



Alla **FONDAZIONE CR FIRENZE**  
**Via Bufalini, 6**  
**50122 Firenze**

**Richiesta di contributo per il 1° anno del progetto di ricerca dal titolo:**  
**NUTRIFLOR: potenzialità nutraceutiche della flora**  
**mediterranea**

**Referente Scientifico:**

Dr.ssa Anna De Carlo

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)  
IBE/Istituto per la BioEconomia (ex IVALSA)  
Polo Scientifico, via Madonna del Piano n° 10, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze)  
Tel: 055 5225690, Fax: 055 5225507  
e-mail: [anna.decarlo@ibe.cnr.it](mailto:anna.decarlo@ibe.cnr.it)

**Ricercatore di Riferimento:**

Dr.ssa Cecilia Brunetti

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)  
IBE/ Istituto per la BioEconomia (ex IVALSA)  
Polo Scientifico, via Madonna del Piano n° 10, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze)  
Tel: 055 5225790  
E-mail: [cecilia.brunetti@cnr.it](mailto:cecilia.brunetti@cnr.it)

**Supervisione attività scientifica:**

Dr. Mauro Centritto

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)  
IPSP/Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante  
Polo Scientifico, via Madonna del Piano n° 10, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze)  
Tel: 055 5225592  
E-mail: [mauro.centritto@cnr.it](mailto:mauro.centritto@cnr.it)  
Pec: [ipsp@pec.cnr.it](mailto:ipsp@pec.cnr.it)

**CONTRIBUTO DELIBERATO DALL'ENTE (ANNO 2018): 10.000,00 € (pratica N° 2017.0895 del 3/7/2018)**

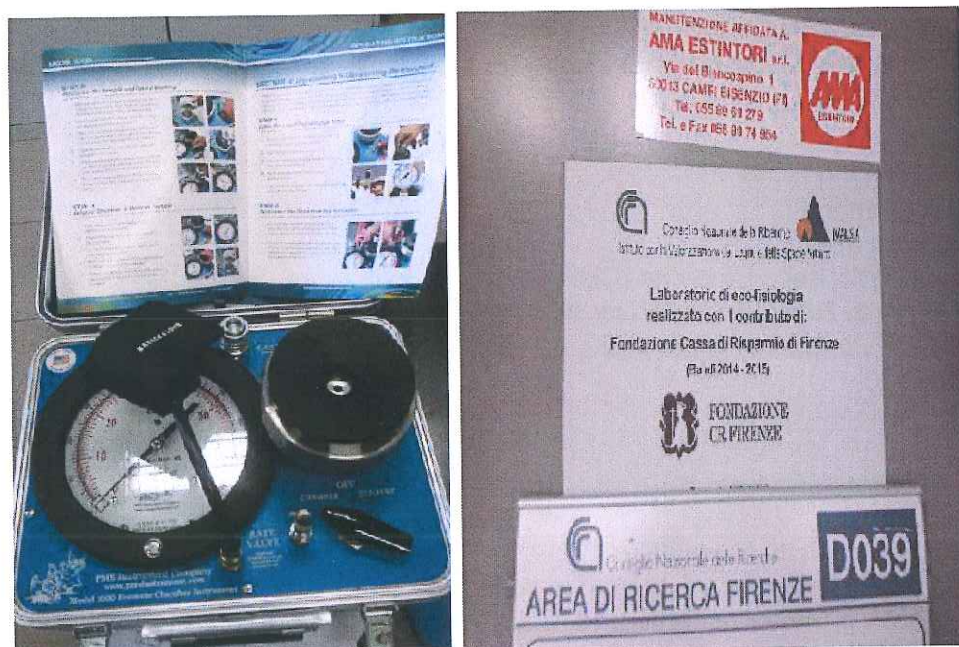
**RIMODULAZIONE SECONDO PIANO ESECUTIVO DI DETTAGLIO:**

**Costo complessivo del progetto: 20.000,00 €**  
**Importo di copertura del soggetto richiedente: 10.000,00 €**  
**Contributo richiesto alla Fondazione CR Firenze: 10.000,00 €**



## Relazione dei risultati del primo anno del progetto NUTRIFLOR

Il contributo deliberato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Firenze in favore del progetto NUTRIFLOR è stato utilizzato come cofinanziamento per l'acquisto di una camera a pressione PMS 1000 (uscita massima 70 bar, lettura analogica) dalla ditta GMR Strumenti SAS E.C. di Rossi Filippo. La camera a pressione è stata installata nel laboratorio D39 dell'IPSP all'interno dell'AREA di Ricerca del CNR di Sesto Fiorentino (**Fig. 1**). Il suo utilizzo sarà condiviso con i ricercatori degli altri Istituti CNR afferenti all'Area di Ricerca.



