernandes I.P., Calhelha R.C., Boucherit K., Rodrigues A.E, Ferreira I.C.F.R., Barreiro M.F., “Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Ammodaucus leucotrichus* fruits growing in Sahara and its evaluation as a cosmeceutical ingredient”, *Industrial Crops & Products*, vol. 119, pp. 249–254, 2018
- Harras F.M., Ulebelen A., Öksüz S., Tan N., “Dammarane triterpenes from *Cleome amblyocarpa*”, *Phytochemistry*, vol. 39(1), pp. 175-178, 1995
- Hassine A.B., Ghanem M.E., Bouzid S., Lutts S., “An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress”, *Journal of Experimental Botany*, vol. 59(6), pp. 1315–1326, 2008

Hendrix F.F., Campbell W.A., “Pythiums as Plant Pathogens”, Annual Review of Phytopathology, vol. 11, pp. 77-81, 1973

IUNC Centre For Mediterranean Cooperation, “A guide to medicinal plants in North Africa”, Malaga, 2005

Iwasawa M., Yorifuji K., Sano A., Takahashi Y., Nishimura K., “Case of kerion celsi caused by *Microsporium gypseum* (*Arthroderma gypseum*) in a child”, Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, vol.50(3), pp. 155-60, 2009

Kamilova F., Lamers, Lugtenberg B., “Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores”, Environmental microbiology, vol. 10(9), pp. 2455-2461, 2008

Kandouli C., Cassien M., Mercier A., Delehedde C., Ricquebourg E., Stocker P., Mekaouche M., Leulmi Z., Mechakra A., Thétiot-Laurent S., Culcasi M., Pietri S. “Antidiabetic, antioxidant and anti inflammatory properties of water and n-butanol soluble extracts from Saharian *Anvillea radiata* in high-fat-diet fed mice”, Journal of Ethnopharmacology, vol. 207, pp. 251-267, 2017

Karamalla A.K., Siddig N.E., Osman M. E., “Analytical data for *A. senegal* var. *senegal* Gum Samples Collected Between 1993 and 1995 from Sudan”, Food Hydrocolloids, vol. 12 (4), pp.373-378, 1998

Lakhera A.K. and Kumar V., “Monosaccharide composition of acidic gum exudates from Indian *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) Brenan”, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 94(part A), pp. 45-50, 2017

Lampronti I., Dehecchi M.C., Rimessi A., Bezzerri V., Nicolis A., Guerrini A., Tacchini M., Tamanini A., Munari S., D'Aversa E., Santangelo A., Lippi G., Sacchetti G., Pinton P., Gambari R., Agostini M., Cabrini G, “Beta-sitosterol reduces the expression of chemotactic cytokine genes in cystic fibrosis bronchial epithelial cells”, Frontiers in Pharmacology, vol 8, p. 236, 2017

Lee S.C., Kellogg C., Prosky, L., De Vries, J.W., “Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods: enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study”, Journal of the Association of Official Analytical Chemists International USA, 1992

Leone A., Fiorillo G., Criscuoli F., Ravasenghi S., Santagostini L., Fico G., Spadafranca A., Battezzati A., Schiraldi A., Pozzi F., di Lello S., Filippini S. Bertoli S. Nutritional “Characterization and Phenolic Profiling of *Moringa oleifera* Leaves Grown in Chad, Sahrawi Refugee Camps and Haiti”, International Journal of Molecular Science, vol. 16, pp. 18923-18937, 2015

Makhloufi A., Moussaoui A., Lazouni H.A, “Antibacterial activities of essential oil and crude extracts from *Matricaria pubescens* (Desf.) growing wild in Bechar, South west of Algeria”, Journal of Medicinal Plants, vol. 6, pp. 3124-3128, 2012

Manni A., Xu H., Washington S., Aliaga C., Das A., Cooper T., Richie J. P. Jr, Prokopczyk B., Calcagnotto A., Trushin N., Van den Heuvel J. P., Hamilton C., Demers L. M., Liao J., Verderame M. F., El-Bayoumy K., “The effects of Tamoxifen and fish oil on

mammary carcinogenesis in polyoma middle T transgenic mice”, *Hormones & Cancer*; vol. 2, pp. 249-259, 2011

Maiyo F., Moodley R., Singh M., “Phytochemistry, cytotoxicity and apoptosis studies of β -sitosterol-3-O-glucoside and β -amyrin from *Prunus africana*”, *African Journal of Traditional and Complementary Alternative Medicine*, vol. 13, pp. 105-112, 2016

Medeiros P.M. and Simoneit B.R.T. “Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1141, pp. 271-278 (2007)

Merajuddin K., Abdullah M.M.S., Mousa M.M., Alkathlan H.Z., “Chemical composition of vegetative parts and flowers essential oils of wild *Anvillea garcinii* grown in Saudi Arabia”, *Records of Natural Products*, vol. 10(2), pp. 251-256, 2016

Metrouh-Amir H. and Amir N., “Evaluation in vivo of anti-inflammatory and analgesic properties of *Matricaria pubescens* alkaloids”, *South African Journal of Botany*, vol. 116, pp. 168–174, 2018

Miguel M.G., “Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short Review”, *Molecules*, vol. 15(12), pp. 9252–9287, 2010

Ministerio de Salud Pública, RASD; “Encuesta Nutricional de Seguridad Alimentaria en los Campamentos de Refugiados Saharais en Tindouf”, Argelia; 2008

Mosmann T., “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays”, *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, pp. 55-63, 1983

Muckensturm B., Diyani F., Le Nouen D., Fkih-Tetouani S., Reduron J. P., “Ammolactone, a guanolide from a medicinal plant, *Ammodaucus leucotrichus*”, *Phytochemistry*, vol. 44, pp. 907-910, 1997

Nakashima S., Matsuda H., Oda Y., Nakamura S., Xu F., Yoshikawa M., “Melanogenesis inhibitors from the desert plant *Anastatica hierochuntica* in B16 melanoma cells” , *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 18(6), pp. 2337-2345, 2010

Panche A.N., Diwan A.D., Chandra R.S., “Flavonoids: an overview”, *Journal of Nutritional Science*, vol. 5, p. e47, 2016

Pérez-Esteban J., Escolástico C., Ruiz-Fernández J., Masaguer A., Moliner A., “Bioavailability and extraction of heavy metals from contaminated soil by *Atriplex halimus*”, *Environmental and Experimental Botany*, vol. 88, pp. 53-59, 2013.

