

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti Dottorato di Ricerca in *Scienze del Suolo e degli Alimenti*

Curriculum: Chimica degli alimenti

(XXXVII ciclo)

Settore Scientifico disciplinare: CHEM07/B

Da scarto infestante a risorsa salutistica: ricerca e valorizzazione della *Salicornia europaea* L. per nuove formulazioni di interesse nutraceutico

Dottorando:

Dott. Francesco LIMONGELLI

Supervisor:

Chiar.ma Prof.ssa Filomena CORBO

Co-supervisor:

Chiar.mo Prof.ssa Maria Lisa CLODOVEO

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Fabio Minervini

Anno Accademico 2024-2025

Indice

Abstract ... *3*

Capitolo 1 Introduzione ... *4*

1.1 *Salicornia europaea* L.: caratteristiche botaniche ... **6**

1.2 Principali sostanze fitochimiche identificate nella *Salicornia*, focus su polifenoli ... **9**

1.2.1 Acidi fenolici ... 12

1.2.2 Flavonoidi ... 15

1.2.3 Lignani ... 17

1.3 Confronto tra i metodi di estrazione dei polifenoli dalla Salicornia ... **19**

1.3.1 Macerazione ... 19

1.3.2 Estrazione assistita da microonde (MAE) ... 21

1.3.3 Estrazione assistita da Ultrasuoni (UAE) ... 21

1.3.4 Estrazione con fluidi supercritici (SFE) ... 23

1.3.5 Estrazione assistita da enzimi (EAE) ... 24

1.4 Solventi eutettici (DESs e NADESs) ... **43**

1.5 Ottimizzazione dell'estrazione ... **47**

Capitolo 2 Materiali e metodi ... *49*

2.1 Reagenti chimici ... **50**

2.2 Materiale vegetale ... **50**

2.3 Estrazione polifenoli da *S. europaea* ... **50**

2.4 Disegno sperimentale e analisi statistica ... **51**

2.5 HPLC-DAD *Salicornia europaea* L. ... **53**

2.7 HPLC-MS *Salicornia europaea* L. ... **54**

2.8 Selezione dei NADESs ... **54**

2.9 Preparazione dei NADEs ... **55**

2.10 Estrazione dei polifenoli da *S. europaea* con NADESs ... **56**

2.11 Saggi antiossidanti ... **56**

2.12 Saggi biologici – Valutazione attività antimicrobica ... **57**

Capitolo 3 Risultati e discussione ... *58*

3.1 Estrazione dei polifenoli da *S. europaea* ... **59**

3.1.1 Screening dei fattori che influenzano l'efficienza dell'UAE ... 59

3.1.2 Ottimizzazione Multiresponse degli UAE mediante CCD-RSM ... 60

3.1.3 Identificazione e quantificazione per UHPLC-HRMS/MS e HPLC-DAD dei principali composti isoramnetinici estratti da *S. europaea* ... 63

3.1.4 Valutazione dell'attività antiossidante ... 67

3.2 Ottimizzazione estrazione green *S.europaea* attraverso NADESs ... **69**

3.2.1 Screening dei NADESs con *COSMOtherm* ... 69

3.2.2 Valutazione dell'attività antiossidante ... 70

3.2.3 Risultati dell'attività antimicrobica ... 74

Capitolo 4 Conclusione ... *76*

Bibliografia ... *79*

Abstract

Questa tesi di dottorato ha focalizzato la sua attenzione sulla valorizzazione della *Salicornia europaea* L., pianta alofita delle aree costiere mediterranee. Le caratteristiche fitochimiche della *Salicornia*, in particolare la presenza di polifenoli, flavonoidi e lignani, le conferiscono potenziali benefici antiossidanti, antimicrobici e antinfiammatori. Diverse metodologie di estrazione, incluse tecniche green come l'estrazione con ultrasuoni (UAE) e Natural deep eutectic solvent (NADESs), sono state ottimizzate per massimizzare la resa di composti bioattivi.

In seguito all'ottimizzazione delle condizioni di estrazione in EtOH 50% emerge come un tempo di estrazione di 11 minuti e un rapporto matrice solvente pari a 1:9 (g/mL) risulta essere il più efficace in termini di recupero di composti bioattivi e antiossidanti tra cui principalmente isoramnetine e loro derivati. La selezione di solventi green come i NADESs, ha mostrato come l'estratto in prolina: acido malico, sia il migliore su tre fronti: attività antiossidante, antimicrobica e stabilità del contenuto totale di polifenoli nel tempo.

Questi risultati evidenziano un elevato potenziale della *Salicornia* per l'industria alimentare e farmaceutica, promuovendo al contempo la sostenibilità ambientale attraverso l'utilizzo sia di solventi ecocompatibili che di una pianta endemica del Mediterraneo capace di crescere su terreni ad alta salinità altrimenti non utilizzabili per coltivazioni convenzionali. Questo studio si inserisce nel contesto delle strategie europee del Green Deal e della Blue Economy, mirando alla creazione di nuove filiere produttive intercettando nuovi mercati ed opportunità economiche. Pertanto, la valorizzazione della *S. europaea* rappresenta un approccio innovativo per il settore nutraceutico, combinando ricerca scientifica, economia circolare e sviluppo territoriale.

Capitolo 1 Introduzione

Negli anni è aumentata la consapevolezza dei consumatori dello stretto rapporto tra alimentazione e salute. Su questa forte spinta culturale è cresciuta l'attenzione verso gli aspetti salutistici e nutraceutici dell'alimento. Il cibo deve inoltre rispondere a criteri di sostenibilità ambientale e sociale, criteri che guidano la scelta di materie prime in linea con un modello di economia dedicato alla creazione di un sistema economico sostenibile attraverso l'innovazione tecnologica.

L'Italia vanta produzioni agricole di pregio, ad alto valore salutistico ed elevata tipicità che, se valorizzate da una strategia innovativa in grado di creare lavoro e inclusione sociale, possono rappresentare un importante volano per la crescita socio-economica, sia in termini di fatturato, sia di nuove professioni. Il "capitale territoriale" inutilizzato è da considerarsi strategico come una misura del potenziale di sviluppo economico che è presente in molti territori (capitale naturale, culturale e cognitivo, l'energia sociale della popolazione locale, i sistemi produttivi agricoli, turistici, manifatturieri), che riattivati creerebbero occupazione.

Alla luce di queste considerazioni la ricerca proposta valorizza in chiave innovativa uno dei prodotti presenti nelle zone costiere del Mediterraneo, la *Salicornia europaea* L., specie pioniera infestante, che diventa una matrice per la formulazione di integratori con attività antiossidante e anti proliferativa per nuove terapie preventive d'avanguardia. Da scarto infestante a risorsa, la *S. europaea* diventa il topic di un progetto che intercetta due traiettorie: lo sviluppo di una nuova filiera (quella dei vegetali alofiti che al momento fa parte solo della tradizione locale) che potrebbe trasformare un "problema (ambientale in quanto pianta infestante ma edibile) in risorsa" accrescendo quello che la strategia chiama "sviluppo intensivo" che fa riferimento a quei cambiamenti che incrementano il benessere pro-capite in quanto propulsore di nuovi investimenti e nuovo lavoro, e lo "sviluppo estensivo" che riguarda quei cambiamenti che realizzano anche un incremento nella scala dei processi produttivi. In questo secondo caso accanto alla "creazione di nuovo lavoro" (nascita di start up innovative da trasformarsi in aziende consolidate utilizzando le risorse economiche che verranno dalle politiche europee legate al Green Deal e alle strategie della Blue economy), il progetto proietta il territorio verso altri ambiti (turistico, enogastronomico, salutistico) su cui agenzie per la promozione territoriale possono incrementare la propria visibilità nazionale e internazionale.