**Fig. 1:** Camera a pressione per misurazione potenziale idrico posizionata nel laboratorio di eco fisiologia realizzato con il contributo della Fondazione Cassa di Risparmio di Firenze

### *Caratteristiche tecniche della camera a pressione Scholander*

La camera a pressione è il metodo più diffuso che permette misure rapide ed accurate dello stato idrico delle foglie di una pianta. Il picciolo della foglia viene inserito nella camera a pressione con l'estremità tagliata che fuoriesce dal dispositivo porta campione. Poi si applica una pressione crescente, facendo arrivare azoto nella camera a pressione, fino a quando non viene superata la tensione interna, e dalla sezione tagliata comincia a uscire del materiale linfatico. In quell'istante, il valore della tensione interna può essere letto sul manometro dello strumento. La camera a pressione

permette di misurare curve pressione/volume (P/V) dalle quali vengono ricavati parametri eco fisiologici che forniscono dati sullo stato fisiologico delle piante sotto stress (Fig. 2).

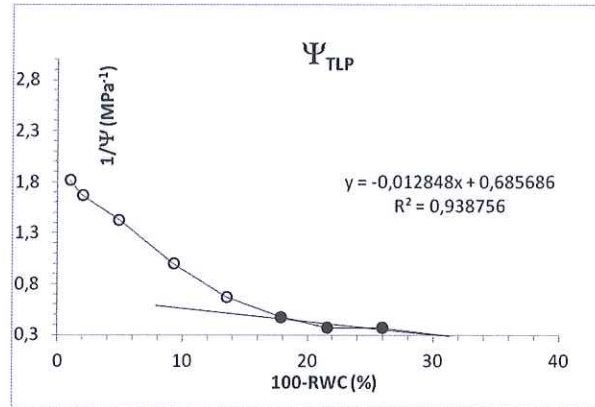


Fig. 2: Esempio di curva P/V misurata con la camera a pressione

#### *Sensoristica ambientale costruita con i consumabili acquistati*

I consumabili acquistati hanno permesso di costruire sistemi di sensoristica ambientale per monitorare i parametri climatici dell'area in cui è stato condotto lo studio sulle piante mediterranee. Uno dei sensori per misurare temperatura e umidità dell'aria e registrare le precipitazioni è riportato in Fig. 3.



Fig. 3: Misuratore di temperatura e umidità dell'aria con pluviometro



### **Prove sperimentali condotte nel primo anno di progetto**

Il progetto si propone di individuare piante della macchia mediterranea come fonti per l'estrazione di fitocomplessi con applicazione nutraceutica. Le piante mediterranee si sono adattate a vivere in condizioni climatiche avverse (alte temperatura, scarsità di acqua, salinità del suolo, deficit di nutrienti) ed hanno quindi sviluppato la capacità di investire un'elevata quota del carbonio di nuova assimilazione nella biosintesi di metaboliti secondari che giocano un ruolo chiave nel mantenimento dell'equilibrio redox in seguito a stress foto-ossidativo. Per questo motivo molte piante mediterranee, che crescono senza necessità di forti input agronomici, possono costituire una fonte preziosa di molecole da investigare in ambito nutraceutico.

Il progetto si è sviluppato attraverso vari step: 1) la caratterizzazione fisiologica di tre specie tipiche della macchia mediterranea maggiormente resistenti a stress ambientali (in particolare la siccità); 2) raccolta del materiale fogliare ed estrazione di fitocomplessi su scala di laboratorio dalle piante selezionate; 3) uno screening delle attività antiossidanti in vitro; 4) test in vivo per verificare una possibile specifica azione terapeutica dell'estratto.