Perveen S. Al-Taweel A.M, Yusufoglu H.S, Fawzy G.A, Foudah A, Abdel-Kader M.S., “Hepatoprotective and cytotoxic activities of *Anvillea garcinii* and isolation of four new secondary metabolites”, *Journal of Natural Medicines*, vol. 72(1), pp. 106–117, 2018

Piironen V., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A.-M., “Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, pp. 939–966, 2000

Prencipe F.P., Bruni R., Guerrini A., Rossi D., Benvenuti S., Pellati F., “Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their

- chemopreventive properties”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 89, pp. 257-267, (2014)
- Prosky L., Asp N.G., Schweizer T.F., DeVries J.W., Furda I., “Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study”, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, vol. 71, pp. 1017–1023, 1988
- Psota T. L., Gebauer S. K., Kris-Etherton P., “Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk”, *The American Journal of Cardiology*, vol. 98, 2006
- Radice M., Viafara D., Neill D., Asanza M., Sacchetti G., Guerrini A., Maietti S., Chemical characterization and antioxidant activity of Amazonian (Ecuador) *Caryodendron orinocense* Karst. and *Bactris gasipaes* Kunth seed oils”, *Journal of Oleo Science*, vol. 63(12), pp. 1243-1250, (2014)
- Raguvaran R. and Manuja B.K., “Sodium alginate and gum acacia hydrogels of ZnO nanoparticles show wound healing effect on fibroblast cells”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 96, pp. 185-191, 2017
- Ross J.H., “A Conspectus of the African Acacia species” *Memoirs of the Botanical Survey of South Africa*, vol.44: pp. 111–114, 1979
- Rustaiyan A., Naji-Hosseinzadeh T., Behnam M., Tabatabaei Anaraki M., “Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Leaves and Flowers of *Anvillea garcini* (Burm.)” *Journal of Essential Oil Research*, vol. 23(1), pp. 32-34, 2011
- Santos D.A., Barros M.E., Hamdan J.S. “Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*”, *Journal of Clinical microbiology*; vol. 44(1), pp. 98-101, 2006
- Sattar E.A., Galal A.M., Gaber S. “Mossa Antitumor Germacranolides from *Anvillea garcinii*”, *Journal of Natural Product*, vol. 59, pp. 403-405, 1996
- Schmidt B.M., Klaser Cheng D.M., “Ethnobotany: A Phytochemical Perspective”, John Wiley & Sons, 2017
- Simopoulos A. P., “The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases”, *Experimental Biology and Medicine*, vol. 233, pp. 674-688, 2008
- Singh B. and Dhiman A., “Design of Acacia Gum–Carbopol–Cross-Linked-Polyvinylimidazole Hydrogel Wound Dressings for Antibiotic/Anesthetic Drug Delivery”, *Industrial and Engineering Chemistry, Research*, vol. 55(34), pp. 9176–9188, 2016
- Singh B., Sharma S., Dhiman A., “Acacia gum polysaccharide based hydrogel wound dressings: Synthesis, characterization, drug delivery and biomedical properties”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 165, pp. 294-303, 2017
- Snoussi M., Najett M., Boumediene M., Abdellah M., “*Anvillea radiata* (aerial parts): antifungal effect on mycotoxigenic fungi” *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol. 43(1), pp. 32-34, 2017

- Sonboli A., Esmaili M.A., Gholipour A., Kanani M.R., “Composition, cytotoxicity and antioxidant activity of the essential oil of *Dracocephalum surmandinum* from Iran”, *Natural Product Communication*, vol. 5, pp. 341–344, 2010
- Tacchini M., Spagnoletti A., Marieschi M., Caligiani A., Bruni R., Efferth T., Sacchetti G., Guerrini A., “Phytochemical profile and bioactivity of traditional ayurvedic decoctions and hydro-alcoholic macerations of *Boerhaavia diffusa* L. and *Curculigo orchioides* Gaertn.”, *Natural Product Research*, vol. 29(22), pp. 2071-2079, 2015
- Tan N., Harraz F.M., Ulubelen A., “Flavonoids from *Cleome amblyocarpa*”, *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, vol. 31, pp. 25-28, 1995
- Tian J., Zeng X., Lu A., Zhu A., Peng X., Wang Y., “Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes”, *LWT – Food Science and Technology*, vol. 60, pp. 63-70, 2015
- Trenev N.; *Probiotici sulla natura: i batteri amici della nostra salute*; Ed. Tecniche nuove, 1998.
- Tyson R.L., Chang C.J., McLaughlin J.L., Cassady J.M., “9 α -Hydroxyparthenolide, a novel antitumor sesquiterpene lactone from *Anvillea garcinii* (Burm.) DC.” *Experientia*, vol. 37, pp. 441–442, (1981)
- Velasco-Negueruela A., Pèrez-Alonso M.J., Pèrez de Paz P.L., Pàla-Paül J., Sanz J., “Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the volatiles from the fruits of *Ammodaucus leucotrichus* subsp. *leucotrichus* and subsp. *nanocarpus* grown in North Africa and the Canary Islands, respectively”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1108, pp. 273-275, 2006
- Vlahov G., “Quantitative ¹³C NMR method using the DEPT pulse sequence for the detection of olive oil adulteration with soybean oil”, vol. 35(13), pp. S8-S12, 1997
- Volpato G.; *Plantas Medicinales Saharawi*; Milano; Onlus Africa 70, 2010
- Volpato G. & Di Nardo A., “The role of *Nucularia perrinii* Batt. (Chenopodiaceae) in the camel-based Sahrawi social-ecological system”, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 13, pp.12, 2017
- Volpato G., Kourková P., Zelený V., “Healing war wounds and perfuming exile: the use of vegetal, animal, and mineral products for perfumes, cosmetics, and skin healing among Sahrawi refugees of Western Sahara”, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, pp. 8-49, 2012
- Wagner H., Bladt S., Rick V., “Plant Drug Analysis”, Springer, 2009
- Walker D.J., Lutts S., Sánchez-García M., Correal E., “*Atriplex halimus* L.: Its biology and uses”, *Journal of Arid Environments*, vol. 100, pp. 111-121, 2014
- Williams P.A. and Phillips G.O., “Gum arabic: production, safety and physiological effects, physicochemical characterisation, functional properties and food applications”, in *Handbook of Dietary Fiber*, Sungsoo Cho, S. and Dreher, M.L.(EDS), Marcel Dekker, New York, 2001