Gli ambiti di intervento all'interno dei quali ricade il progetto sono:

a) tutela attiva del territorio/sostenibilità ambientale;

b) valorizzazione del capitale naturale/culturale e del turismo;

c) valorizzazione dei sistemi agro-alimentari

Il progetto risponde alla crescente attenzione dei consumatori verso il recupero dei terreni abbandonati in cui insediare nuove filiere produttive, la creazione di nuove forme di occupazione e il mantenimento di un patrimonio di biodiversità locale che è la fonte principale di tali produzioni e la creazione di nuove opportunità di lavoro per profili ad elevata scolarità.

Infine in linea con gli obiettivi previsti dal programma dell'Agenda 2030, la ricerca scientifica sta focalizzando la sua attenzione verso il recupero delle matrici vegetali di scarto del settore agroalimentare come possibili font di composti bioattivi con potenziali proprietà salutistiche per l'uomo e l'ambiente. Inoltre, gli estratti nutraceutici dalle piante alimentari stanno riscuotendo successo grazie alle loro proprietà nutrizionali e funzionali [1,2].

1.1 *Salicornia europaea* L.: caratteristiche botaniche

La ***Salicornia europea*** **L**. è una pianta spontanea, nota anche come "asparago di mare", è una specie appartenente alla famiglia delle *Chenopodiaceae.* La particolarità che la contraddistingue è la sua affinità coi terreni salati. La salicornia è dotata di adattamenti peculiari che ne permettono l'insediamento su terreni salini o salmastri, e per questa sua caratteristica è definita pianta alofita.

Sono piante annuali commestibili e succulente che raggiungono altezze di statura comprese tra i 5 ed i 45 cm. Presentano fusti eretti, ramificati a piramide e rigonfi al centro; le foglie sono piccole e sono di colore verde, rossastro o verde-giallino. È un arbusto perenne ma fiorisce e si raccoglie da maggio e per tutto il periodo estivo [1].

Le specie di *Salicornia* risultano essere ampiamente diffuse in Europa, Asia e America settentrionale. Solitamente si trovano presso zone salmastre e sulle coste marine, dove la marea crea ristagni d'acqua, ed è molto diffusa anche sui terreni fangosi e sabbiosi delle saline. Essa può sopportare salinità estreme, superiori a quelle marine, ma la concentrazione ottimale per favorire una crescita veloce varia tra 150 e 300 mg/L di NaCl. La specie certamente commestibile è rappresentata dalla *S. europaea,* per l'appunto, comune sulle coste del Mediterraneo [3].

Le specie di *Salicornia* più studiate, illustrate nella Tabella 1, sono le seguenti:

- *S. europaea*, la salicornia comune, si presenta come una pianta relativamente piccola, con fusti verde brillante caratterizzati da piccole foglie e frutti carnosi che contengono un unico seme. È presente in Gran Bretagna, Francia e Irlanda [4];
- *S. bigelovii*, la salicornia nana, si trova negli Stati Uniti e in Messico e si distingue dalle altre specie per le punte delle foglie e delle brattee acute e nettamente mucronate [5];
- *S. ramosissima*, nota anche come salicornia purpurea, è una delle specie più studiate. Presenta fusti intensamente ramificati, nota anche come salicornia viola, si trova in Francia e in Iberia e ha fusti alti fino a 30 cm, molto ramificati, di colore verde o viola a seconda della giovane età [6];
- *S. herbacea*, anch'essa di piccole dimensioni, è diffusa in Corea e in Italia e ha fusti carnosi, eretti e foglie opposte, dall'aspetto simile a squame appiattite sui fusti [7];
- *S. brachiata*, detta anche "umari keerai", si trova in India [8].

					
Nome botanico	*S. bigelovii*	*S. brachiata*	*S. europaea*	*S. ramosissima*	*S. herbacea*
Nome comune	Dwarf saltwort	Umari Keerai	Common glasswort	Purple glasswort	Dwarf glasswort
Zona geografica	USA, Mexico	India	Britain, France, Ireland	France, Iberia	South Korea
Bibliografia	[5]	[8]	[4]	[6]	[7]

Tabella 1. Nome botanico, nome comune e provenienza delle principali specie di *Salicornia*

Le piante del genere *Salicornia* sono state a lungo utilizzate nella medicina tradizionale orientale per trattare disturbi intestinali (diarrea e costipazione) e disturbi infiammatori, tra cui nefropatie, epatiti, diabete e cancro (Figura 1).

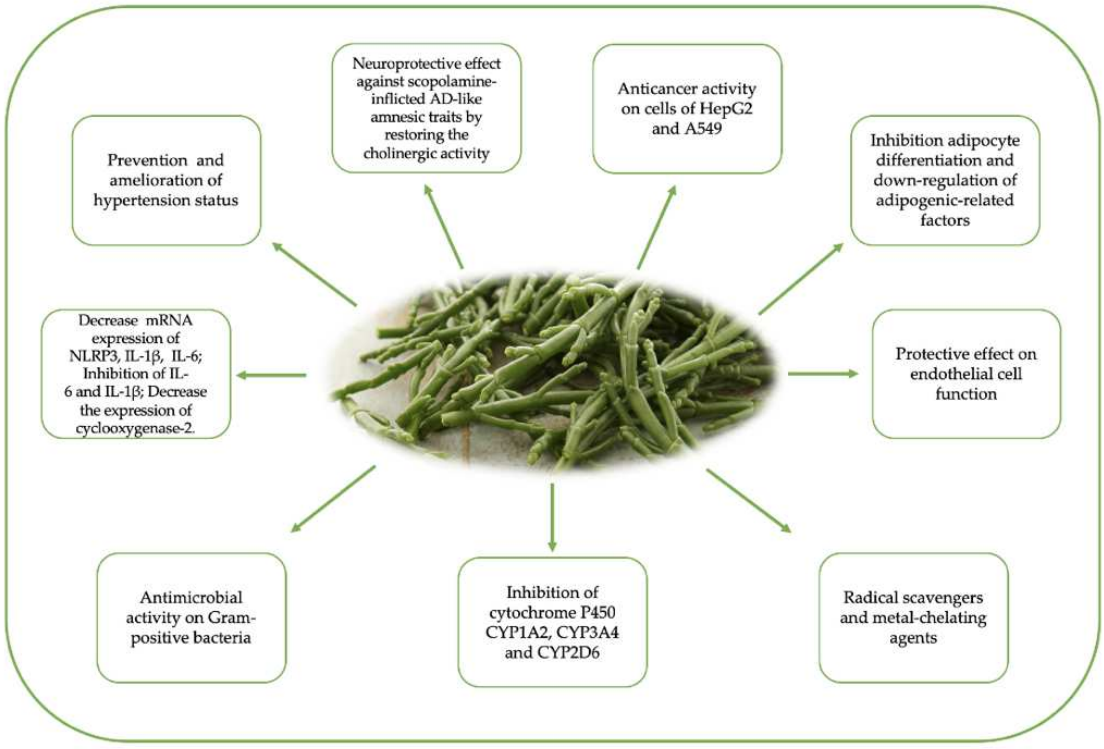


Figura 1. Principali effetti benefici delle piante del genere *Salicornia*

È noto che lo stress salino porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano le membrane cellulari e l'attività enzimatica delle piante [9]. La *Salicornia* è una delle specie più tolleranti al sale ed è, quindi, dotata di un potente sistema antiossidante (che comprende enzimi e composti antiossidanti) in grado di spegnere e resistere ai ROS, ed è anche responsabile del suo effetto terapeutico contro le suddette malattie croniche. Pertanto, le qualità medicinali di questa pianta hanno suscitato l'interesse della comunità scientifica, stimolando l'indagine sulla sua composizione fitochimica. Le sostanze fitochimiche presenti nella *Salicornia*, come l'acido tungtunmadico, la quercetina, l'acido clorogenico e i loro glicosidi, contengono molti gruppi idrossilici fenolici che li rendono altamente elettrofili, caratteristica fondamentale in quanto induce la stimolazione degli enzimi antiossidanti ed esercita un'attività di

scavenging dei radicali, proteggendo così le cellule dai danni provocati dai ROS (specie reattive dell'ossigeno) [9].