#### **Materiali e metodi:**

Questo studio è stato condotto su piante di *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Cistus incanus* L. selezionate in ambiente dunale costiero di 200 m<sup>2</sup> in Toscana (42° 46'N, 10°53'E). Le foglie sono state campionate durante tre ore diverse della giornata (8:00 h, 13:00 h, and 18:00 h) in tre differenti mesi (Ottobre 2018; Maggio 2019; Luglio 2019). I dati metereologici sono stati registrati con le centraline installate.

#### ***Misura degli scambi gassosi e dei potenziali idrici***

Le misure dell'attività fotosintetica ( $P_n$ ) e della conduttanza stomatica ( $g_s$ ) sono state eseguite sulla parte centrale di foglie adulte completamente espanse utilizzando un LiCor Li6400XT munito di cuvetta di 2 cm<sup>2</sup> (Li-Cor, Inc., Nebraska, USA). Le misurazioni degli scambi gassosi sono state effettuate nelle ore centrali della giornata (13.00-14.00) per verificare il mantenimento dei tassi fotosintetici nelle ore di maggior radiazione e maggior temperatura.

I potenziali idrici sono stati misurati con la camera a pressione di Scholander su foglie adulte ed espanse nelle ore centrali della giornata ( $\Psi_{wMD}$ ) (13.00-14.00) per registrare i valori nel momento di maggior abbassamento del potenziale idrico della pianta e valutare una possibile relazione con la conduttanza stomatica. I potenziali idrici sono stati misurati anche prima dell'alba ( $\Psi_{wPD}$ ), quando il

potenziale fogliare è in equilibrio con il suolo e il parametro diventa indicativo per avere informazioni su situazioni di stress idrico delle piante.

### ***Misura dei polifenoli nelle foglie di *Cistus incanus*, *Phyllirea latifolia* e *Pistacia lentiscus****

Le foglie misurate per gli scambi gassosi sono state poi raccolte, congelate in azoto liquido e mantenute a -80°C fino al momento dell'estrazione. L'estrazione è avvenuta dopo macinazione del tessuto fogliare con azoto liquido e aggiunta della soluzione estraente (etanolo/acqua 75/25). Il pellet è stato estratto con sonicatura per 30 minuti a temperatura di 4°C e poi il surnatante purificato per ripartizione con esano. L'estratto etanologico è stato portato a secco e ripreso con 1 mL di metanolo/acqua (50:50). Il campione così preparato è stato poi analizzato con cromatografia liquida abbinata a detector UV/VIS (HPLC-DAD) (Perkin Elmer®, Bradford®, CT, USA) come riportato in Gori *et al.* 2016. Gli estratti sono stati iniettati in triplicato e l'identificazione dei singoli polifenoli è stata effettuata mediante confronto con standard, analisi degli spettri UV-VIS e confronto con i dati di letteratura. La quantificazione degli estratti è stata effettuata mediante curve di calibrazione dei seguenti standard: acido gallico, acido caffeico, apigenina, kampferolo, luteolina, miricetina, quercetina e epicatechina. I risultati quantitativi dei diversi polifenoli sono riportati in  $\mu\text{mol}$  per grammo di peso secco ed espressi come contenuto delle diverse classi di composti: derivati dell'acido caffeico (CA), derivati dell'apigenina (A), derivati del kampferolo (K), derivati della luteolina (L), derivati della miricetina (M), derivati della quercetina (Q) e derivati tanninici (T, cioè somma dei derivati dell'acido gallico e dell'epicatechina).

### ***Valutazione attività antiossidante in vitro***

Gli estratti polifenolici che erano risultati significativamente più ricchi in composti fenolici per ogni mese di raccolta erano stati valutati per la loro attività antiossidante in vitro tramite test del DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) adattato per microplates (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2016). In 96 microplates sono stati aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di soluzione metanolica di DPPH (150  $\mu\text{M}$ ) a 180  $\mu\text{L}$  di ogni campione diluito o metanolo puro (controllo negativo). Dopo aver tenuto i microplate in incubazione al buio per 40 min è stata letta l'assorbanza a 518 nm usando un lettore Spectra Max®.