Winkel-Shirley B., "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology", *Plant Physiology*, vol. 126(2), pp. 485–493, 2001

Yoshikawa M., Xu F., Morikawa T., Ninomiya K., Matsuda H., "Anastatins A and B, New Skeletal Flavonoids with Hepatoprotective Activities from the Desert Plant *Anastatica hierochuntica*" *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*, vol. 13(6), pp. 1045-1049, 2003

Zin S.R.M., Kassim N.M., Alshawsh M.A., Hashim N.E., Mohamed Z., "Biological activities of *Anastatica hierochuntica* L. A systematic review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 91, pp. 611-620, 2017

Sitografia

FAO, "Non-timber Uses of Selected Arid Zone Trees and Shrubs in Africa", (<http://www.fao.org/docrep/006/T0044E/T0044e00.htm>), Rome, 1988.

WHO. Traditional medicine (<http://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/about/en/>), 2018.

www.novachimica.com

www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich

PUBBLICAZIONI

Abdi Bellau M.L., Bortolini O., Fantin G., Fogagnolo M., Ragno D., Delso I., Pedro M., "Native quercetin as chloride receptor in organic solvent", *Molecules*, vol. 23 (12), 3366, 2018

Article

Native Quercetin as a Chloride Receptor in an Organic Solvent

Mohamed Lamin Abdi Bellau ¹, Olga Bortolini ¹, Giancarlo Fantin ^{1,*}, Marco Fogagnolo ¹,
Daniele Ragno ¹, Ignacio Delso ^{2,*} and Pedro Merino ³

¹ Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Ferrara, Via Luigi Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy; mohamedlamin.abdibellau@unife.it (M.L.A.B.); olga.bortolini@unife.it (O.B.); marco.fogagnolo@unife.it (M.F.); daniele.ragno@unife.it (D.R.)

² Instituto de Sintesis Quimica y Catalisis Homogenea (ISQCH). Universidad de Zaragoza-CSIC, 50009 Zaragoza, Spain

³ Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; pmerino@unizar.es

* Correspondence: fmn@unife.it (G.F.); idelso@unizar.es (I.D.); Tel.: +039-0532-455946 (G.F.)

Received: 23 November 2018; Accepted: 18 December 2018; Published: 19 December 2018



Abstract: The binding properties of quercetin toward chloride anions were investigated by means of ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) measurements, as well as computational calculations. The results indicate that quercetin behaves primarily as a ditopic receptor with the binding site of the B ring that exhibits stronger chloride affinity compared to the A ring. However, these sites are stronger receptors than those of catechol and resorcinol because of their conjugation with the carbonyl group located on the C ring. The 1:1 and 1:2 complexation of this flavonoid with Cl[−] was also supported by ESI mass spectrometry.

Keywords: quercetin; chloride binding; NMR titrations; quantum mechanics density functional theory (QM-DFT) calculations; molecular dynamics (MD) calculations

1. Introduction

The search for anion receptors is an important area of supramolecular chemistry due to its importance and potential applications in a wide range of chemical and biological processes [1–5]. Most of these receptors have N–H or N–H⁺ groups contributing to bind anions through H-bonding and/or electrostatic interactions. In other cases, metals or Lewis acids can also act as binding sites [6]. In this framework, small natural products capable of binding and transporting anions, specifically chloride, across hydrophobic membranes are relatively few [7]. The growing interest in molecules that bind and “chaperone” the chloride anion is inspired, in large part, by the knowledge that a number of diseases are caused by the misregulation of this anion across cell membranes [8]. With an eye toward the identification of naturally occurring molecules [9] that could potentially carry out the abovementioned functions, we considered quercetin as a candidate. In fact, this compound possesses hydroxyphenyl moieties for the anion recognition [10,11] and shows affinity to hydrophobic phases such as lipid membranes [12,13]. These considerations prompted us to investigate the binding properties of quercetin toward halides in non-competitive solvents. Moreover, despite many studies on this molecule as ligands for metal cations [14–20], to our knowledge, there are no reports concerning interactions of quercetin with anions.

Quercetin is a naturally occurring polyphenol aglycone, belonging to a group of phytochemicals called polyphenol flavonoids, present in a variety of vegetables and fruits, such as onions, apples, berries, broccoli, tea, and red wine, and is considered a health protective phytonutrient [21].

This molecule is, in fact, a potent antioxidant and oxygen radical scavenger, and it is also recognized for having antibacterial, antiviral, antitumoral, and anti-inflammatory properties [22–24].

Quercetin is a 3,5,7,3',4'-pentahydroxy phenol, having a resorcinol-type arrangement of hydroxyl groups in the A ring and a catechol-type structure in the B ring (Figure 1). In the C ring, quercetin also contains a 2,3-double bond and 4-oxo function which can give conjugation with the adjacent aromatic rings.

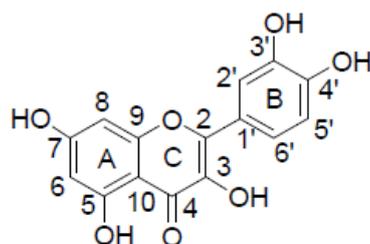


Figure 1. Quercetin (1).