Oggi c'è un crescente interesse per la valorizzazione di queste piante alimentari e dei loro eventuali sottoprodotti per il recupero e/o la biotrasformazione in varie applicazioni industriali, come gli integratori alimentari, i cosmetici e l'industria farmaceutica [10,11]. Per questo motivo, negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi di estrazione più economici e sostenibili per ottenere estratti nutraceutici [12,13]. Per isolare le sostanze fitochimiche negli estratti del genere *Salicornia* sono state utilizzate diverse tecniche di estrazione, dalle più tradizionali (come l'estrazione solido-liquido per macerazione) alle tecnologie emergenti non convenzionali (come l'estrazione assistita da microonde e ultrasuoni e l'estrazione con fluido supercritico), al fine di favorire il trasferimento di massa, abbreviare i tempi di estrazione e/o ridurre i requisiti di solvente. Inoltre, i parametri tecnologici (dimensione delle particelle, tipo e composizione del solvente, rapporto solido-solvente, temperatura e pressione di estrazione, tempo di estrazione e pH) che influenzano l'estrazione dei composti bioattivi sono stati attentamente ottimizzati [11,14].

1.2 Principali sostanze fitochimiche identificate nella *Salicornia*, focus su polifenoli

Diversi studi sulla caratterizzazione degli estratti delle specie del genere *Salicornia* mediante tecniche analitiche (HPLC-UV, HPLC-MS, GC-MS, ecc.) hanno riportato la presenza di vitamine, aminoacidi, minerali, steroli, acidi grassi, saponine, ossalati, acidi fenolici, flavonoidi e lignani [14,15,16] nelle diverse parti della pianta.

In genere le specie della *Salicornia* hanno mostrato alti livelli di vitamina C; il contenuto di acido ascorbico e deidroascorbico è superiore a 100 mg/100 g. *S. bigelovii* mostra un'elevata quantità di β-carotene (15,9 mg/100 g di peso fresco), che rappresenta una buona fonte di vitamina A [10,17]. Lima et al., 2020 hanno riportato un elevato contenuto di vitamina E, α-Tocoferolo (241 µg/100 g di peso fresco), e di vitamina B2 e B5 (con un contenuto relativo del 4,14% in 0,5 g) rispettivamente in *S. ramosissima* e *S. bigelovii*, [18,19].

Nei fusti e nelle radici di *S. herbacea* sono stati quantificati contenuti significativi di importanti aminoacidi, come l'acido aspartico (140,1 e 165,5 mg/100 g di peso), l'acido glutammico (160,5 e 182,3 mg/100 g di peso) e l'isoleucina (107,5 e 94,7 mg/100 g di peso), mentre in *S. bigelovii* sono stati trovati sei aminoacidi, tra cui gli acidi glutammico e aspartico, presenti alla massima concentrazione [15,17].

Na^+ e K^+ sono i minerali più abbondanti nelle specie di Salicornia; infatti, soprattutto *S. bigelovii* e *S. europea* potrebbero essere utilizzate come sostituti del sale grazie al loro effetto protettivo sulla disfunzione vascolare e sull'ipertensione. Studi recenti hanno dimostrato che un'elevata assunzione di sale aumenta la pressione sanguigna nei ratti, mentre l'assunzione di Salicornia, a parità di sodio, ha un basso effetto su di essa [20,21]. Nelle foglie di *S. europaea* sono stati trovati rispettivamente 1421,2 e 173,3 mg/100 g di Na^+ e K^+. Inoltre, sono state identificate quantità importanti di altri minerali, soprattutto nei fusti e nelle radici di *S. herbacea* e *S. europaea*, come Ca^{2+} (158,8 mg/100 g), K^+ (740,1 mg/100 g), Mg^{2+} (52,2 mg/100 g) e Fe^{2+} (3,25 mg/100 g) [22,23]. Inoltre, in *S. brachiate* è stata riscontrata la presenza di selenio, un micronutriente essenziale con un significativo effetto antiossidante [24].

Negli estratti di *S. herbacea e S. europaea* sono stati identificati molecole a struttura sterolica. I principali steroli contenuti sono lo stigmasterolo e l'ergosterolo. Lo stigmasterolo (0,47 mg/kg) mostra proprietà ipoglicemizzanti, antiossidanti, antitumorali, antimutagene e antinfiammatorie, mentre l'ergosterolo (0,31 mg/kg) è un'importante fonte di vitamina D e possiede potenti attività inibitorie di NF-kB [10,25]. Un altro sterolo identificato è il ß-sitosterolo, il fitosterolo predominante nella dieta umana, con effetti neuroprotettivi e antidiabetici [26,27].

La *Salicornia* presenta anche una quantità rilevante di acidi grassi saturi e polinsaturi, tra cui l'acido stearico, l'acido linolenico, l'acido linoleico e l'acido palmitico, presenti soprattutto nelle specie *S. herbacea, S. europaea e S. brachiata* [28,29]. L'acido linolenico è l'acido grasso polinsaturo più rappresentativo che si trova principalmente nelle foglie di *Salicornia* in concentrazioni intorno ai 4 mg/g [30]. Questo composto è utilizzato nella prevenzione e nel trattamento di molte malattie comuni come l'artrite, l'eczema e la sindrome premestruale [30,31]. L'acido linoleico, contenuto soprattutto nelle foglie (2,18 mg/g), è un acido grasso essenziale il cui consumo è fondamentale per la buona salute. Ha mostrato elevate attività antiossidanti e antiproliferative nei confronti delle cellule HepG2 e A549 [11].

Negli estratti di *S. herbacea e bigelovii* sono state identificate saponine con effetti antiossidanti e antimicotici. Tra queste, sono state isolate nuove saponine nor-oleaniche e nor-triterpeniche. Tuttavia, le saponine possono presentare tossicità a causa della necrosi dei tessuti e dell'alterazione della permeabilità intestinale, che possono compromettere il sistema immunitario [29]. Allo stesso modo, gli ossalati, rivelati in alto contenuto, sono antinutrienti che dovrebbero essere eliminati per giustificare l'uso della Salicornia come "verdura di mare" [29].

Altri composti alifatici identificati sono l'octacosanolo e il tetracosanolo, due alcoli alifatici isolati da *S. europaea e ramosissima*. Il tetracosanolo ha un ruolo importante nella terapia del diabete per la sua capacità di inibitore dell'α-amilasi, mentre l'octacosanolo è noto per la sua capacità di ridurre i livelli di colesterolo totale [29,32].