### ***Test su colture cellulari con estratti di *C. incanus****

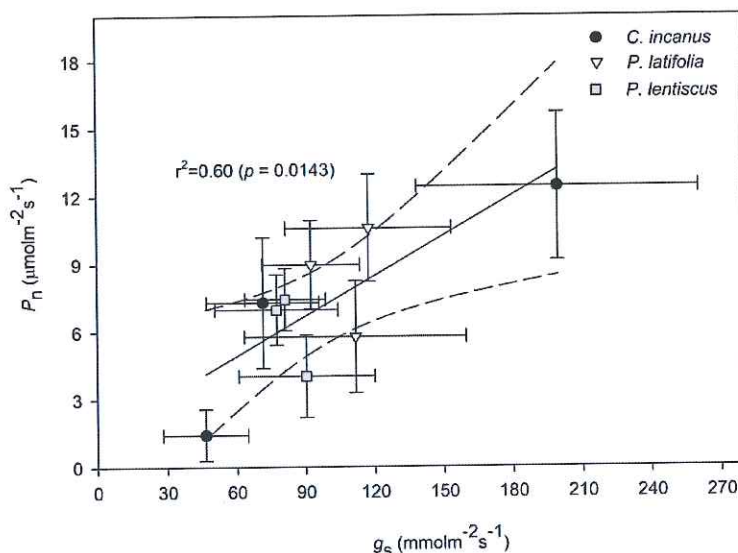


Culture cellulari di macrofagi murini RAW 264.7 sono state ottenute da American Type Culture Collection (Rockville, USA) e coltivate su apposite terreni (Thermo Fisher Scientific, Rodano, Milan, Italy) a 37°C in una atmosfera contenente il 5% di anidride carbonica. Lo stimolo infiammatorio è stato indotto esponendo le colture cellulari a LPS (lipopolisaccaride) da sole o in presenze di soluzione 1µM dell'estratto acquoso di *C. incanus*. Indometacin 10µM e Celecoxib 3µM (Sigma Aldrich, Milan, Italy) sono stati usati come controlli positivi. Dopo 18 h a 37°C il lisato cellulare è stato raccolto per analisi di espressione genica e determinazione di prostaglandine E2 (PGE2) tramite metodo immunoenzimatico (Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA).

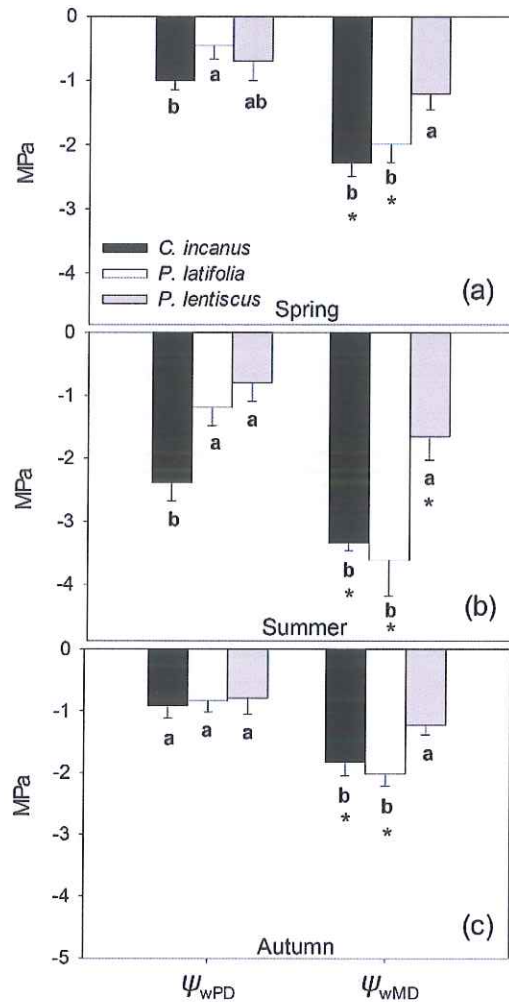
## Risultati

### Caratterizzazione fisiologica di *P. lentiscus*, *P. latifolia* e *C. incanus*

La misura degli scambi gassosi (fotosintesi ( $P_n$ ) e conduttanza stomatica ( $g_s$ )) e del potenziale fogliare hanno permesso di evidenziare le strategie fisiologiche adottate da queste specie per mantenere elevati tassi foto sintetici anche in condizioni di stress idrico e alte temperature, come ad esempio nei mesi estivi (Fig. 4 e Fig. 5).