2. Results and Discussion

When solid methyltrioctylammonium chloride was added to a solution of quercetin **1** in deuterated acetone, the chemical shifts of the corresponding $^1\text{H-NMR}$ spectrum showed dramatic changes. The possibility of aggregation of quercetin was negligible since the $^1\text{H-NMR}$ spectra were substantially identical at concentrations within the range of 1–5 mM [25]. Consequently, the results clearly indicated an interaction between the chloride anion and this flavonoid.

2.1. $^1\text{H-NMR}$ Binding Studies

In order to gather information on the sites and the strength of binding we carried out an $^1\text{H-NMR}$ titration of quercetin with chloride (Figure 2).

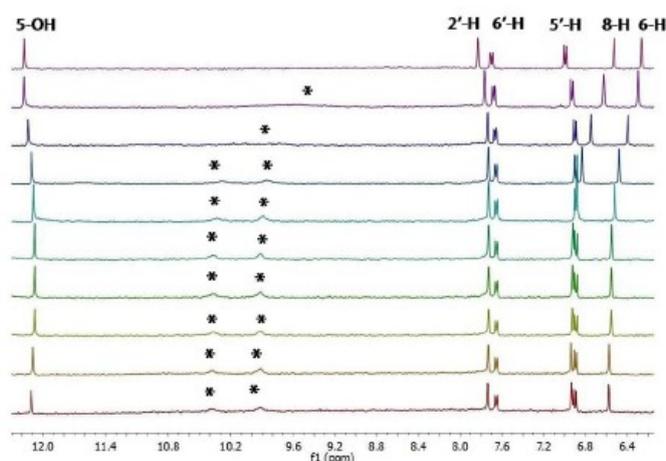


Figure 2. Variations of a portion of $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz) of quercetin (**1**) (concentration = 2.05 mM) during its titration with chloride. The molar fractions of the guest were 0, 1.16, 2.3, 3.4, 4.5, 6.6, 10.7, 16.2, and 27.1 from top to bottom. * indicates OH groups.

The binding isotherms of the C–H protons showed an upfield shift (with hyperbolic trend) for the B-ring protons and a simultaneously more pronounced downfield shift (with sigmoidal shape) for those of the A ring (Figure 3). The behavior of the latter suggests the presence of supplementary

C—H—chloride hydrogen-bonding interactions in the A ring [26]. The NMR signals of the OH protons, with the exception of 5-OH, were indistinguishable at the beginning of titration [27]. On the other hand, they became visible during titration by moving downfield (see Figure 2). This fact suggests that the interaction between the chloride anion and these phenolic OH groups occurs without deprotonation.

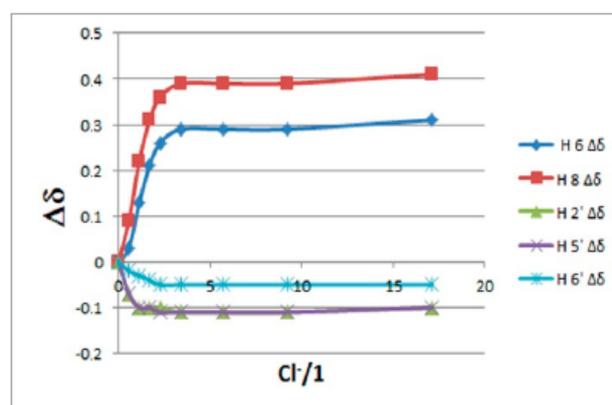


Figure 3. Chemical shifts change of the Ar-H protons of quercetin with increasing Cl^- concentration. Positive values mean downfield shifts.

The simultaneous fitting (HypNMR 2008 program [28]) of the saturation curves of Figure 3 achieved by applying both 1:1 and 1:2 binding model gave binding constants with very large uncertainties (>200%), suggesting that these results are meaningless. More satisfactory results were obtained considering quercetin as a ditopic receptor and fitting the isotherms of the A and B ring separately using a 1:1 binding model [29]; the corresponding binding constants (as Log K values) are reported in Table 1.

Table 1. Binding constants β (as Log K) for chloride (as methyltrioctylammonium salt) by hosts 1–2, resorcinol and catechol in acetone- d_6 at 298 K ^a.

Host	β (M^{-1}) ^a from CH Protons	β (M^{-1}) ^a from OH Protons
Quercetin (1)	$\beta_1 = 4.59$ ^b (error = 36%) $\beta_2 = 2.95$ ^b	n.d. ^c
1a	$\beta_1 = 3.01$ ^b β_2 n.d.	$\beta_1 = 3.02$ ^b β_2 n.d.
2	$\beta = 3.09$	$\beta = 3.10$
Catechol	$\beta = 3.36$	$\beta = 3.29$
Resorcinol	$\beta = 2.39$	$\beta = 2.12$

^a Estimated errors $\leq 10\%$ unless otherwise stated. ^b Binding events on the host were fitted separately as a 1:1 single episode. ^c Not determined due to signals overlapping.

The binding constant obtained for the B ring (catechol moiety) was found to be surprisingly higher than the analog of the catechol (4.59 vs. 3.36; see Table 1). This is probably due to the fact that the B ring of quercetin is conjugated to the C ring via an α,β -unsaturated carbonyl moiety, and this leads to an increase in the acidity of the 4'-OH group which is responsible, together with the 3'-OH group, for the coordination of the chloride anion in a chelate mode [10].

Anion binding aptitude of the resorcinol moiety (A ring) of quercetin toward the chloride anion is particularly interesting; in this case, in fact, the 5-OH group is "deactivated", due to intramolecular H-bonding with carbonyl group (C=O) [30], and only the 7-OH group remains available to bind the chloride anion. This feature is clearly verifiable in Figure 2 showing the signal of 5-OH practically unaffected throughout the whole titration. To corroborate this behavior, we performed NMR titrations

of quercetin diphenylmethylketal **1a** and of 2',4'-dihydroxyacetophenone **2**—the first compound containing only the binding site related to the resorcinol moiety and the second one having structural similarities with the A ring of quercetin (Figures 4 and 5). The corresponding binding isotherms, depicted in Figure 6, have a very similar appearance; both the hydroxyl protons *ortho* to carbonyl group (5-OH of **1a** and 2'-OH of **2**) remained unaffected during titration, while the signals of the second OH (7-OH of **1a** and 4'-OH of **2**) moved decidedly downfield (this behavior is particularly evident in Figure 5). The signals of the aromatic protons vicinal of the OH groups (6-H and 8-H of **1a** and 3'-H, 5'-H of **2**) moved downfield by nearly the same magnitude for both receptors; these very significant shifts (between 0.27 and 0.38 ppm, respectively) are indicative of the co-presence of Ar-H—chloride hydrogen-bonding interactions. Moreover, the 3-OH group of the receptor **1a** was not significantly perturbed in the $^1\text{H-NMR}$ titration, probably due to an intramolecular hydrogen bond with the carbonyl group, stable enough to withstand the chloride action (Figure 5a).

