

PROGETTO ESPAS

Groupe de Tâche 3: Recherches et analyses pour la définition de Protocols scientifiques d'espèce végétales autochtones à haute valeur nutraceutique et de santé dans la zone de cooperation

Report intermédiaires sur la détermination quali-quantitative des composés bioactifs des espèces

PROGETTO ESPAS

Report. Report intermedio relativo alla determinazione quali-quantitativa di composti bioattivi presenti nelle specie oggetto di studio.

Sub Unità Operativa CREA AN - Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione

Responsabile: Antonio Raffo

Gruppo di lavoro per l'attività 3.2.4:

Irene Baiamonte

Gabriele Lombardi (tesista)

Nicoletta Nardo

Antonio Raffo

INDICE

1. Origano
 - 1.1 Materiali e metodi
 - 1.2 Risultati
2. Asparago
 - 2.1 Materiali e metodi
 - 2.2 Risultati
3. Rosa
 - 3.1 Materiali e metodi
 - 3.2 Risultati

1. ORIGANO.

Lo studio sulla specie Origano è stato incentrato nella caratterizzazione quali-quantitativa di oli essenziali ottenuti da piante di Origano fornite da diverse aziende produttrici situate nella provincia di Agrigento della regione Sicilia. La caratterizzazione è stata condotta mediante analisi GC-MS del profilo dei componenti dell'olio essenziale e mediante GC-MS enantiomerica per determinare l'abbondanza relativa delle coppie di enantiomeri di composti otticamente attivi presenti nel profilo precedentemente caratterizzato.

1.1 Materiali e metodi

Lo studio di caratterizzazione di genotipi locali di Origano è stato effettuato mediante determinazioni quali-quantitative del profilo dei componenti dell'olio essenziale estratto da campioni di origano appartenenti alle due specie *Origanum heracleoticum* e *Origanum vulgare ssp. viridulum X Origanum vulgare ssp. hirtum*, forniti da diverse aziende produttrici presenti nella provincia di Agrigento (AG) e localizzate a diversi gradi di altitudine sul livello del mare, come descritto nella lista seguente.

I. *Origanum heracleoticum*.

- a. Campione "HERAC 1" proveniente da azienda sita a Grotte (AG). Altitudine: 250 mslm
- b. Campione "HERAC 2" proveniente da azienda sita in Contrada S. Rosalia Aragona (AG). Altitudine: 300 mslm
- c. Campione "HERAC 3" proveniente da azienda sita in Contrada Coda di Volpe (AG). Altitudine: 150 mslm
- d. Campione "HERAC 4" proveniente da azienda sita in Contrada Buffa Aragona (AG). Altitudine: 250 mslm
- e. Campione "HERAC 5" proveniente da azienda sita in Contrada Castiglione Aragona (AG). Altitudine: 250 mslm

II. *Origanum vulgare ssp. viridulum X Origanum vulgare ssp. hirtum*.

- a. Campione “CARVA 1” proveniente da azienda sita in Monreale Grotte (AG).
Altitudine: 250 mslm
- b. Campione “CARVA 2” proveniente da azienda Ciulla sita in Aragona (AG).
Altitudine: 300 mslm
- c. Campione “CARVA 3” proveniente da azienda sita in Monreale Grotte (AG).
Altitudine: 200 mslm.

I campioni di origano sono stati disseccati dopo la raccolta, confezionati in busta di plastica e inviati presso il Centro Alimenti e Nutrizione del CREA dove sono state effettuate le determinazioni analitiche.



Figura 1. Campione di Origano nella confezione e durante le operazioni di preparazione del campione per le analisi.

Estrazione dell'olio essenziale

L'estrazione degli oli essenziali è stata effettuata in accordo con il metodo denominato "2.8.12. Essential oils in herbal drugs" riportato nella European Pharmacopoeia, 8^a Edizione (The European Pharmacopoeia, 2014).

La procedura impiegata prevedeva una estrazione, effettuata con un apparato di Clevenger per distillazione di oli essenziali, di 20 g di foglie e fiori prelevate dai campioni di origano disseccati dopo la raccolta e conservati in buste di plastica (**Figura 1**). L'aliquota di foglie e fiori di origano era posta in estrazione insieme a 500 mL di acqua deionizzata per un tempo complessivo di 3 h di distillazione (**Figura 2**). Al termine della distillazione, dopo il raffreddamento dell'apparato di distillazione, l'olio veniva raccolto dopo averne misurato il volume mediante il tubo di raccolta graduato presente nell'apparato di distillazione stesso. L'olio raccolto veniva, quindi, disidratato mediante passaggio su Na_2SO_4 e posto in conservazione refrigerata a -24°C , fino al momento delle analisi GC-MS.



Figura 2. Metodo di estrazione degli oli essenziali con strumentazione Clevenger

Analisi della composizione chimica degli oli essenziali mediante GC-MS

Prima delle analisi GC-MS gli oli essenziali ottenuti sono stati diluiti in proporzione 1:20, prelevando 25 μL di olio essenziale e aggiungendovi 500 μL di metanolo.

Le analisi GC-MS sono state effettuate su un sistema Agilent 6890 GC 5973 N MS equipaggiato con un filtro di massa a quadrupolo come rivelatore di spettri di massa (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

La separazione cromatografica è stata effettuata su una colonna DB1-MS (0.25 mm diametro interno \times 60 m, 0.5 μm spessore del film; J&W, Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Le condizioni di cromatografia hanno seguito il seguente schema:

- I. Rapporto di splittaggio: 50:1
- II. Temperatura dell'iniettore: 250 $^{\circ}\text{C}$
- III. Programma di temperatura del forno: da 60 $^{\circ}\text{C}$ a 200 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, poi a 280 $^{\circ}\text{C}$ a 50 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$
- IV. Flusso del gas vettore (He): 1.5 mL min^{-1} , corrispondente a una velocità di 32 cm sec^{-1}

I parametri operativi del rivelatore di spettri di massa erano i seguenti:

- I. Metodo di ionizzazione: impatto elettronico a 70 eV
- II. Temperatura della linea di trasferimento: 300 $^{\circ}\text{C}$
- III. Temperatura della sorgente di elettroni: 230 $^{\circ}\text{C}$
- IV. Temperatura del quadrupolo: 150 $^{\circ}\text{C}$
- V. Modalità di acquisizione del segnale: full-scan mode nell'intervallo pari a 33-300 amu

L'identificazione dei componenti degli oli essenziali è stata effettuata comparando gli indici di ritenzione lineare (LRI) e gli spettri di massa dei picchi cromatografici in uscita dalla colonna con quelli di standard puri, ove disponibili (provenienti da Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Negli altri casi sono stati comparati con quelli disponibili nei database NIST Chemistry WebBook e dati pubblicati in letteratura (Babushok et al., 2011), per quanto riguarda gli indici di ritenzione lineari, e NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library 2005, per quanto concerne gli spettri di massa. Gli indici di ritenzione lineare dei picchi cromatografici sono stati determinati attraverso l'analisi, in condizioni identiche, di una soluzione standard di alcani C7-C30 e applicando l'equazione proposta da Van den Dool e Kratz.

Equazione di Van den Dool e Kratz:

$$LRI = 100 n + 100 \times \frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n}$$

- LRI = Indice di ritenzione lineare,
- n = Numero di atomi di carbonio dell'alcano eluito immediatamente prima del picco cromatografico,
- T_x = Tempo di ritenzione del picco cromatografico,
- T_n = Tempo di ritenzione dell'alcano con n atomi di carbonio,
- T_{n+1} = Tempo di ritenzione dell'alcano con n+1 atomi di carbonio.

Per valutare il contenuto di ciascun componente degli oli essenziali espresso come valore percentuale, è stata calcolata una misura dell'area del picco normalizzata, considerando il 100% la somma delle aree di tutti i picchi cromatografici dell'olio essenziale. Il contenuto percentuale è stato determinato sui dati medi delle corse GC effettuate in duplicato, una seguente all'altra, e alle medesime condizioni, dello stesso campione diluito. L'integrazione dei picchi è stata fatta automaticamente dal software e i parametri sono stati scelti in modo che risultassero integrati tutti i picchi la cui area corrispondeva a una percentuale del totale superiore allo 0.1 %.

Analisi della abbondanza relativa degli enantiomeri mediante ES-GC-MS

Per le analisi enantioselettive degli oli essenziali sono stati impiegati gli stessi campioni diluiti già impiegati nelle determinazioni con colonna achirale.

Le analisi ES-GC-MS sono state effettuate su un sistema Agilent 6890 GC 5973 N MS equipaggiato con un filtro di massa a quadrupolo come rivelatore di spettri di massa (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

La separazione cromatografica enantioselettiva è stata effettuata su una colonna chirale Cyclosil-B (0.25 mm diametro interno × 30 m, 0.25 µm spessore del film; fase stazionaria: 30% Heptakis (2,3-di-O-methyl-6-O-t-butyl dimethylsilyl)-β-cyclodextrin in DB-1701; J&W, Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Le condizioni di cromatografia hanno seguito il seguente schema:

- I. Rapporto di splittaggio: 50:1
- II. Temperatura dell'iniettore: 240 °C

III. Programma di temperatura del forno: da 55 °C (per 2 min) a 190 °C a 4 °C min⁻¹, poi a 220 °C a 20 °C min⁻¹

Flusso del gas vettore (He): 1.5 mL min⁻¹, corrispondente a una velocità di 45 cm sec⁻¹

I parametri operativi del rivelatore di spettri di massa erano i seguenti:

- I. Metodo di ionizzazione: impatto elettronico a 70 eV
- II. Temperatura della linea di trasferimento: 240 °C
- III. Temperatura della sorgente di elettroni: 230 °C
- IV. Temperatura del quadrupolo: 150 °C
- V. Modalità di acquisizione del segnale: full-scan mode nell'intervallo pari a 33-300 amu

L'identificazione delle forme dei composti otticamente attivi degli oli essenziali è stata effettuata comparando gli indici di ritenzione lineare (LRI) e gli spettri di massa dei picchi cromatografici in uscita dalla colonna con quelli di standard puri, ove disponibili (acquistati presso Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Negli altri casi sono stati comparati con quelli disponibili nei database NIST Chemistry WebBook e dati pubblicati in letteratura (Liberto et al. 2008; Babushok et al. 2011), oltre che a dati gentilmente forniti dalla prof. Rubiolo (comunicazione personale) per quanto riguarda gli indici di ritenzione lineari, e NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library 2005, per quanto concerne gli spettri di massa. Gli indici di ritenzione lineare dei picchi cromatografici sono stati determinati attraverso l'analisi, in condizioni identiche, di una soluzione standard di alcani C7-C30 e applicando l'equazione proposta da Van den Dool e Kratz.

L'attenzione in questo caso è stata rivolta esclusivamente nei confronti di molecole otticamente attive, che erano già state identificate su colonna DB1-MS e che, di conseguenza, avrebbero potuto essere separate nei loro enantiomeri dalla colonna chirale. Per migliorare la separazione e l'identificazione si è selezionata per il rivelatore di massa la modalità "ione estratto" a valori tipici delle sostanze ricercate, per facilitare la lettura del cromatogramma. Il calcolo delle abbondanze relative è stato effettuato misurando l'area dei picchi (normalizzata, dove il 100% corrispondeva alla somma delle aree dei due enantiomeri, e basata sui dati medi delle corse GC effettuate in duplicato, una seguente all'altra, e alle medesime condizioni, dello stesso campione diluito) corrispondenti ai due enantiomeri selezionati manualmente.

Metodi di analisi statistica

I dati di composizione, come specificato sopra, sono stati espressi come contenuto percentuale dell'olio essenziale e sono stati ottenuti come valori medi di due determinazioni cromatografiche successive. I dati singoli, non mediati, sono stati sottoposti ad una analisi ANOVA al fine di verificare l'esistenza di differenze statisticamente significative all'interno del dataset considerato nel contenuto dei singoli componenti. Al test ANOVA è stato associato anche un test di confronti multipli di Tukey. Prima di effettuare queste analisi i dati originari sono stati trasformati in valori frazionari e, quindi, attraverso la funzione arcsin.