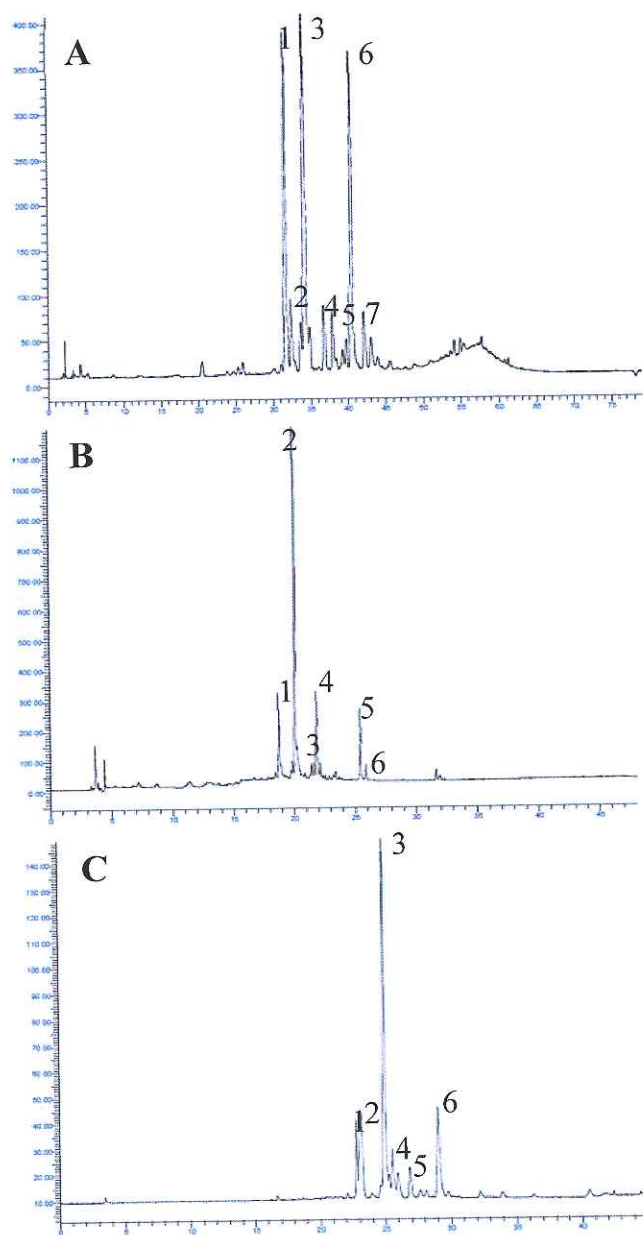
**Fig 4.** Relazione lineare fra tassi fotosintetici ( $P_n$ ) e conduttanza stomatica ( $g_s$ ) in *C. incanus*, *P. latifolia* e *P. lentiscus* misurati in autunno (ottobre 2018), primavera (maggio 2019) e estate (luglio 2019). I dati riportati sono medie  $\pm$  deviazioni standard ( $n = 9$ ). La linea centrale indica la miglior retta che fitta i punti. Il valore di  $r^2$  indica il risultato della regressione lineare.



**Fig 5.** Potenziali idrico fogliare prima dell'alba (pre-dawn) ( $\Psi_{WPD}$ ) e nelle ore centrali della giornata (midday) ( $\Psi_{WMD}$ ) (a, b, c) misurati in *C. incanus*, *P. latifolia* e *P. lentiscus* in autunno (ottobre 2018), primavera (maggio 2019) e estate (luglio 2019). I dati riportati sono medie  $\pm$  deviazioni standard ( $n = 8$ ). Le lettere indicano differenze significative fra le specie per ogni parametro ( $p \leq 0.05$ ) mentre gli asterischi denotano differenze significative ( $p \leq 0.05$ ) fra il potenziale "pre-dawn" e "midday" all'interno della stessa specie.