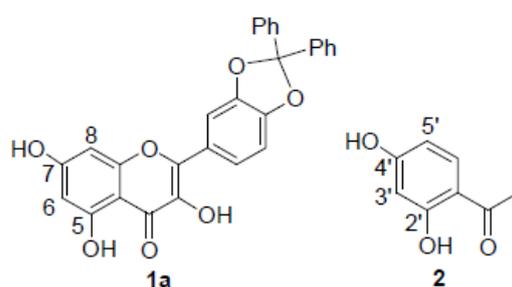


Figure 4. Quercetin diphenylmethylketal **1a** and 2',4'-dihydroxyacetophenone **2**.

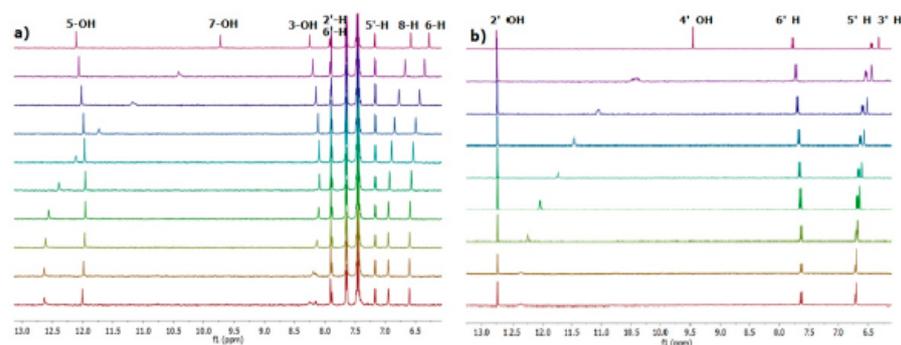


Figure 5. (a) Variations of a portion of $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz) of **1a** (2 mM) during its titration with chloride. The molar fractions of the guest were 0, 0.99, 1.96, 2.91, 3.85, 5.66, 9.09, 23.08, 28.86, and 34.31 from top to bottom. (b) Variations of a portion of $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz) of **2** (2 mM) during its titration with chloride. The molar fractions of the guest were 0, 1.02, 2.02, 2.99, 3.95, 5.83, 9.36, 14.19, and 23.75 from top to bottom.

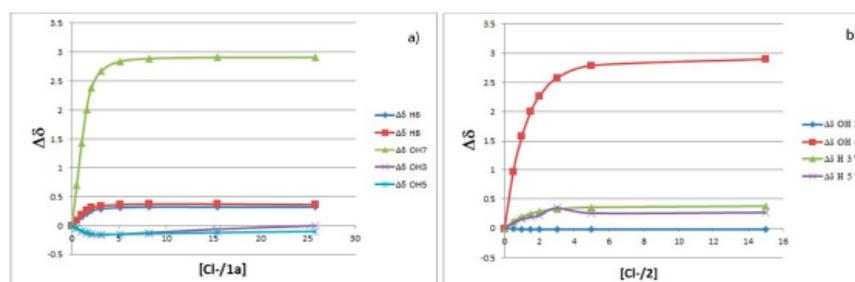


Figure 6. (a) Change in ^1H chemical shifts of 1a with increasing Cl^- concentration. (b) Change in ^1H chemical shifts of 2 with increasing Cl^- concentration. Positive values mean downfield shifts.

Data analysis fitted the 1:1 binding profile and gave a Log K of 3.02 for receptor 1a and of 3.1 for receptor 2.

In order to have a point of reference, binding constants of catechol and resorcinol (2 mM) in deuterated acetone and methyltriethylammonium chloride as titrants were also carried out. The magnitude of these constants, Log K = 3.36 M^{-1} for the catechol and Log K = 2.39 M^{-1} for the resorcinol, were consistent with the results of Smith (in CD_3CN) [10].

It is interesting to note that 1a and 2 were found to be more effective receptors than the resorcinol probably due to a $-M$ mesomeric effect of the carbonyl group engaged in an intramolecular $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{O}$ hydrogen bond that increases the acidity of the *para* OH group, as well as that of the adjacent aromatic protons. Indeed, it was reported that the $\text{pK}_{\text{a}1}$ value for resorcinol is 9.5 [31], while that calculated for 2',4'-dihydroxyacetophenone (2) is significantly lower at 7.9 [32]. A lower pK_{a} value is consistent with a greater capability of acting as hydrogen-bond donors.

The binding attitude of quercetin to bromide was also studied (for details, see Supplementary Materials). As expected [10], the binding strength of quercetin for bromide ($\beta_1 = 1.62 \text{ M}^{-1}$; $\beta_2 = 1.61 \text{ M}^{-1}$) was significantly smaller than that displayed toward chloride (see Table 1). It is interesting to note that catechol moiety showed a significant degree of dimensional selectivity for the chloride and bromide anions ($\beta_1 = 4.59$ vs. 1.62 M^{-1} , respectively), about three orders of magnitude. In the case of the resorcinol moiety, however, the chloride was only bound a factor of ca. 10 stronger than bromide ($\beta_1 = 2.95$ vs. 1.61 M^{-1} , respectively), thus indicating a much lower degree of size selectivity. Similar trend of dimensional selectivity for the chloride and bromide anions, although less pronounced, was also observed for the individual catechol and resorcinol molecules [10].