I singoli dataset formati dai valori mediati sulle due corse cromatografiche, e trasformati mediante la funzione arcsin, sono stati sottoposti ad Analisi delle Componenti Principali (PCA). Tutte le elaborazioni sono state effettuate mediante la piattaforma software di analisi statistica XLStat (ver. 2020.01.01; Addinsoft, New York, NY).

1.2 Risultati

Nai campioni di olio essenziale di origano valutati sono stati rivelati in totale 36 differenti composti, ad un contenuto percentuale superiore allo 0.1% dell'olio stesso (**Tabella 1**). Di questi 28 sono stati identificati con un sufficiente grado di confidenza, mentre 8 rimangono non assegnati. In 3 casi si osserva la coeluzione di due o più composti non separati dalla colonna.

	Composto	RIx	RIx da letteratura	MS Match
1	α -Thujene	925	916-938*	897
2	α -Pinene	933	910-946	942
3	1-Octen-3-ol	961	960-982	901
4	3-Octanone	964	962-967	913
5	unknown 968	968		
6	β -Pinene	974	957-983	958
7	β -Myrcene + unknown	982	956-978	870
8	α -Phellandrene	1000	989-1008	873
9	α -Terpinene	1011	1001-1021	902
10	p-Cymene	1014	1002-1036	950
11	1,8-Cineole	1023	1011-1039	913

12	trans- β -Ocimene	1026	1026-1060	904
13	cis- β -Ocimene	1037	1027-1050*	920
14	γ -Terpinene	1050	1031-1066	913
15	unknown 1055	1055		
16	Terpinolene	1081	1065-1093	933
17	Linalool + unknown	1084	1062-1135	871
18	Borneol	1152	1137-1165	920
19	4-Terpineol	1165	1125-1189	848
20	p-isopropyl benzaldehyde + thymol methyl ether	1215	1195 / 1213-1219	882
21	unknown 1259	1259		
22	Thymol	1267	1253-1287	922
23	Carvacrol	1282	1278-1297	939
24	β -Caryophyllene	1423	1391-1429	941
25	α -Humulene	1456	1430-1466*	889
26	τ -Murolene	1474	1455-1502* (forme α e γ)	892
27	unknown 1481			
28	Varidiflorene	1496	<i>no data</i>	860
29	β -Bisabolene	1503	1491-1511	930
30	τ -Cadinene	1511	1490-1542* (forme α , δ e γ)	877
31	β -Cadinene	1518	1490-1542* (forme α , δ e γ)	900
32	unknown 1569	1569		
33	unknown 1572	1572		

* dati da: Babushok et al. 2011

Tabella 1. Identificazione dei composti nei campioni di olio essenziale di origano.

Tra i composti identificati 11 appartenevano al gruppo dei monoterpeni idrocarburi, 4 a quello dei monoterpeni ossigenati, 7 a quello dei sesquiterpeni, 3 a quello dei composti fenolici, 3 ad altri gruppi.

Dall'osservazione dei dati relativi ai campioni di origano analizzati possiamo immediatamente fare alcune considerazioni (**Tabella 2**). Innanzitutto, come ci si aspettava, si ha una importante

differenza tra i campioni CARVA e HERAC in termini di concentrazione di carvacrolo (componente principale dei campioni CARVA 1, CARVA 2 e CARVA3) e timolo (componente principale dei campioni HERAC 1, HERAC 2, HERAC 3, HERAC 4 e HERAC 5). Si nota che nei campioni tipo-carvacrolo il componente maggioritario rappresenta oltre l'80 % del totale, mentre nei campioni HERAC il timolo raggiunge al massimo il 65,5 %. Oltre alla macroscopica differenza sul componente maggioritario, altre considerazioni utili a differenziare le due varietà di origano possono essere fatte. Innanzitutto, si nota che i campioni CARVA presentano un minor numero di composti (19) rispetto ai campioni HERAC (31). Il secondo composto maggiormente presente in entrambi i gruppi risulta essere il γ -terpinene, le concentrazioni però sono decisamente più elevate nei campioni HERAC. Lo stesso vale per il terzo componente principale: il p-cimene.

	CARVA 1	CARVA 2	CARVA 3	HERAC 1	HERAC 2	HERAC 3	HERAC 4	HERAC 5
α -Thujene	0,7	0,8	0,8	1,0	0,7	1,2	0,8	0,4
α -Pinene	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5	0,3	0,2
1-Octen-3-ol	0,1	0,2	0,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3-Octanone	0,1	0,1	0,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
unknown 968	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,1	N.D.	N.D.
β -Pinene	0,1	0,1	0,1	0,1	N.D.	0,1	N.D.	N.D.
β -Myrcene + unknown	1,2	1,2	1,2	1,6	1,2	1,8	1,4	1,0
α -Phellandrene	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1
α -Terpinene	1,1	1,2	1,4	3,5	2,5	3,9	2,9	2,2
p-Cymene	2,6	2,7	2,6	4,8	4,1	5,2	4,6	3,6
1,8-Cineole	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3
trans- β -Ocimene	N.D.	N.D.	N.D.	1,4	1,3	1,9	1,4	1,6
cis- β -Ocimene	N.D.	N.D.	N.D.	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
γ -Terpinene	5,3	6,3	7,1	18,0	13,2	22,1	15,9	17,0
unknown 1055	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
Terpinolene	N.D.	N.D.	N.D.	0,1	N.D.	0,1	N.D.	N.D.
Linalool + unknown	N.D.	N.D.	N.D.	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4
Borneol	N.D.	0,1	N.D.	N.D.	0,4	N.D.	N.D.	N.D.
4-Terpineol	0,3	0,4	0,3	0,6	N.D.	0,6	0,5	0,4
p-isopropyl benzaldehyde + thymol methyl ether	N.D.	N.D.	N.D.	0,7	0,9	1,3	1,1	2,1
unknown 1259	N.D.	N.D.	N.D.	4,2	3,5	4,6	3,8	3,5
Thymol	0,1	3,2	1,7	56,2	65,5	47,3	61,4	59,4
Carvacrol	84,7	80,6	81,3	0,9	0,7	1,3	0,9	0,5
β -Caryophyllene	2,4	1,9	2,1	1,2	1,1	1,5	1,0	1,8
α -Caryophyllene	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	N.D.	0,1
τ -Muurolene	N.D.	N.D.	N.D.	0,1	0,1	N.D.	N.D.	0,1

unknown 1481	N.D.	N.D.	N.D.	1,5	1,4	2,3	1,2	2,2
Varidiflorene	N.D.	N.D.	N.D.	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
β -Bisabolene	0,1	0,2	0,2	1,3	1,2	1,5	1,0	1,6
τ -Cadinene	N.D.	N.D.	N.D.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
β -Cadinene	N.D.	N.D.	N.D.	0,5	0,4	0,4	0,3	0,5
unknown 1569	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,1
unknown 1572	N.D.	N.D.	N.D.	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2

Tabella 2. Composizione dei campioni di olio essenziale di origano: dati in percentuale del contenuto totale.