### **Variazioni giornaliere e stagionali della composizione biochimica**

La caratterizzazione biochimica effettuata mediante HPLC-DAD è riportata nei cromatogrammi sotto riportati (**Fig. 6**).



**Fig 6.** Cromatogrammi a 350 nm dell'estratto etanolico di *Phillyrea latifolia* (A), *Cistus incanus* (B) e *Pistacia lentiscus* (C). I picchi dei flavonoidi identificati e quantificati sono stati numerati. I derivati della luteolina (picchi 2, 3, 6 e 7) e della quercetina sono i flavonoidi più abbondanti in *P. latifolia* (A). In *C. incanus* (B) i principali composti rilevati sono i derivati della miricetina (picchi 1 e 2) e della quercetina (picchi 3, 4, 5, 6). In modo similare, anche nel *P. lentiscus* (C), i derivati della miricetina (picchi 1, 3 e 4) e della quercetina (picchi 2, 5 e 6) sono quelli più importanti.

Il contenuto polifenolico nelle specie studiate mostra variazioni sia stagionali che giornaliere. In *P. latifolia* sia la stagione che l'ora della giornata influenzano in modo significativo il contenuto



polifenolico delle foglie (Tab. 1). Comunque, le variazioni mensili in questa specie sono maggiormente pronunciate rispetto alle variazioni giornaliere. In particolar modo, le foglie raccolte a luglio (estate) mostrano il più alto contenuto polifenolico rispetto a quelle raccolte nelle altre stagioni. A livello giornaliero, i derivati dell'acido caffeico sono i composti che variano maggiormente in base all'ora della raccolta. Per ottenere la più alta concentrazione di polifenoli, le foglie di *P. latifolia* dovrebbero essere raccolte nelle ore centrali della giornata (13:00) in estate. Per quanto riguarda il *C. incanus* il maggior contenuto di derivati del kampferolo si accumula in ottobre (autunno) mentre la raccolta di luglio porta a foglie con il più alto contenuto di miricetina; in questa specie in estate si accumula nelle foglie il più alto contenuto in derivati della quercetina e tannini (Tab. 1). Infine, per quanto riguarda il *P. lentiscus*, il momento per ottenere foglie con il maggior contenuto di derivati della quercetina è nelle ore centrali della giornata in estate (Tab. 1).

**Tab. 1.** Composizione fenolica giornaliera e mensile di estratti fogliari di *P. latifolia*, *C. incanus*, e *P. lentiscus*. K – derivati del kampferolo; M – derivati della miricetina; Q – derivati della quercetina; T – tannini. I valori medi sono espressi in  $\mu\text{mol}$  su g peso secco  $\pm$  deviazione standard (n=3).