2.2. ^{13}C -NMR and ESI-MS Binding Studies

We compared the maximum perturbation caused by an excess (25 equiv.) of chloride anion on the ^{13}C -NMR chemical shifts of quercetin, catechol, and 2',4'-dihydroxyacetophenone (20 mM in acetone) (Figure 7). Figure 7a shows that the complexation-induced shifts (CISs) on the B-ring carbons of quercetin and on the carbons of the structurally analogous catechol have a very similar trend; therefore, it can be stated that very similar bond interactions occur between the chloride and each receptor. Similar CISs were also observed for the carbons belonging to the A ring of quercetin and for the analogous carbons of 2',4'-dihydroxyacetophenone (Figure 7b). This indicates that the interactions of the chloride anion with the A ring of the quercetin and the 2',4'-dihydroxyacetophenone are very similar.

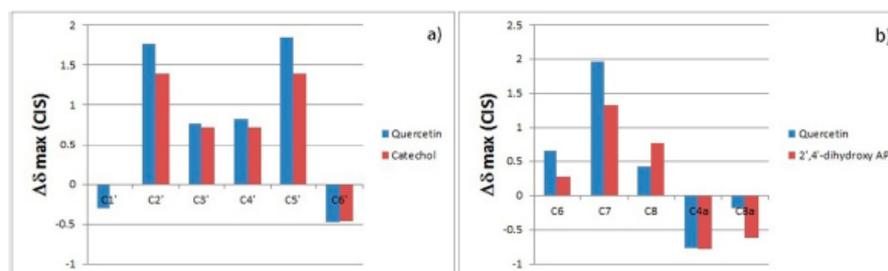


Figure 7. (a) $\Delta\delta_{\max}$ of the carbons of the B ring of quercetin compared with analogous carbons of catechol after addition of an excess of chloride anion. (b) $\Delta\delta_{\max}$ of carbons of the A ring of quercetin compared with analogous carbons of 2',4'-dihydroxyacetophenone after addition of an excess of chloride anions. Positive values mean downfield shifts. All spectra were run at a concentration of 20 mM.

Binding interactions between quercetin and chloride anion were also confirmed by electrospray negative-ion mass spectrometry (ESI-MS) which revealed a peak corresponding to the 1:1 complex ($1 \cdots \text{Cl}^-$) at m/z 337 (25%), and a base peak at m/z 740 relative to the 1:2 complex ($\text{Me}(\text{Octyl})_3\text{N}^+\text{Cl}^- \cdots 1 \cdots \text{Cl}^-$) (See Figure S9, Supplementary Materials).

2.3. Molecular Modeling

The complexes of quercetin with chloride anion were examined using density functional theory (DFT) calculations (for details, see Supplementary Materials). The structure of quercetin was minimized. Then we studied 1:1 chloride complexes, and three relative energy minima were found for each structure in which the chloride anion was positioned at the resorcinol moiety, at the catechol moiety, and at the proximities of the 3-hydroxyl group. The most stable geometry corresponded to the complex where the chloride anion was located at the catechol moiety, predicting 100% of abundance due to the observed difference in energy. The optimized geometry of this minimum is shown in Figure 8a. In the case of 2:1 chloride complexes, a unique minimum with chloride anions located at the resorcinol and catechol moieties was found (Figure 8b). Strong directional interactions were observed between chloride anions and hydroxyl groups in agreement with spectroscopic observations. Non-covalent interaction (NCI) analyses confirmed such interactions as typical green-blue discs featuring strong non-covalent interactions.

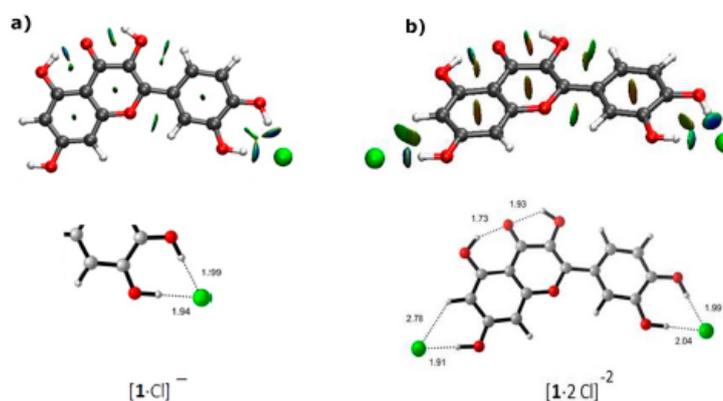


Figure 8. Optimized geometries, showing non-covalent interaction (NCI) surfaces: (a) 1:1 complex of chloride anion with quercetin; (b) 2:1 complex of chloride anion with quercetin. Details are given with distances indicated in ångström.

To study the dynamics of the recognition process, molecular dynamics (MD) simulations were performed with AMBER16 and AMBERTools16. Relevant interaction distances between oxygen atoms and chloride anions were followed during the simulation (Figure 9).

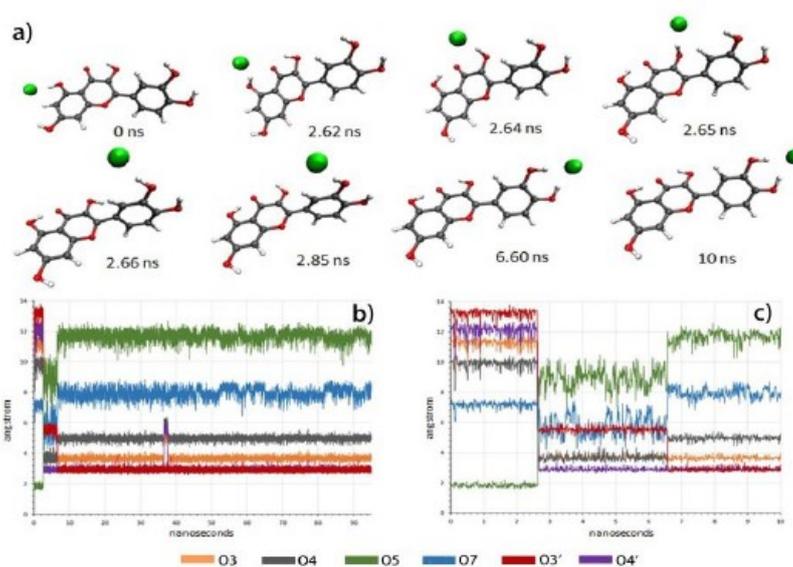


Figure 9. (a,b) Interaction distances between oxygen atoms and chloride anions during the simulation starting from the chloride anion located at the resorcinol moiety; (c) expansion of the first 10 ns of subfigure (b).