Tuttavia, nonostante la quantità significativa dei suddetti nutrienti presenti nei tessuti della Salicornia, l'attenzione maggiore è stata dedicata al loro contenuto di fenoli, che varia da 1,2 a 2 mg GAE/g fw (fresh weight) [33], visti i benefici per la salute e la bioattività ad essi correlati [34]. I composti fenolici, caratterizzati da anelli aromatici con uno o più gruppi ossidrilici, comprendono diverse classi strutturalmente differenti; quelli trovati negli estratti di *Salicornia* a diversi livelli di concentrazione sono principalmente acidi fenolici, flavonoidi e lignani [27] (Figura 2).

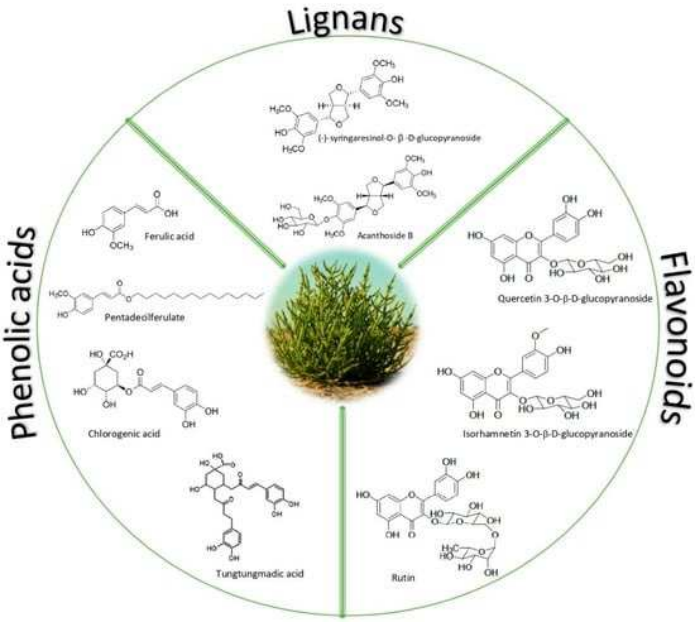


Figura 2. Classi di polifenoli identificate nelle specie *Salicornia*.

1.2.1 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici sono una classe di polifenoli molto abbondante nella dieta umana, in quanto contenuti in verdure, frutta e cereali integrali. L'apporto giornaliero di acidi fenolici dovrebbe essere di circa 200 mg/die [35]. Gli acidi fenolici sono tipi di composti acidi aromatici derivati dagli acidi benzoico e cinnamico. Presentano un'elevata attività antiossidante e quindi possiedono effetti protettivi per la salute, come quelli antimicrobici, antitumorali, antinfiammatori e antimutageni[36].

È stato dimostrato che la *Salicornia* possiede un elevato contenuto di acidi fenolici, tra cui l'acido clorogenico, tungtungmadico, ferulico, protocatecuico, caffeico, salicilico, siringico e cumarico [22,37].

L'acido clorogenico, un estere dell'acido caffeico, si trova in molte piante, tra cui la *Salicornia*, con un contenuto di 0,84 mg/g di peso secco (dw) dall'estratto etanolico di *S. europaea* [38]. Inoltre, nella *Salicornia* sono stati identificati anche vari derivati dell'acido clorogenico, come gli acidi dicaffeoilchinici. Ad esempio, quattro nuovi derivati dell'acido dicaffeoilchinico, in particolare l'acido 3-caffeoil-5-diidrocaffeoilchinico (75,6 ± 2,3 mg/100 g fw), l'estere metilico dell'acido 3-caffeoil-5-diidrocaffeoilchinico (69,3 ± 1,4 µg/100 g fw), l'estere metilico dell'acido 3-caffeoil-4-diidrocaffeoilchinico (71,9 ± 1,9 µg/100 g) e l'estere metilico dell'acido 3,5-diidrocaffeoilchinico (171,9 ± 1,5 µg/100 g fw), così come l'acido 3-caffeoilchinico e l'estere metilico dell'acido 3-caffeoilchinico, sono stati isolati dalle parti aeree di *S. herbacea*. L'attività antiossidante di questi composti è stata esaminata misurando il contenuto di idroperossido dell' estere del colesterolo (CE-OOH), prodotto dall'ossidazione nel plasma umano sano, durante l'ossidazione del plasma sanguigno di ratto indotta da ioni rame. Il CE-OOH si accumula nelle placche aterosclerotiche e per questo motivo è stato utilizzato come indice di perossidazione lipidica per valutare l'effetto inibitorio degli antiossidanti sui lipidi ossidati nel plasma sanguigno. I derivati dell'acido caffeolchinico inibiscono notevolmente il CE-OOH. In particolare, i derivati dell'acido dicaffeoilchinico hanno mostrato una capacità relativamente maggiore di inibire la formazione di CE-OOH rispetto ai derivati dell'acido monocaffeoilchinico e dell'acido caffeico. Inoltre, questa importante attività è dimostrata dai loro significativi effetti scavenging, come evidenziato dal saggio DPPH eseguito. L'attività di rimozione dei radicali DPPH e gli effetti chelanti dei derivati dell'acido caffeoilchinico sono risultati

proporzionalmente correlati al numero di gruppi catecolici. Pertanto, i derivati dell'acido dicaffeoilchinico, isolati da *S. herbacea*, contenenti un gruppo catecolo possono agire come eccellenti radical scavenger e agenti chelanti dei metalli [39].

L'acido 3-caffeoil-4-diidrocaffeoilchinico (CDCQ), noto come acido tungtungmadico, è stato isolato da *S. herbacea*. Si tratta di un derivato naturale dell'acido clorogenico con un'elevata attività antiossidante nel test di rimozione dei radicali liberi e nel test di perossidazione lipidica microsomiale epatica indotta dal ferro. Inoltre, mostra un effetto significativo nel proteggere il DNA plasmidico dalla rottura del filamento indotta da acido Fe^{3+}-nitrilotriacetic-hydrogen peroxide [37]. Sono stati dimostrati gli effetti antiossidanti, antinfiammatori e antitumorali del CDCQ sulla produzione di ossido nitrico (NO) e sulla fosforilazione di eNOS nelle cellule endoteliali. Il CDCQ ha indotto la fosforilazione di eNOS e la produzione di NO attraverso la fosforilazione di PKA, CaMKII, CaMKKβ e AMPK nelle cellule endoteliali. Inoltre, il CDCQ ha mostrato attività sul canale del Ca^{2+} di tipo L (LTCC), presente nella membrana delle cellule endoteliali, e ha mediato la segnalazione aumentando l'afflusso di Ca^{2+} intracellulare (Figura 3) [40]. Nel complesso, il CDCQ esercita un significativo effetto protettivo sulla funzione delle cellule endoteliali, importante per modulare l'emostasi, il flusso sanguigno e la salute vascolare [41,42].

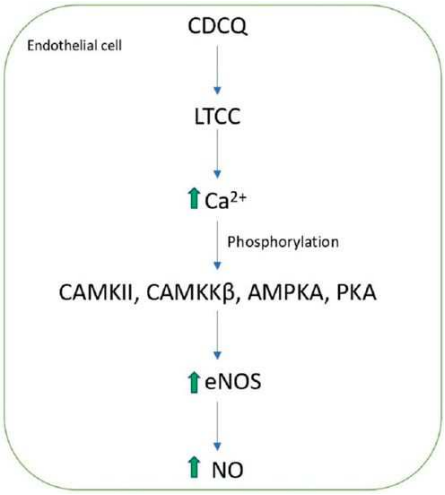


Figura 3. Meccanismo dell'acido 3-caffeoil-4-diidrocaffeoilchinico (CDCQ) su eNOS e NO nelle cellule endoteliali.