	Maggio (2019)			Luglio (2019)			Ottobre (2019)		
	8.00	13.00	18.00	8.00	13.00	18.00	8.00	13.00	18.00
<i>P. latifolia</i>									
K	1.0 $\pm$ 0.004	1.16 $\pm$ 0.12	0.95 $\pm$ 0.18	1.38 $\pm$ 0.19	1.79 $\pm$ 0.07	1.75 $\pm$ 0.05	1.39 $\pm$ 0.12	1.66 $\pm$ 0.07	1.37 $\pm$ 0.08
A	0.15 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.02
CA	0.57 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.03	0.92 $\pm$ 0.13	3.04 $\pm$ 0.28	1.31 $\pm$ 0.21	1.30 $\pm$ 0.17	1.61 $\pm$ 0.27	1.33 $\pm$ 0.21
Q	3.03 $\pm$ 0.84	5.49 $\pm$ 0.93	1.96 $\pm$ 0.07	16.09 $\pm$ 1.3	23.84 $\pm$ 2.0	17.94 $\pm$ 0.8	16.88 $\pm$ 0.3	19.40 $\pm$ 0.5	19.45 $\pm$ 0.5
L	6.18 $\pm$ 1.12	9.16 $\pm$ 0.70	6.63 $\pm$ 0.57	22.87 $\pm$ 0.9	32.68 $\pm$ 2.1	22.19 $\pm$ 1.5	17.27 $\pm$ 1.2	22.31 $\pm$ 3.4	17.61 $\pm$ 1.1
<i>C. incanus</i>									
K	0.34 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.21	0.42 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.21	0.94 $\pm$ 0.12
M	12.56 $\pm$ 0.35	18.85 $\pm$ 3.5	24.71 $\pm$ 0.4	16.24 $\pm$ 0.9	15.08 $\pm$ 0.8	13.52 $\pm$ 0.8	11.95 $\pm$ 0.2	12.89 $\pm$ 0.4	12.07 $\pm$ 0.4
Q	4.18 $\pm$ 0.2	5.78 $\pm$ 0.17	4.17 $\pm$ 0.14	6.36 $\pm$ 0.28	9.73 $\pm$ 1.16	6.10 $\pm$ 1.23	5.83 $\pm$ 0.94	7.00 $\pm$ 0.32	4.06 $\pm$ 0.19
T	21.43 $\pm$ 3.02	45.02 $\pm$ 8.5	33.14 $\pm$ 2.0	37.55 $\pm$ 8.5	34.26 $\pm$ 7.7	43.70 $\pm$ 1.7	28.31 $\pm$ 3.2	23.93 $\pm$ 4.9	29.60 $\pm$ 4.8
<i>P. lentiscus</i>									
M	17.46 $\pm$ 1.99	13.41 $\pm$ 0.8	13.28 $\pm$ 0.4	22.50 $\pm$ 1.1	20.21 $\pm$ 1.2	21.21 $\pm$ 0.4	20.09 $\pm$ 0.9	18.89 $\pm$ 1.4	17.59 $\pm$ 1.9
Q	4.85 $\pm$ 0.51	5.15 $\pm$ 0.40	4.34 $\pm$ 0.67	4.75 $\pm$ 0.29	6.91 $\pm$ 0.46	5.41 $\pm$ 1.38	5.36 $\pm$ 0.11	5.74 $\pm$ 0.24	4.41 $\pm$ 0.06
T	51.26 $\pm$ 1.89	48.34 $\pm$ 1.7	55.21 $\pm$ 2.5	74.87 $\pm$ 1.2	79.84 $\pm$ 4.7	47.47 $\pm$ 2.1	51.52 $\pm$ 0.1	56.70 $\pm$ 0.2	56.71 $\pm$ 2.5

**Risultati del test per valutare l'attività antiossidante degli estratti fogliari**

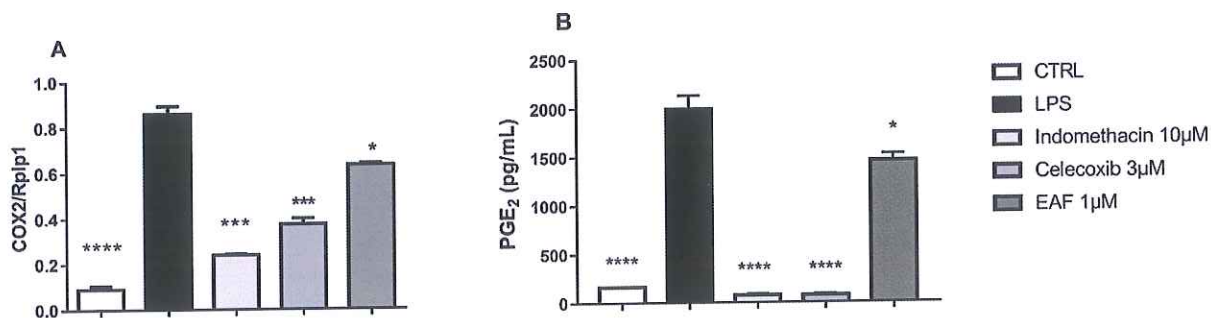
Questo test in vitro fornisce informazioni sull'attività scavenger degli estratti contro i radicali liberi. I risultati sono forniti in valori di EC<sub>50</sub>, che rappresenta l'effettiva concentrazione del campione necessaria a ridurre del 50% la concentrazione di DPPH (il radicale stabile utilizzato per il test). Tale test risulta quello maggiormente utilizzato poiché veloce e molto efficace (Musa *et al.*, 2013). I valori di EC<sub>50</sub> ottenuti testando gli estratti fogliari delle tre specie evidenziano come il *C. incanus* abbia una maggiore capacità di "quenciare" i radicali liberi rispetto a *P. latifolia* e *P. lentiscus*, con valori da 2 a 20 volte più bassi rispetto alle altre due piante (**Tab. 2**).