When the MD started, considering the complex where the chloride anion was placed at the resorcinol moiety, the system evolved and a snapshot taken after 2.65 ns showed the chloride in the proximity of O3. Further snapshots showed the movement of chloride toward the catechol and, after 6.60 ns, the complex at the catechol was raised. As expected, when the chloride anion was placed at the catechol moiety, it remained in the proximity of O3' and O4', reflecting the stability of the complex. These results clearly established the recognition by the catechol moiety as the most stable, in agreement with experimental observations.

With a second chloride anion, the situation remained completely stable with chloride anions located at resorcinol and catechol moieties (See Figure S12, Supplementary Materials), as predicted by DFT calculations and in good agreement with experimental observations.

3. Materials and Methods

3.1. General Comments

All the reagents and solvents used in this study were bought from commercial sources. The NMR spectra were recorded in acetone-*d*₆ solvent using 5-mm tubes, at 298 K, with a Varian Mercury Plus 400, (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) operating at 400 (¹H) and 100 MHz (¹³C). The chemical shifts were referenced to acetone: δ (H) 2.04 ppm and δ (C) 29.0 ppm. Some ¹³C-NMR spectra were acquired in non-deuterated acetone; in this case, a capillary filled with C₆D₆ (secondary standard [33]) was placed into the 5-mm tube and the sample was locked and shimmed on C₆D₆ contained in the secondary standard, and the chemical shifts were also referenced to C₆D₆: δ (C) 127.6 ppm. ESI mass spectra were obtained using an LCQ Duo (ThermoQuest, San Jose, CA, USA) in negative-ion mode. Instrumental parameters were as follows: capillary voltage −10 V, spray voltage 4.50 kV, mass scan range was from

m/z 100 to 2000 amu, for 30,000 ms of scan time; N_2 was used as sheath gas. The samples were injected into the spectrometer through a syringe pump at a constant flow rate of 8 mL/min.

3.2. 1H -NMR Titration

The following is a typical procedure for 1H -NMR titration: 1 mL of a 2 mM solution of host in undried acetone- d_6 [34] was placed in a 5-mm NMR tube and an initial spectrum was taken. A measured amount of a 100 mM solution of guest (as methyl trioctylammonium salt) in the same solvent was added, changing the molar fraction of guest to about 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 10, 20, and 30. Spectra were recorded after each addition. The chemical shift variation of the host signals was collected and the binding constants β (as Log K) were calculated with the curve-fitting method [35] using the commercial HypNMR2008 [28] program (details are given in Supplementary Materials).

4. Conclusions

In summary, the anion-binding properties of the natural flavonoid quercetin in an organic solvent for chloride anions were studied using spectroscopic (NMR and MS) and computational (DFT and MD) methods.

We demonstrated that quercetin, in the NMR titrations, behaves as a ditopic receptor at the A and B rings; in fact, no significant shifts of the C ring protons occur. It is interesting to note that the affinity of the resorcinol moiety of quercetin and of its diphenylmethylketal derivative **1a** for chloride anions is found to be similar to that of 2',4'-dihydroxyacetophenone **2**, which in turn is greater than that of simple resorcinol. Furthermore, the bond constant obtained for the B ring (catechol moiety) is surprisingly high, about seventeen times greater than the catechol analog. This is probably due to the fact that the B ring of quercetin is conjugated to the C ring via an α,β -unsaturated carbonyl group.

Supplementary Materials: The supplementary materials are available online.

Author Contributions: G.E.: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Visualization; Writing—review & editing. M.L.A.B.: Investigation. O.B.: Project administration; Validation. M.F.: Conceptualization; Writing—original draft. D.R.: Investigation; Resources. I.D.: Formal analysis; Visualization. P.M.: Data curation; Validation; Writing—original draft.

Funding: We gratefully acknowledge the University of Ferrara (fondi FAR) for its financial support.

Acknowledgments: Thanks are also given to P. Formaglio for NMR spectroscopic experiments and to T. Bernardi for mass spectrometric experiments. I.D. and P.M. acknowledge the MINECO and FEDER Program (Madrid, Spain, project CTQ2016-76155-R) and the Gobierno de Aragón (Zaragoza, Spain, Biological & Computational Chemistry Group, E34_R17). The authors thankfully acknowledge the resources from the supercomputers “Memento” and “Cierzo”, and the technical expertise and assistance provided by BIFI-ZCAM (Universidad de Zaragoza, Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References and Notes

1. Gale, P.A.; Howe, E.N.W.; Wu, X. Anion receptor chemistry. *Chem* **2016**, *1*, 351–422. [CrossRef]
2. Gale, P.A.; Garcia-Garrido, S.E.; Garric, J. Anion receptors based on organic frameworks: Highlights from 2005 and 2006. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 151–190. [CrossRef] [PubMed]
3. Oshovsky, G.V.; Reinhoudt, D.N.; Verboom, W. Supramolecular Chemistry in Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2366–2393. [CrossRef] [PubMed]
4. Gunnlaugsson, T.; Glynn, M.; Tocci, G.M.; Kruger, P.E.; Pfeffer, F.M. Anion recognition and sensing in organic and aqueous media using luminescent and colorimetric sensors. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3094–3117. [CrossRef]
5. Sessler, J.L.; Camiolo, S.; Gale, P.A. Pyrrolic and polypyrrolic anion binding agents. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 17–55. [CrossRef]
6. Gale, P.A. Anion receptor chemistry: Highlights from 1999. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *213*, 79–128. [CrossRef]
7. Davis, J.T.; Okunola, O.; Quesada, R. Recent advances in the transmembrane transport of anions. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3843–3862. [CrossRef] [PubMed]