I risultati di una analisi delle Componenti Principali (PCA), effettuata sul dataset di composizione dei campioni di olio essenziale sono riportati nella **Figura 3**. La variabilità del sistema spiegata dalle prime due componenti principali risulta essere del 83,67 %. La prima componente principale spiega il 61,79 % della variabilità totale. Questa è strettamente correlata alle variabili timolo e carvacrolo, ma anche a tante altre variabili. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i campioni HERAC presentavano una composizione molto più complessa rispetto a CARVA che avevano meno composti. La seconda componente principale spiega il 21,88 % della variabilità del sistema. I vari campioni possono essere raggruppati con successo in due gruppi lungo la prima componente principale. A un estremo troviamo i 3 campioni CARVA 1, CARVA 2 e CARVA 3 (ricchi in carvacrolo e poveri in timolo) e all'altro i campioni HERAC 1, HERAC 2, HERAC 3, HERAC 4 e HERAC 5 (ricchi in timolo e poveri in carvacrolo). La distanza minima tra i campioni CARVA ci suggerisce che questi si differenziano pochissimo uno dall'altro. Nel caso dei campioni HERAC invece abbiamo sicuramente una maggiore variabilità intraspecifica nella composizione dell'olio essenziale lungo la seconda componente principale. Questa ci suggerisce che i campioni HERAC 5 e HERAC 3 sono i più diversi all'interno del chemiogrupo tipo-timolo.

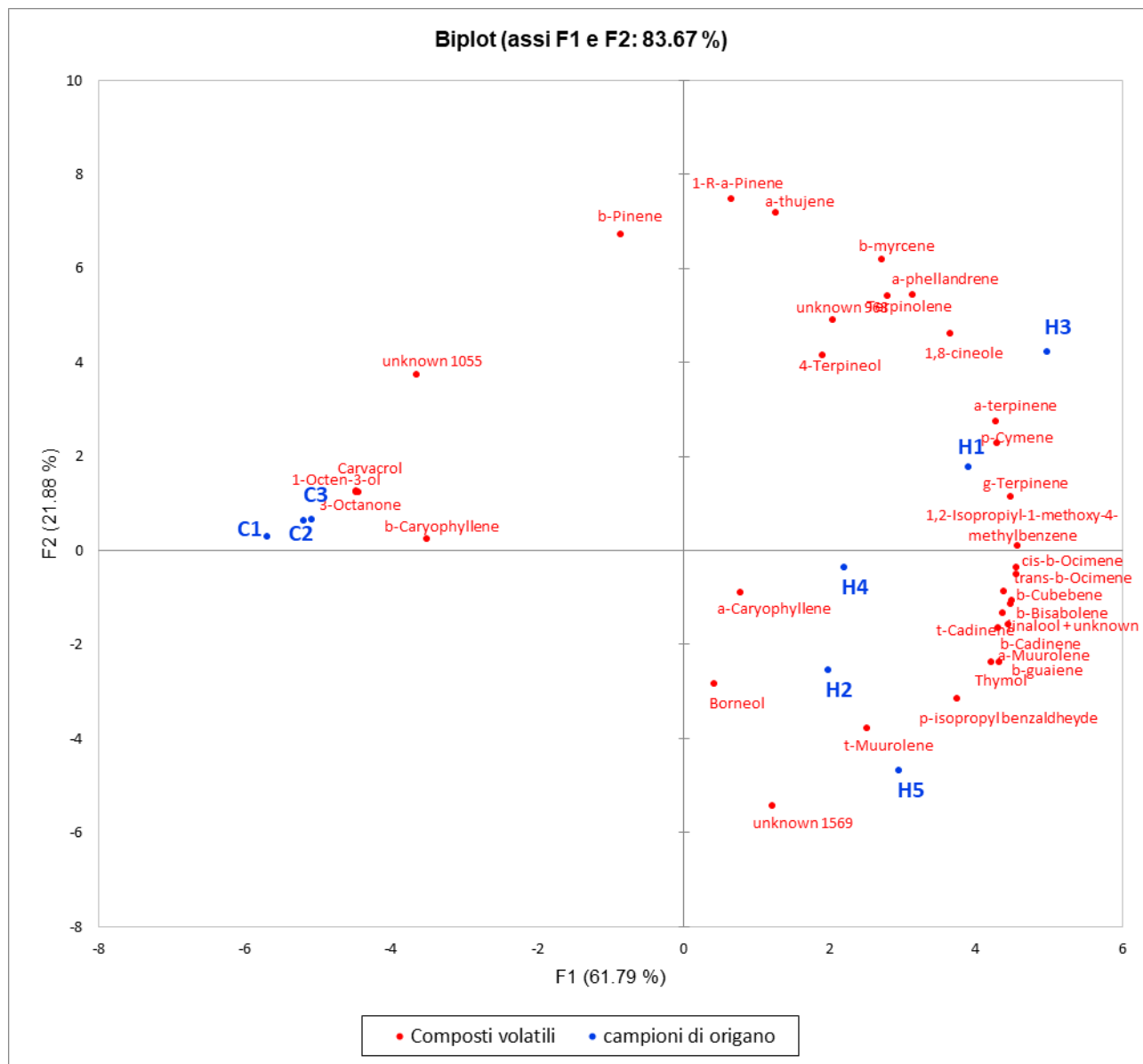


Figura 3. PCA dei dati di composizione degli oli essenziali. Prime due componenti principali.