**Tab. 2.** Attività antiossidante (valori di EC<sub>50</sub>) di estratti di *P. latifolia*, *C. incanus* e *P. lentiscus* ottenuti da foglie raccolte alle ore 13.00, durante i tre diversi mesi di studio (Ottobre 2018, Maggio 2019 e Luglio 2019).

	Maggio (2019)	Luglio (2019)	Ottobre (2018)
<i>P. latifolia</i>	9.6 µg mL <sup>-1</sup>	1.2 µg mL <sup>-1</sup>	2.2 µg mL <sup>-1</sup>
<i>C. incanus</i>	0.74 µg mL <sup>-1</sup>	0.53 µg mL <sup>-1</sup>	0.53 µg mL <sup>-1</sup>
<i>P. lentiscus</i>	2.7 µg mL <sup>-1</sup>	2.8 µg mL <sup>-1</sup>	2.8 µg mL <sup>-1</sup>

**Risultati preliminari dell'azione antiossidante su colture cellulari**

Sulla base dei risultati sopra ottenuti, l'estratto di *C. incanus* è stato testato anche su colture cellulari, valutando l'attività anti-infiammatoria su macrofagi di cellule murine (RAW 264.7) stimulate con lipopolisaccaride (LPS). Questo è infatti il modello di infiammazione comunemente utilizzato per valutare l'attività anti-infiammatoria di un estratto o di un farmaco. Il trattamento con l'estratto acquoso fogliare di *C. incanus* (EAF) riduce in modo significativo l'espressione di ciclo-ossigenasi-2 (COX2) e questo effetto è associato ad una riduzione delle prostaglandine E2 (PGE2) (**Fig. 7**), in modo analogo all'azione di alcuni farmaci antiinfiammatori in commercio (Indometacina e Celecoxib).



**Fig. 7:** Effetto dell'estratto acquoso fogliare (EAF) di *C. incanus* sull'espressione genica di cicloossigenasi-2 (COX2) (A) e produzione di Prostaglandine E2 (PGE2) (B) in RAW 264.7 stimolati con LPS per 18 ore. \*\*\*\*  $p < 0.001$  e \*  $p < 0.05$  vs LPS. In bianco è riportato il controllo. I dati sono espressi come media di 4 repliche  $\pm$  la deviazione standard.

### Conclusioni:

Questo studio ha permesso di caratterizzare dal punto di vista fisiologico e biochimico tre specie tipiche della macchia mediterranea molto resistenti a stress abiotici, quali siccità ed elevate temperature. Uno dei principali risultati di questo studio è l'identificazione del miglior momento di raccolta delle foglie di queste specie vegetali per ottenere estratti arricchiti in polifenoli e con alta attività di scavenger verso i radicali liberi. Infine, lo studio preliminare dell'estratto ottenuto da *C. incanus* su cellule RAW 264.7 ha evidenziato una alta attività anti-infiammatoria di questo estratto, fornendo quindi supporto scientifico per il suo potenziale utilizzo in patologie di natura infiammatoria.

### Referenze:

- Gori, A., Ferrini, F., Marzano, M., Tattini, M., Centritto, M., Baratto, M., ... & Brunetti, C. (2016). Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. incanus* leaves. *International journal of molecular sciences*, 17(8), 1344.
- Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Baréa, B., Panya, A., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2016). Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods. *Food Chemistry*, 194, 749-757.
- Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B., & Hidayat, M. A. (2013). A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food chemistry*, 141(4), 4102-4106.

Sesto Fiorentino, 7 agosto 2019



Responsabile scientifico  
Dr. ssa Anna de Carlo

FIRENZE

BOLOGNA

CATANIA

ROMA

SASSARI

S. MICHELE ALL'ADIGE

C.F. 80054330586 – P.IVA 02118311006

PEC: [protocollo.ibe@pec.cnr.it](mailto:protocollo.ibe@pec.cnr.it)