8. Rowe, S.M.; Miller, S.; Sorscher, E.J. Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1992–2001. [[CrossRef](#)]
9. Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Delso, L.; Merino, P. Exploratory spectroscopic and computational studies of the anion binding properties of methyl hyocholate in organic solvent. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 1698–1704. [[CrossRef](#)]
10. Winstanley, K.J.; Sayer, A.M.; Smith, D.K. Anion binding by catechols an NMR, optical and electrochemical study. *Org. Biol. Chem.* **2006**, *4*, 1760–1767. [[CrossRef](#)]
11. Winstanley, K.J.; Smith, D.K. Ortho-substituted catechol derivatives: The effect of intramolecular hydrogen-bonding pathways on chloride anion recognition. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2803–2815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Van Dijk, C.; Driessen, A.; Recourt, K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1593–1600. [[CrossRef](#)]
13. Pawlikowska-Pawlega, B.; Gruszecki, W.L.; Misiak, L.; Paduch, R.; Piersiak, T.; Zarzyka, B.; Pawelec, J.; Gawron, A. Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2195–2204. [[CrossRef](#)]
14. De Souza, R.F.V.; De Giovanni, W.F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.* **2004**, *9*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Naso, L.; Valcarcel, M.; Villacé, P.; Roura-Ferrer, M.; Salado, C.; Ferrer, E.G.; Williams, P.A.M. Specific antitumor activities of natural and oxovanadium (IV) complexed flavonoids in human breast cancer cells. *N. J. Chem.* **2014**, *38*, 2414–2421. [[CrossRef](#)]
16. Parveen, S.; Tabassum, S.; Arjmand, F. Human topoisomerase I mediated cytotoxicity profile of L-valine-quercetin diorganotin (IV) antitumor drug entities. *J. Organomet. Chem.* **2016**, *823*, 23–33. [[CrossRef](#)]
17. Hong, M.; Yin, H.; Zhang, X.; Li, C.; Yue, C.; Cheng, S. Di- and tri-organotin (IV) complexes with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde 5-chloro-2-hydroxybenzoylhydrazone: Synthesis, characterization and in vitro antitumor activities. *J. Organomet. Chem.* **2013**, *724*, 23–31. [[CrossRef](#)]
18. Tabassum, S.; Yadav, S. Investigation of diorganotin (IV) complexes: Synthesis, characterization, in vitro DNA binding studies and cytotoxicity assessment of di-n-butyltin (IV) complex. *Inorg. Chim. Acta* **2014**, *423*, 204–214. [[CrossRef](#)]
19. Tabassum, S.; Zaki, M.; Afzal, M.; Arjmand, F. New modulated design and synthesis of quercetin-CuII/ZnII-Sn2 IV scaffold as anticancer agents: In vitro DNA binding profile, DNA cleavage pathway and Topo-I activity. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 10029–10041. [[CrossRef](#)]
20. Dell'Anna, M.M.; Censi, V.; Carrozzini, B.; Caliandro, R.; Denora, N.; Franco, M.; Veclani, D.; Melchior, A.; Tolazzi, M.; Mastroilli, P. Triphenylphosphane Pt (II) complexes containing biologically active natural polyphenols: Synthesis, crystal structure, molecular modeling and cytotoxic studies. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *163*, 346–361. [[CrossRef](#)]
21. Kaur, C.; Kapoor, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables—The millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2001**, *36*, 703–725. [[CrossRef](#)]
22. Massi, A.; Bortolini, O.; Ragno, D.; Bernardi, T.; Sacchetti, G.; Tacchini, M.; De Risi, C. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. *Molecules* **2017**, *22*, 1270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rice-Evans, C.A.; Miller, J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152–159. [[CrossRef](#)]
24. Harborne, J.B.; Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481–504. [[CrossRef](#)]
25. Zhao, Y.; Ryu, E.-H. Solvent-tunable binding of hydrophilic and hydrophobic guests by amphiphilic molecular baskets. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7585–7591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Berryman, O.B.; Sather, A.C.; Hay, B.P.; Meisner, J.S.; Johnson, D.W. Solution phase measurement of both weak σ and C–H \cdots X– hydrogen bonding interactions in synthetic anion receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10895–10897. [[CrossRef](#)]
27. Charisiadis, P.; Kontogianni, V.G.; Tsiafoulis, C.G.; Tzakos, A.G.; Siskos, M.; Ioannis, P.; Gerothanassis, I.P. $^1\text{H-NMR}$ as a structural and analytical tool of intra- and intermolecular hydrogen bonds of phenol-containing natural products and model compounds. *Molecules* **2014**, *19*, 13643–13682. [[CrossRef](#)]
28. Frassinetti, C.; Ghelli, S.; Gans, P.; Sabatini, A.; Moruzzi, M.S.; Vacca, A. Nuclear magnetic resonance as a tool for determining protonation constants of natural polyprotic bases in solution. *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 374–382. [[CrossRef](#)]

29. Lowe, A.J.; Long, B.M.; Pfeffer, F.M. Examples of regioselective anion recognition among a family of two-, three-, and four-“Armed” bis-, tris-, and tetrakis(thioureido)[n]polynorbornane hosts. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8507–8517. [[CrossRef](#)]
30. Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solven. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *111*, 210–216. [[CrossRef](#)]
31. Herrero-Martinez, J.M.; Sanmartin, M.; Rosés, M.; Bosch, E.; Rafols, C. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1886–1895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (©1994-2018 ACD/Labs.).
33. Lenevich, S.; Distefano, M.D. NMR-based quantification of organic diphosphates. *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 316–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ca. 20–30 eq. of water were present during NMR titrations. (Estimated by integration of the water peak in the deuterated acetone).
35. Fielding, L. Determination of association constants (Ka) from solution NMR data. *Tetrahedron* **2000**, *34*, 6151–6170. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).