Analisi della composizione enantiomerica.

All'interno dei composti determinati sono stati individuati composti otticamente dei quali è stata rilevata la presenza di entrambi gli enantiomeri. In nessun caso è stato notato un eccesso enantiomerico diverso da un campione all'altro (**Tabella 3**). Anche il rapporto tra i due enantiomeri risulta simile in tutti i campioni per tutti i composti indagati.

		CARVA 1	CARVA 2	CARVA 3	HERAC 1	HERAC 2	HERAC 3	HERAC 4	HERAC 5
α -Pinene	S	6	7	6	3	5	4	4	3
	R	94	93	94	97	95	96	96	97
β -Pinene	+	79	79	81	79	79	84	84	tracce
	-	21	21	19	21	21	16	16	
Camphor	S	100	100	N.D.	99	N.D.	N.D.	100	100
	R	0	0	N.D.	1	N.D.	N.D.	0	0
4-Terpineol *	I	58	59	58	63	62	61	63	62
	II	42	41	42	37	38	39	37	38
α -Terpineol *	I	0	0	0	0	0	0	0	tracce
	II	100	100	100	100	100	100	100	

* forma non assegnata in attesa di standard. L'ordine è quello di eluizione.

Tabella 3. Composizione enantiomerica per cinque composti dell'olio essenziale di origano otticamente attivi.

BIBLIOGRAFIA

Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4), 043101. <https://doi.org/10.1063/1.3653552>

Liberto, E., Cagliero, C., Sgorbini, B., Bicchi, C., Sciarrone, D., Zellner, B. D., Mondello, L., & Rubiolo, P. (2008). Enantiomer identification in the flavour and fragrance fields by “interactive” combination of linear retention indices from enantioselective gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1195(1–2), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.045>

The European Pharmacopoeia, 2014. The European Pharmacopoeia, 8th edition on line. 2.8.12. Essential oils in herbal drugs. (<https://www.webofpharma.com/2021/02/european-pharmacopoeia-8th-edition-pdf.html>)

2. ASPARAGO

Nell'ambito del progetto ESPAS è stata effettuata una caratterizzazione quali-quantitativa di alcune classi di composti bioattivi in campioni di genotipi autoctoni di Asparago. Le classi di composti bioattivi in studio rappresentano componenti di interesse nutraceutico, con potenziali impieghi a fini industriali in diversi settori (alimentare, farmaceutico, cosmetico etc.).

2.1 Materiali e metodi

Su due specie autoctone di asparago (*Asparagus Albus L.* e *Asparagus acutifolius L.*) è stato studiato l'effetto del genotipo sulla composizione in flavonoidi e saponine al fine di identificare la specie di maggior interesse per applicazioni di tipo nutraceutico. A tal proposito è stata effettuata una caratterizzazione biochimica dei composti bioattivi presenti nelle varie parti della pianta (apice e radice). I composti bioattivi determinati appartengono alla classe dei flavonoidi (rutina e quercitina) e delle saponine (protodioscina e protodiogenina). I campioni di asparago sono stati divisi per lunghezza (**fig. 1**) e poi tagliati in tre parti e, per la liofilizzazione (**fig. 2 e 3**), sono state prese solo le parti della radice e dell'apice dove sono presenti principalmente i composti di interesse.



Figura 1



Figura 2



Figura 3

Determinazione dei flavonoidi.

Circa 0.2 grammi di campione liofilizzato sono stati estratti con 4 mL di metanolo acidificato con lo 0,1% di acido cloridrico (secondo il metodo di Eichholz et al. 2012). Il campione viene agitato per 15 minuti con magnetino e successivamente centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti. Il surnatante viene raccolto in un matraccio da 10 mL e la polvere viene estratta per altre due volte. I surnatanti raccolti vengono portati a un volume finale di 10 mL con metanolo acidificato. Per ottenere un

estratto più concentrato si prelevano 2 mL di estratto, si portano a secco con azoto e si riprendono con 1 mL di metanolo per HPLC. Le analisi sono state effettuate in quadruplo e i campioni sono stati filtrati con filtri a siringa da 0.45 µm prima di essere iniettati. Le determinazioni sono condotte mediante un sistema HPLC Serie Hp 1100 Agilent dotato di rivelatore “diode array”. La colonna utilizzata è una Synergi 4µ Hydro RP80A 250x4.6 Phenomenex con Security Guard Phenomenex AQ C18 4x3.0mm. La colonna è termostata a 30°C; il flusso è 1mL/min e il volume iniettato è di 10 µL. La fase mobile utilizzata è composta da una soluzione A (H₂O/ ac.acetico /acetonitrile (94.5% / 0.5% / 5% v/v) e una soluzione B (Acetonitrile / ac.acetico (95% / 5% v/v) secondo il seguente gradiente: 0-5 min 0%B; 5-9 min 0-4% B; 9-15 min 4% B; 15-30 min 4-8% B; 30-45 min 8-30% B; 45-50 min 30-35% B; 50-55 min 35-50% B; 55-60 50-55% B. La lettura spettrofotometrica per la quercetina, la rutina e l'isoramnetina è stata effettuata a 370 nm; per il Kamferolo a 325nm. Il riconoscimento dei composti è stato possibile grazie all'utilizzo di standard puri.