L'acido ferulico è abbondante nelle piante ed è principalmente coniugato con mono- e oligosaccaridi e lipidi. L'acido *trans*-ferulico (TFA) è stato il componente più abbondante

identificato nella polvere di *S. europaea* desalinizzata (DSP), mostrando effetti biologici significativi. Somministrato a ratti con obesità indotta da HFD, il DSP ha ridotto l'aumento di peso corporeo, la massa grassa addominale e i profili lipidici sierici. Inoltre, ha inibito l'adipogenesi e la differenziazione degli adipociti attraverso la down-regolazione dei regolatori trascrizionali specifici degli adipociti SREBP1, FAS, C/EBPa e PPARc. Questi risultati dimostrano quindi che la DSP e, in particolare, il TFA possono proteggere dall'obesità indotta da HFD [43].

Un'altra ricerca ha esaminato gli effetti biologici degli acidi *trans*-ferulico (2,60 ± 0,33 mg/g) e *p*-cumarico (3,19 ±0,47 mg/g) isolati da *S. europaea*. In particolare, i due acidi contenuti negli estratti di Salicornia sono stati studiati per il loro effetto sulla disfunzione vascolare e sull'ipertensione. L'acido *p*-cumarico e l'acido *trans*-ferulico hanno indotto vasorilassamento in modo dose-dipendente nell'arteria coronaria sulla disfunzione vascolare indotta da un elevato contenuto di sale [20].

Wang et al., 2013, hanno isolato per la prima volta (da *S. herbacea*) il pentadecilferulato, un estere alchilico dell'acido ferulico. Questo composto ha mostrato un'attività antiossidante superiore a quella dell'acido ascorbico e di altri derivati dell'acido ferulico nel saggio DPPH, probabilmente grazie alla sua struttura caratterizzata da una catena di alcani lunghi (15 atomi di carboni0). Inoltre, ha mostrato attività antitumorale in cellule di epatocarcinoma HepG2 e di adenocarcinoma polmonare A549 [11].

Vari estratti di *S. europaea* raccolti da due diverse regioni della Tunisia sono stati valutati per la loro attività antimicrobica, utilizzando il metodo di diffusione su agar. I due diversi estratti etanolici hanno mostrato un elevato contenuto di fenoli totali (TPC, 43,1 ± 0,2 e 32,1 ± 0,3 mg GAE/g p.c.) con una ricca composizione in acidi fenolici, tra cui l'acido gallico (0,8 mg/g p.c.) , l'acido clorogenico (0,22 mg/g p.c.), l'acido vanillico (0,69 mg/g p.c.), l'acido caffeico (0,28 mg/g p.c.) e l'acido cumarico (0,32 mg/g p.c.), ma anche di catechina idrata (1,17 mg/g p.c.) e rutina idrata (10,05 mg/g p.c.). A causa della differenza strutturale del loro strato lipidico, i batteri Gram-positivi sono risultati significativamente più sensibili ai due estratti e hanno mostrato più zone di inibizione rispetto ai batteri Gram-negativi [23]. Pertanto, si potrebbe ipotizzare un effetto sinergico degli acidi fenolici con gli altri composti per l'attività antimicrobica degli estratti di *S. europaea* [24,45]. Un altro studio [45] ha confermato l'attività antimicrobica di altre piante alofite, come *S. brachiate*, i cui estratti sono risultati molto efficaci contro i batteri Gram-positivi.

L'effetto dell'estratto etanolico di *S. ramosissima* è stato valutato sul danno testicolare indotto dal tetracloruro di carbonio (CCl_4) in un modello murino. La composizione

fitochimica dell'estratto ha mostrato la presenza di composti fenolici e alifatici noti, come il linolenoato di etile (0,44 mg/g p.c.), il sitostanolo (0,09 mg/g p.c.), l'ottadecile (0,12 mg/g p.c.), l'eicosanile (0,09 mg/g p.c.), (E)-ferulato, l'etile (E)-2-idrossicinnamato (0,06 mg/g p.c.) e la scopoletina (0,09 mg/g p.c.). I risultati dell'analisi istopatologica hanno mostrato che il trattamento con l'estratto etanolico prima della somministrazione di CCl_4 ha impedito in modo significativo il disordine architettonico dell'epitelio seminifero e lo sfaldamento delle cellule germinali. Pertanto, la natura dei composti estratti suggerisce un significativo valore terapeutico sul sistema riproduttivo maschile, soprattutto grazie all'azione antiossidante dei suoi costituenti, oltre ad altri effetti terapeutici e nutrizionali di alcuni composti isolati [46].

1.2.2 Flavonoidi

I flavonoidi sono i più importanti composti fitochimici presenti in molte piante, frutta e verdura, che conferiscono numerosi benefici per la salute, tra cui effetti antitumorali, antiossidanti, antinfiammatori, antivirali, neuroprotettivi e cardioprotettivi [47]. La loro struttura chimica, in particolare la presenza di gruppi idrossilici, influenza la loro biodisponibilità e attività biologica [48,49]. I flavonoidi possiedono uno scheletro di base di flavoni a 15 atomi di carbonio con due anelli benzenici (A-B) collegati da un anello piranico a tre atomi di carbonio. La posizione dell'anello B del catecolo e il numero di gruppi idrossilici sull'anello B influenzano la loro capacità antiossidante [50,51].
Rutina, isorhamnetina, quercetina, quercetina 3-O-β-D-glucopiranoside, isorhamnetina 3- O-β-D-glucopiranoside, noreugenina e isoquecitrina sono i composti più diffusi nella Salicornia. Questi composti, in particolare la quercetina, la rutina e l'isorhamnetina 3-O-β-D-glucopiranoside, hanno una rilevante attività antidiabetica, di protezione cardiovascolare e antitumorale grazie al loro potenziale antiossidante [52,53].
L'isoramnetina 3-O-β-D-glucopiranoside, isolata da *S. herbacea*, ha mostrato un'attività di scavenging dei radicali intracellulari. Inoltre, ha partecipato alla modulazione dello stato redox cellulare grazie all'induzione dei livelli di GSH cellulare e di altri enzimi antiossidanti. Pertanto, questo composto ha mostrato un effetto rilevante nella prevenzione del danno cellulare mediato dai radicali e potrebbe essere sviluppato come candidato per un potenziale uso come antiossidante naturale legato allo stress ossidativo

[54]. Negli estratti di *S. bigelovii e S. europaea* è stato rilevato un contenuto significativo (fino al 57,52% dei composti totali) di flavonoidi e glicosidi flavonoidi. Altri studi riportati in letteratura hanno isolato rutina idrata (10,05 mg/g p.c.) e catechina idrata (1,17 mg/g p.c.) da *S. europaea* [23,38,55].

Kim et al., 2011, hanno isolato un nuovo glicoside flavonoide, l'isoquercitrina 6"-O-metilossalato da *S. herbacea*; questo composto, insieme alla quercetina 3-O-β-D-glucopiranoside, ha mostrato una rilevante attività antiossidante rispetto ad altri composti flavonoidi che presentavano sostituzioni sul gruppo catecolico dell'anello B [56]. Pertanto, il gruppo catecolico dell'anello B ha un effetto importante sulle proprietà farmaceutiche della molecola. In particolare, influenza l'attività antiossidante dei flavonoidi, come riportato da studi precedenti [57].