2.2 Risultati

L'asparago (*Asparagus Officinalis L.*) è una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Asparagaceae, è originaria del Mediterraneo orientale e dell'Asia Minore e attualmente si coltiva in molte parti del mondo (Stati Uniti, Italia, Germania, Canada). E' un ortaggio ricco di componenti funzionali, è una buona fonte di minerali essenziali, vitamine, minerali e fibre ed è ricco in antiossidanti. I maggiori componenti che sono responsabili della bioattività dell'asparago sono i composti fenolici, appartenenti in particolare al gruppo dei flavonoidi (quercetina, kamferolo, rutina). Dalla letteratura la prima cosa che si evidenzia è che il contenuto fenolico negli asparagi è fortemente influenzato dalla specie, dalla cultivar, così come dalla parte della pianta che viene analizzata e dalle condizioni ambientali (suolo, umidità e temperatura). I dati da noi ottenuti confermano quanto trovato in letteratura. Per quanto riguarda la variabilità tra le specie possiamo dire che tra le due specie di asparago analizzate vediamo come *Asparagus acutifolius L.* ha una composizione fenolica maggiormente differenziata rispetto ad *Asparagus albus L.*, in quanto caratterizzato da un numero più elevato di componenti presenti in misura significativa. *Asparagus albus L.*, è caratterizzato da un contenuto totale di flavonoidi più elevato rispetto ad *Asparagus acutifolius L.*, in virtù di un contenuto particolarmente elevato di rutina. La rutina, come anche gli altri flavonoidi, sono presenti in quantità diverse nelle varie parti della pianta; i dati riportati in

letteratura evidenziano come i flavonoidi siano presenti prevalentemente nella parte apicale della pianta (5.30 g/kg nelle foglie e 1.73 g/kg nella radice, secondo Hamdi et al. 2017) e i nostri valori sono simili a quelli che si ritrovano in letteratura. In *Asparagus albus L.* troviamo valori di rutina pari a 9.25 mg/g nell'apice e valori più bassi nella radice 5.49 mg/g; in *Asparagus acutifolius L.* il contenuto di rutina nell'apice della pianta è pari a 1.84 mg/g mentre nella radice il quantitativo è più basso, 1.16 mg/g.

Tabella 1: Contenuto dei flavonoidi in Asparago (espressi in mg/g di campione liofilizzato)

	<i>Asparagus albus L.</i>		<i>Asparagus acutifolius L.</i>	
	Apice	Radice	Apice	Radice
Kampherolo mg/g	0.70 ±0.10	0.35 ±0.01	1.07 ±0.16	0.62 ±0.04
Rutina mg/g	9.25 ±1.09	5.49 ±0.17	1.84 ±0.09	1.16 ±0.08
Derivati della Rutina* mg/g	-	-	2.48 ±0.12	1.52 ±0.07
Quercetina mg/g	tr	tr	2.63 ±0.17	1.60 ±0.06
Isoramnetina mg/g	0.72 ±0.19	1.23 ±0.03	1.42 ±0.12	0.90 ±0.05

* picco attribuito ad un derivato dalla rutina, quindi, quantificato con standard della rutina

BIBLIOGRAFIA

Ines Eichholz , Sascha Rohn , Antje Gamm , Nina Beesk , Werner B. Herppich , Lothar W. Kroh , Christian Ulrichs , Susanne Huyskens-Keil. "UV-B-mediated flavonoid synthesis in white asparagus (*Asparagus officinalis L.*)", Food Research International 48 (2012) 196-201.

Qingbin Guoa, Nifei Wanga , Huanhuan Liua , Zhenjing Lia , Laifeng Lua , Changlu Wanga, "The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis L.* – A review" Journal of Functional Foods 65 (2020) 103727 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103727>)

Satoru Motoki, Higashimita, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa Tianli Tang, Takumi Taguchi, and Ayaka Kato Hiromi Ikeura, Tomoo Maeda, “Distribution of Rutin and Protodioscin in Different Tissue Parts of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) HORTSCIENCE 54(11):1921–1924. 2019. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14131-19>

Amel Hamdia, Sara Jaramillo-Carmona, Raja Srairi Bejic, Rabeb Teja, Sonia Zaouia, Rocío Rodríguez-Arcos, Ana Jiménez-Araujo, Mounir Kasria, Mokhtar Lachaala, Najoua Karray Bouraouia, Rafael Guillén-Bejarano “The phytochemical and bioactivity profiles of wild *Asparagus albus* L. plant” Food Research International 99 (2017) 720–729 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.027>

Eun Jin Lee, Kil Sun Yoo, and Bhimanagouda S. Patil “Development of a Rapid HPLC-UV Method for Simultaneous Quantification of Protodioscin and Rutin in White and Green Asparagus Spears” Journal of Food Science Vol. 75, Nr. 9, 2010 doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01824.x

3. ROSA

Anche nel caso dello studio relativo alla specie Rosa è stata effettuata una caratterizzazione qualitativa di alcune classi di composti bioattivi di interesse nutraceutico, in vista di potenziali applicazioni in diversi settori (alimentare, farmaceutico, cosmetico etc.).

3.1 Materiali e metodi

Su cinque specie di rosa (*Rosa Micrantha*, *Rosa Canina*, *Rosa Rugosa*, *Rosa Corymbifera*, *Rosa Rubiginosa*) è stata effettuata una caratterizzazione biochimica delle bacche (cinorrodi) mediante determinazione quantitativa di acido ascorbico, composti fenolici e carotenoidi.

Tutte le determinazioni sono state effettuate utilizzando metodi di estrazione liquido-liquido e gli estratti così ottenuti sono stati analizzati mediante HPLC-DAD.

I campioni di cinorrodi sono arrivati in laboratorio freschi e come tali sono stati utilizzati per la determinazione dell'acido ascorbico. In seguito, i campioni freschi sono stati liofilizzati e successivamente macinati per essere sottoposti alla determinazione dei carotenoidi e dei composti fenolici.

Determinazione della vitamina C.

Circa 2 grammi di campioni freschi di cinorrodi, privati dei semi (**fig. 1 e 2**), sono stati estratti con acido metafosforico all'1.5% con aggiunta di EDTA (secondo il metodo di Tarrago-Trani et al. 2012 con piccole modifiche). Vengono fatte due pesate e ad un campione si aggiungono 8 mL di soluzione estraente con riducente (acido metafosforico 1,5%+ EDTA, 0.1mg/mL +TCEP 5mM), all'altro vengono aggiunti 8 mL di soluzione estraente senza riducente (acido metafosforico 1.5% + EDTA 0.1 mg/ml). I campioni vengono omogeneizzati con Ultra Turrax per 4 minuti a bassa velocità (velocità gialla) con ghiaccio, e successivamente centrifugati a 14000 rpm a 10°C per 15 minuti. I surnatanti vengono raccolti in boccioni di vetro e conservati in frigorifero. L'estrazione dei campioni viene fatta per altre due volte, prima aggiungendo nei rispettivi pellet 4 mL di soluzione estraente/riducente con successiva centrifuga e poi aggiungendo nei rispettivi pellet 12 mL di soluzione estraente/riducente con successiva centrifuga. I surnatanti raccolti vengono filtrati con filtri a siringa da 0.45µm prima di essere iniettati (**fig. 3 e 4** alcune fasi di estrazione del campione). Le determinazioni sono condotte mediante un sistema HPLC Serie Hp 1100 Agilent dotato di rivelatore "diode array". La colonna utilizzata è una Synergi 4u Fusion-RP60A 150x4.6mm con

Security Guard Cartridges AQ C18 4x30mm. La colonna è termostata a 30°C; flusso 0.8 mL/min; volume iniettato 10 µL. La fase mobile utilizzata è composta da acido metafosforico 0.02% (w/v) pH 3.5 (corretto con KOH) filtrata con Millipore. La lettura spettrofotometrica è a 240 nm e la quantificazione dell'acido ascorbico è stata effettuata con calibrazione con standard puro di acido ascorbico.



Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4

Determinazione composti fenolici.

Circa 2.5 grammi di campione liofilizzato sono stati estratti con 5 mL di metanolo acidificato con lo 0.1% di acido cloridrico (secondo il metodo di Brigita Medveckiene et al., 2021). Il campione viene sottoposto ad agitazione con magnetino per 20 minuti, in bagno ad ultrasuoni per altri 20 minuti e,

infine, viene centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il surnatante viene raccolto in un matraccio da 10 mL e la polvere rimasta viene sottoposta ad una seconda estrazione. I surnatanti raccolti vengono portati ad un volume finale di 10 mL utilizzando metanolo e successivamente filtrati con filtri a siringa da 0.45 µm. Per concentrare il campione si prelevano 5 mL di estratto, si portano a secco con azoto e si riprendono in 1 mL di metanolo per HPLC e si inietta.

Le determinazioni condotte in triplo sono effettuate mediante un sistema HPLC Serie Hp 1100 Agilent dotato di rivelatore “diode array” e la colonna utilizzata è una Synergi 4 µm Polar-RP80 A° 150x4.6mm con Security Guard Polar RP 4x3 m. La colonna è termostata a 30°C; flusso a 0.75 mL/min; volume di iniezione 10 µL.

La fase mobile utilizzata è composta da una soluzione A (H₂O con 0.01M di H₃PO₄) e una soluzione B (Metanolo 0.01M H₃PO₄) secondo il seguente gradiente: 0-15 min 25%B; 15-30 min 75%B; 30-40 min 80%B; 50-52 min 25%B; 52-60 min 25%B (per le condizioni cromatografiche Baiamonte et al., 2014).

La lettura spettrofotometrica è stata effettuata a 280-320-360 nm e per la quantificazione dei composti è stata utilizzata una calibrazione con standard puri.

Determinazione dei carotenoidi.

Ad 1 grammo circa di campione liofilizzato vengono aggiunti 500 mg di carbonato di calcio e vengono estratti con 20 mL di tetraidrofurano e metanolo 1:1 (THF/MetOH 1:1), addizionati con lo 0.1% di BHT (utilizzato per stabilizzare la soluzione). Il campione (secondo il metodo di Ahlam et al. 2018 con piccole modifiche) viene agitato con magnetino per 30 minuti, il surnatante viene raccolto in boccioni scuri e conservato in frigo. L'estrazione viene ripetuta 3 volte, finché il surnatante non sarà incolore. Successivamente i surnatanti vengono filtrati raccolti in buchner sottovuoto ed il filtrato viene evaporato con evaporatore rotante ad una temperatura di 30/35°C fino ad un volume di circa 1 mL. L'estratto viene ripreso in 5 mL di soluzione estraente THF/MetOH (1:1), addizionato con lo 0.1% di BHT (per stabilizzare la soluzione). Il campione viene filtrato con filtri a siringa da 0.45µm prima di essere iniettato.

Le determinazioni condotte in doppio sono effettuate mediante un sistema HPLC Serie Hp 1100 Agilent dotato di rivelatore “diode array” e la colonna utilizzata è una YMC C 30 (5µm, 4.6x250mm) e precolonna YMC basic VS (3µm, 4.0x10mm), termostata a 30°C; flusso 1 mL/min; volume di iniezione 10 µL.

La fase mobile utilizzata è composta da una soluzione A (metanolo) e una soluzione B (metil-ter-butyl-etero) secondo il seguente gradiente: 0 min. 90% A e 10%B; 40 min. 50%A e 50%B; 42 min. 40%A e 60%B; 65 min. 40%A e 60%B; 70 min. 90%A e 10%B; 75 min. 90%A e 10%B.

La lettura spettrofotometrica è a 450 nm per la luteina e il beta-carotene e a 470 nm per il licopene. La quantificazione dei composti è stata effettuata con calibrazione utilizzando standard puri.

3.2 Risultati

Il genere *Rosa* conta circa 100 specie diverse che sono variamente distribuite nelle aree geografiche del mondo. Negli ultimi anni diverse specie di rosa sono state studiate perché sono una buona fonte di composti bioattivi. I cinorrodi, i frutti della rosa, vengono raccolti generalmente una volta l'anno (in autunno) quando raggiungono una maturazione completa e, di conseguenza, un contenuto elevato in carotenoidi, flavonoidi e vitamina C. Dalla letteratura, infatti, si evince che lo stato di maturazione e il tempo di raccolta determinano il profilo di composizione nei composti bioattivi (Anderson et al. 2011). Dalla letteratura e dai nostri dati altra evidenza che abbiamo è che i composti bioattivi variano in base alla specie. Per quel che riguarda la vitamina C tra le cinque specie da noi analizzate troviamo un intervallo di valori di concentrazione che va da 2.03 mg/g della *Rosa Micrantha* ai 5.08 mg/g della *Rosa Rubiginosa* (Tabella 1). L'influenza del genotipo sul contenuto di vitamina C dei cinorrodi mostrato nel nostro studio conferma quanto osservato da altri autori (Fascella et al. 2019; Demir et al. 2014).