I glicosidi flavonolici, isoquercitrina 6″-O-metilossalato, isorhamnetina 3-O-β-D-glucopiranoside e quercetina 3-O-β-D-glucopiranoside isolati da un estratto di *S. herbacea* sono stati esaminati in macrofagi e trofoblasti per testare le loro proprietà infiammatorie. Il trattamento di questi composti nei macrofagi derivati dal midollo osseo (BMDM) ha ridotto l'attività dell'inflammasoma (NLRP3) indotta dalla stimolazione con lipopolisaccaridi (LPS) e adenosina trifosfato e ha diminuito la produzione di interleuchina (IL)-1β. Inoltre, l'estratto ha diminuito l'espressione dell'mRNA di NLRP3, IL-1β e IL-6 nella linea cellulare di trofoblasto umano stimolata da LPS, inibendo la produzione di IL-6 e IL-1β e diminuendo l'espressione della ciclossigenasi-2 [58].

Da *S. Europaea* sono stati isolati altri interessanti flavonoidi come la luteolina (0,019 mg/g dw), il kaempferolo (108,1-247,6 mg/100 g dw) [59] e il suo derivato glucosidico [29]. Come le molecole precedenti, anche questi composti hanno attività antiossidanti, antinfiammatorie, antiapoptotiche e cardioprotettive [60].

Un altro studio ha esplorato gli effetti della frazione di acetato di etile dell'estratto di *S. europaea* sugli eventi aterosclerotici nelle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) e sulla formazione di neointima vascolare. I componenti più abbondanti erano cinque acidi fenolici e quattro flavonoli, tra cui l'acido protocatecuico (8,4 mg/g), il clorogenico (14,1 mg/g), l'acido caffeico (9,5 mg/g), l'acido *p*-cumarico (6,8 mg/g), acido ferulico (8,2 mg/g), quercetina-3O-β-D-glucopiranoside (3,4 mg/g), isorhamnetina-3O-β-D-glucopiranoside (16,2 mg/g), quercetina (2,5 mg/g) e isorhamnetina (18,4 mg/g). Lo studio ha dimostrato che l'estratto ha soppresso la migrazione e la proliferazione delle VSMC indotte dal fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF)-BB e ha aumentato la fosforilazione delle proteinchinasi attivate dal mitogeno (MAPK) e della

chinasi regolata dal segnale extracellulare (ERK)1/2 nelle VSMC, portando di conseguenza alla riduzione dell'iperplasia neointimale (Figura 4) [61].

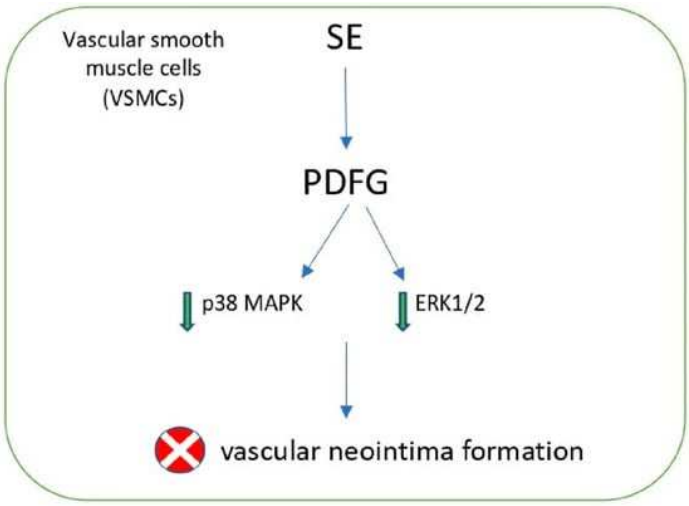


Figura 4. Inibizione della formazione di neointima da parte dell'estratto di *Salicornia* (SE) nelle VSMC.

Essaidi et al, 2013 hanno evidenziato come l'estratto di metanolo di *S. herbacea* fosse un potente inibitore del citocromo P450 CYP1A2, CYP3A4 e CYP2D6, correlato all'attivazione di agenti cancerogeni, grazie alla sua composizione fenolica caratterizzata dalla presenza di molti acidi fenolici e flavonoidi, come l'acido clorogenico, l'acido caffeico, l'acido siringico, l'acido *p*-cumarico, l'acido sinapico, l'acido ferulico, l'acido salicilico, la miricetina, la quercetina e il kampferolo [62,63]. È stato dimostrato che i flavonoli e i flavonoidi, in generale, come la quercetina e il kaempferolo, hanno un gruppo 3-OH e un idrossile fenolico con attività inibitoria sul CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A4 [64].

1.2.3 Lignani

I lignani sono una classe di composti naturali ampiamente prodotti da varie specie vegetali. Studi recenti hanno dimostrato che i lignani mostrano proprietà biologiche e farmacologiche molto importanti, tra cui effetti immunosoppressivi, antinfiammatori, cardiovascolari, antiossidanti, antitumorali e antivirali. Infatti, sono presenti in molte piante utilizzate nella medicina orientale [65,66]. I lignani contengono un'impalcatura

centrale formata da due o più unità fenilpropanoidi e monomeri come l'acido cinnamico, l'alcol cinnamilico, il propenilbenzene e l'allilbenzene [67].

Il siringaresinolo 4-O-β-D-glucopiranoside, l'eritro-1-(4-O-β-D-glucopiranosil-3,5-dimetossifenil)-2-siringaresinoxil-propan-1,3-diolo e il longifloroside B sono stati i principali lignani isolati da *S. europaea*. In particolare, il siringaresinolo 4-O-β-D-glucopiranoside ha mostrato interessanti attività biologiche, tra cui l'attività di scavenging del radicale DPPH, l'attività antiestrogenica contro le cellule MCF-7 e l'attività antitumorale contro la linea cellulare tumorale A549 [68]. È stato riscontrato che questo composto modula il metabolismo dei lipidi e del glucosio nelle cellule HepG2 e nei miotubi C2C12 [69]. Inoltre, da *S. europaea* sono stati isolati altri lignani come il (-)-siringaresinolo e l'episiringaresinolo-4″O-β-D-glucopiranoside. In particolare, il (-)-siringaresinolo (4,25 mg/Kg dw) è risultato possedere attività antiaggreganti piastriniche, di scavenging del radicale DPPH, di inibizione dell'ossido nitrico (NO) e di inibizione della glicoproteina P [27].

L'acantoside B è un altro importante lignano, estratto da *S. europaea*, che ha mostrato una tossicità trascurabile e un potenziale inibitorio dose-dipendente dell'ossido nitrico nelle cellule microgliali BV-2 stimolate dal lipopolisaccaride (LPS). Inoltre, ha attenuato i tratti amnesici simili all' Alzheimer (AD) provocati dalla scopolamina, ripristinando l'attività colinergica, sopprimendo la neuroinfiammazione e attivando la via TrkB/CREB/BDNF nei topi. Per questi effetti, l'acantoside B potrebbe essere un potenziale candidato per il trattamento delle malattie neurodegenerative (Figura 5) [70].

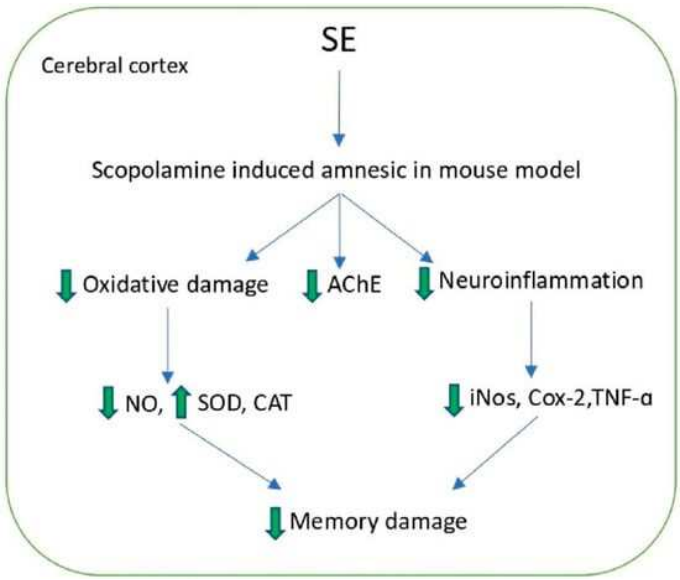


Figura 5. Effetto migliorativo dell'estratto di *Salicornia* (SE) sull'amnesia indotta dalla scopolamina.

1.3 Confronto tra i metodi di estrazione dei polifenoli dalla Salicornia

L'estrazione dalle piante è generalmente la fase cruciale per l'utilizzo dei loro composti bioattivi [71]. I composti bioattivi possono essere estratti da campioni di piante fresche o secche, prima pretrattati mediante triturazione, macinazione, e omogeneizzazione. Inoltre, i parametri fondamentali che influenzano la resa dell'estrazione, come il tempo e la temperatura di estrazione, il rapporto solvente/solido, il numero di ripetizioni e la scelta dei solventi di estrazione, possono essere opportunamente ottimizzati [13,72]. Idealmente, un metodo di estrazione dovrebbe essere non distruttivo e poco dispendioso in termini di tempo; inoltre, dovrebbe essere scelto in base alle caratteristiche chimico-fisiche dei composti da estrarre e al grado di purezza dell'estratto che si desidera ottenere [73].

L'estrazione solido-liquido convenzionale mediante macerazione in solventi organici è stata tradizionalmente utilizzata per estrarre composti fenolici da matrici vegetali. I principali svantaggi di questo processo includono il lungo tempo necessario al contatto solido-solvente per raggiungere l'equilibrio e l'uso di alte temperature che, sebbene possano favorire il trasferimento di massa solido-liquido dei composti, provocano spesso una diminuzione dell'efficienza di estrazione a causa della termosensibilità dei polifenoli [74]. Di conseguenza, per risolvere queste limitazioni, negli ultimi anni sono state sviluppate nuove tecniche per l'estrazione di composti bioattivi da materiali vegetali, tra cui l'estrazione assistita da ultrasuoni, l'estrazione assistita da microonde, l'estrazione assistita da enzimi e l'estrazione con fluidi supercritici [75].

1.3.1 Macerazione

La macerazione è un metodo tradizionale, basato sull'immersione di materiali vegetali in un solvente per il recupero di composti bioattivi. Con questa tecnica si utilizzano solventi organici, come il metanolo, l'acetone e l'acetato di etile, che sono tossici per la salute

umana e l'ambiente perché alcuni residui possono rimanere nell'estratto finale. Inoltre, questo metodo è associato ad alti volumi di solventi ed elevati tempi di estrazione che generano nello stesso tempo basse rese estrattive. Un altro svantaggio è l'alta temperatura che talvolta porta alla degradazione di polifenoli a causa dell'idrolisi e/o dell'ossidazione durante il processo [76,77].

Esistono numerosi studi sui parametri che influenzano il profilo e la resa dei polifenoli della Salicornia mediante macerazione. L'estrazione con il campione aggiunto ad acqua distillata bollente per 5 minuti ha mostrato una composizione fenolica degli estratti di *S. ramosissima* caratterizzata principalmente dalla presenza di miricetina, acido gallico, catechina, rutina, kaempferol-3-O-glucoside e quercetina-3-O-galattoside [78].

Altri studi hanno eseguito la macerazione a temperatura ambiente con un tempo di estrazione più lungo (16-24 h) [58,79]. Questa tecnica ha garantito il recupero di molti composti fenolici che potrebbero essere degradati ad alte temperature. L'estrazione con metanolo dalle parti aeree di *S. herbacea* ha permesso di identificare quattro nuovi derivati dell'acido dicaffeoilchinico e alcuni glucosidi flavonoidi [39].

Modificando la polarità dei solventi di estrazione è possibile ottenere un diverso tipo/gamma di polifenoli. Elevate quantità di composti fenolici si trovano principalmente nelle estrazioni con solventi polari. Gli estratti di etanolo di *S. europea* hanno mostrato la presenza di nove polifenoli, tra cui acidi fenolici (acido clorogenico e acido gallico) e flavonoidi (rutina idrata e catechina idrata) [23], mentre l'estrazione di *S. herbacea* con acetone all'80% a temperatura ambiente per 24h ha permesso di recuperare il pentadecil ferulato in alta resa [11].

Cinque acidi fenolici, tra cui l'acido protocatecuico, l'acido clorogenico, l'acido caffeico, l'acido *p*-cumarico e l'acido ferulico, insieme a quercetina-3-O-β-D-glucopiranoside, isorhamnetina-3-O-β-D-glucopiranoside, quercetina e isoramnetina, sono stati identificati in estratti di *S. europaea* ottenuti con un estrattore sottovuoto a 100 °C per 5h e sottoposti a precipitazione con etanolo per rimuovere i polisaccaridi ad alto peso molecolare e le proteine [62].

Ferreira et al. (2018) hanno eseguito un'estrazione con parti aeree fresche (1,2 kg) di *S. ramosissima*, tagliate in piccoli pezzi, ed estratte con etanolo (5 L) per tre volte a temperatura ambiente per 24 h utilizzando un agitatore magnetico [46].

Un altro studio ha effettuato un'estrazione su *S. ramosissima* utilizzando un bagno termostatico ad acqua. I campioni in polvere (2,5 g) sono stati mescolati con acqua distillata (25 mL) ed estratti a tempi e temperature diverse con un'agitazione costante di

200 rpm. Le migliori condizioni di estrazione sono state fissate a 80 °C in 10 minuti. Acidi idrossicinnamici, flavonoli e isoflavoni, noti per la loro eccellente capacità di scavenging contro i ROS, sono stati estratti e isolati da *S. ramosissima* che potrebbe essere considerata un'utile fonte di composti antiossidanti e neuroprotettivi con interessanti applicazioni nell'industria alimentare, nutraceutica e cosmetica [80].

1.3.2 Estrazione assistita da microonde (MAE)

L'estrazione assistita da microonde (MAE) è attualmente, uno dei metodi più avanzati nell'estrazione di matrici vegetali e si basa sull'effetto delle microonde con una frequenza compresa tra 0,3 e 300 GHz. A seconda della polarità del solvente e della presenza di ioni nel solvente (in genere si utilizzano metanolo, etanolo, acqua o loro miscele, che hanno una capacità di assorbimento delle microonde alta o media), il riscaldamento dielettrico e la conduzione ionica possono avvenire contemporaneamente provocando il rigonfiamento e la rottura della cellula vegetale, facilitando così l'estrazione dei polifenoli [81].