Tabella 1: Contenuto in vitamina C espresso come mg/g di peso fresco

Campione Rosa	Vitamina C
R. MICRANTHA	2.03±0.03
R. RUGOSA	5.16±0.61
R. CANINA	3.06±0.08
R. CORYMBIFERA	4.79±0.49
R. RUBIGINOSA	5.08±0.07

Il profilo fenolico dei cinorrodi sembra essere influenzato dalla specie (Tabella 2). Nei campioni di rosa analizzati sono stati identificati otto composti fenolici presenti in quantità diverse all'interno delle specie; il contenuto maggiore lo abbiamo nella Rosa Corymbifera, Rosa Rubiginosa e Rosa Rugosa, mentre al contrario la Rosa Micrantha e Canina hanno il contenuto più basso (Demir et al. 2014; Nowak 2006).

Tabella 2: Contenuto in composti fenolici espresso in mg/g di liofilizzato

Contenuto in composti fenolici mg/g								
	Catechina	Epicatechina	p-cumarico	Rutina	Quercetina3-glucoside	Kampherolo3-rut	Quercitrina	Quercetina
Corymbifera	0,419 ±0,016	tr	tr	0,074 ±0,017	0,010 ±0,007	0,033 ±0,009	0,040 ±0,012	0,002 ±0,001
Rubiginosa	-	-	-	0,093 ±0,007	0,027 ±0,004	0,027 ±0,010	0,021 ±0,013	0,001 ±0,000
Rugosa	tr	-	-	0,125 ±0,024	0,027 ±0,008	0,044 ±0,001	0,015 ±0,001	0,001 ±0,000
Canina	0,181 ±0,008	-	-	0,067 ±0,004	0,044 ±0,001	0,019 ±0,001	0,003 ±0,000	tr
Micrantha	0,006 ±0,000	-	0,002 ±0,000	0,025 ±0,001	0,017 ±0,001	0,008 ±0,001	0,005 ±0,000	0,002 ±0,000

I carotenoidi sono un gruppo eterogeneo di pigmenti naturali e sono dei potenti antiossidanti naturali. Molti dei carotenoidi trovati nei cinorrodi, come zeaxantina, luteina, licopene e β -carotene, sono noti per i potenziali effetti benefici sulla salute. A seconda dello stato di maturazione dei cinorrodi il contenuto di carotenoidi può variare (Medveckiene et al. 2021; Andersonn et al. 2011). Il contenuto in carotenoidi nelle cinque specie di rosa oggetto di studio è riportato nella Tabella 3. I nostri dati hanno confermato la variabilità dovuta alla specie con un maggior contenuto totale di carotenoidi presente nella Rosa Rugosa (135.12 $\mu\text{g/g}$) e il contenuto minore presente nella Rosa Canina (41.61 $\mu\text{g/g}$).

Tabella 3: Contenuto in carotenoidi espresso in $\mu\text{g/g}$ di liofilizzato

Contenuto in carotenoidi $\mu\text{g/g}$				
Campione	Luteina	Zeaxantina	β -carotene	Licopene
Rosa Corymbifera	5,63 \pm 0.82	3.16 \pm 0.77	68.29 \pm 10.28	32.88 \pm 9.33
Rosa Rugosa	10.78 \pm 0.28	11.62 \pm 0.28	59.09 \pm 1.13	53.63 \pm 4.67
Rosa Canina	5.31 \pm 0.33	1.41 \pm 0.05	15.45 \pm 0.73	19.44 \pm 0.17
Rosa Rubiginosa	4.70 \pm 0.01	2.47 \pm 0.01	26.99 \pm 0.61	80.96 \pm 28.25
Rosa Micrantha	5.94 \pm 0.08	4.34 \pm 0.17	51.99 \pm 2.34	43.96 \pm 4.58

In conclusione possiamo dire che tra tutte le specie da noi analizzate la *Rosa Canina* e la *Rosa Micrantha* hanno il minor contenuto di composti bioattivi (vitamina C, acidi fenolici e carotenoidi) al contrario delle cultivar *Rubiginosa*, *Rugosa* e *Corimbyfera* che presentano un contenuto in vitamina C, composti fenolici e carotenoidi più elevato.

BIBLIOGRAFIA

Maria Teresa Tarrago-Trani, Katherine M. Phillips , Marlyn Cotty, 2012. "Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods" *Journal of Food Composition and Analysis* 26 (2012) 12-25

Brigita Medveckiene, Jurgita Kulaitiene, Dovile Levickien and Ewelina Hallmann, 2021. "The Effect of Ripening Stages on the Accumulation of Carotenoids, Polyphenols and Vitamin C in Rosehip Species/Cultivars" *Appl. Sci.* 2021, 11, 6761 <https://doi.org/10.3390/app11156761>

I. Baiamonte, A. Raffo, N. Nardo, M. Kelderer, and F. Paoletti, 2014. "Effect of Growing Method and Cold Storage on Phenolic Compounds Composition of Eight Apple Cultivars" *Journal of Nutritional Ecology and Food Research* Vol. 1, 1–7, 2014 doi:10.1166/jnef.2014.104

Ahlam Al-Yafeaia, Angelika Malarski , Volker Böhm, 2018. “Characterization of carotenoids and vitamin E in *R. rugosa* and *R. canina*: Comparative analysis”, *Food Chemistry* 242 (2018) 435–442

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.070>

Andersson, S.C.; Rumpunen, K.; Johansson, E.; Olsson, M.E. “Carotenoid content and composition in rose hips (*Rosa* spp.) during ripening, determination of suitable maturity marker and implications for health promoting food products” . *Food Chem.* 2011, 689–696.

N. Demir, O. Yildiz , M. Alpaslan , A.A. Hayaloglu “Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in Turkey” *LWT - Food Science and Technology* 57 (2014) 126-133 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.038>

Giancarlo Fascella , Francesca D'Angiolillo , Michele Massimo Mammano , Margherita Amenta , Flora V. Romeo , Paolo Rapisarda , Gabriele Ballistreri “Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous Sicilian flora” *Food Chemistry* 289 (2019) 56–64
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.127>

Renata Nowak “COMPARATIVE STUDY OF PHENOLIC ACIDS IN PSEUDOFRUITS OF SOME SPECIES OF ROSES” *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, Vol. 63 No. 4 pp. 281-288, 2006