I vantaggi di questo metodo sono principalmente il riscaldamento rapido e l'efficienza di estrazione, le minori quantità di solvente e il breve tempo di estrazione. La MAE viene solitamente eseguita a temperature più elevate (>80 °C), pertanto la sua applicazione per l'isolamento degli antiossidanti deve essere valutata attentamente [82].

L'unica relazione sull'applicazione di questa tecnologia all'estrazione di polifenoli dalla *S. euroapea* è quella di Silva et al. (2021), che hanno eseguito una MAE ottenendo migliori attività antiossidanti e antiradicaliche (65,56 mol FSE (ferrous sulphate equivalents/g dw) e 17,74 g AAE (ascorbic acid equivalents)/g dw per i saggi FRAP e ABTS, rispettivamente) rispetto all'estrazione convenzionale [79].

1.3.3 Estrazione assistita da Ultrasuoni (UAE)

L'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) utilizza gli ultrasuoni per migliorare la velocità di estrazione aumentando il trasferimento di massa e favorendo la rottura delle pareti cellulari grazie al ben noto “effetto cavitazione”, portando ad una maggiore resa del prodotto senza modificare la composizione dell'estratto [82].

Inoltre, l'UAE consente di ridurre i tempi di lavorazione, le perdite per degradazione termica, il consumo di solvente e di energia ed è compatibile con qualsiasi solvente, compresa l'acqua e altri solventi generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) [83].

L'influenza del tempo di estrazione, della temperatura, della concentrazione del solvente, del rapporto solido/liquido, della dimensione delle particelle, della potenza e della frequenza degli ultrasuoni sul recupero dei polifenoli dalla *Salicornia* è stata analizzata in molti studi.

Diversi ricercatori hanno eseguito estrazioni a 50 °C per diversi intervalli di tempo al fine di selezionare il tempo di estrazione più adatto a recuperare il più alto livello di sostanze fenoliche [45], anche se un tempo di estrazione di 20 minuti è stato dimostrato come la condizione migliore per recuperare quantità di composti antiossidanti dalla matrice *Salicornia* [84]. Per quanto riguarda il tipo e la concentrazione del solvente, in letteratura sono presenti diverse condizioni, dal 40% all'80% di etanolo, per il miglior recupero di acidi fenolici, alcoli fenolici e flavonoidi. La presenza di acqua riduce la viscosità della soluzione e aumenta il rigonfiamento della pianta, favorendo una resa maggiore [85,86]. L'effetto del tempo di estrazione (1, 9, 30, 51 e 60 minuti) e della potenza della sonicazione (100, 150, 275, 400 e 450 W) sull'estrazione dei polifenoli dalla *Salicornia* è stato studiato anche recentemente. Il contenuto più elevato di composti fenolici, compreso tra 16,3 e 20,0 mg GAE/g dw, e l'attività antiossidante complessiva sono stati ottenuti estraendo campioni di *S. ambigua o S. neei* (250 mg) con 15 mL di etanolo all'80% in un bagno a ultrasuoni impostando la potenza degli ultrasuoni e il tempo di estrazione a 275 W e 30 min, rispettivamente. Al contrario, un tempo di estrazione più lungo ha portato a contenuti inferiori di polifenoli, infatti è stata riscontrata una minore resa di estrazione dell'acido gallico con un tempo di estrazione di 50 minuti [87,88].

Quindici acidi idrossicinnamici (ad es, neoclorogenici, clorogenici, p-cumarici, ferulici e glicosidi caffeici) insieme a dimeri caffeoilchinici, come gli acidi 3,5-dicaffeoilchinico e 4,5-dicaffeoilchinico, e nove flavonoidi (glicosidi di quercetina e glicoside di apigenina) sono stati estratti *da S. ramosissima* aggiungendo 100 mL di soluzione etanolo:acqua (80:20, v/v) a 10 g di matrice fresca in un bagno ad ultrasuoni a 40 kHz e 220 W per 60 minuti a 25 ± 3 °C [89].

Kim et al. 2009 hanno eseguito l'estrazione dalla polvere di *S. herbacea* (5 g) mediante sonicazione, ma cambiando la composizione del solvente e la temperatura di estrazione con una frequenza di lavoro costante di 40 kHz. È stato osservato un aumento lineare del contenuto fenolico totale con l'aumento della concentrazione di etanolo e la diminuzione

della temperatura di estrazione; infatti, il contenuto fenolico massimo (50,36 mg GAE/g) è stato ottenuto con una concentrazione di etanolo del 76,82% e una temperatura di estrazione di 50 °C, mentre il contenuto fenolico più basso (33,09 mg GAE/g) è stato rilevato con una concentrazione di etanolo del 50% e una temperatura di estrazione di 40 °C [90].

Infine, Wang et al. hanno recentemente applicato un'efficiente associazione e combinazione di metodi estrattivi. I campioni di *S. bigelovii* sono stati estratti mediante macerazione con 16 mL di etanolo al 60% per 3h a 60 °C, seguita da un'estrazione in ultrasuoni a 200 W per 40 minuti. Questa tecnica ha fornito un elevato recupero di flavonoidi, tra cui rutina (20,23%), noreugenina (15,26%), isoquercitrina (7,13%), quercetina (2,54%), camellianina A (5,91%) e 7-O-β-D-glucopiranosil-metossicromone (1,04%) [20].

1.3.4 Estrazione con fluidi supercritici (SFE)

L'estrazione con fluidi supercritici (SFE) è un altro metodo green, rapido ed efficiente solitamente adottato per l'estrazione di composti naturali dalle piante. La SFE impiega fluidi supercritici a bassa viscosità ed elevata diffusività che, al punto critico (una specifica temperatura e pressione), diffondono nella matrice solida dissolvendo gli attivi in essa contenuti. Queste caratteristiche migliorano la diffusione e il trasferimento di massa e riducono i tempi di estrazione [91]. Il fluido supercritico più diffuso nelle estrazioni vegetali è la CO_2, che ha una temperatura critica molto bassa (31 °C) e può essere facilmente rimossa, consentendo un'estrazione rapida e selettiva [92]. Tuttavia, a causa dell'apolarità della CO_2, viene spesso utilizzato un co-solvente, come acqua, etanolo e metanolo, per consentire l'estrazione di composti più polari [93].

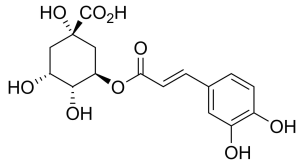
In questo contesto, alcuni ricercatori, effettuando l'estrazione di *S. europaea* a temperatura (50 °C) e pressione (300 bar) costanti con un flusso di CO_2 di 2 $Lmin^{-1}$ e diverse concentrazioni di etanolo (10, 20 o 40% v/v, rispettivamente), hanno osservato che sia i composti fenolici totali (TPC), sia la resa totale dell'estratto (TEY), sia i saggi antiossidanti (ABTS e FRAP) erano direttamente influenzati dalla percentuale di etanolo utilizzata nella tecnica SFE. Infatti, i valori di TPC (0,29 vs. 0,15 mg GAEs g^{-1} dw), TEY (16,30 vs. 11,01 mg g^{-1} dw), ABTS (1,16 vs. 0,71 mg TE (trolox equivalents) g^{-1} dw) e FRAP (10,22 vs. 5,22 µmol FeSO4 g^{-1} dw) al 20% di etanolo erano quasi doppi rispetto

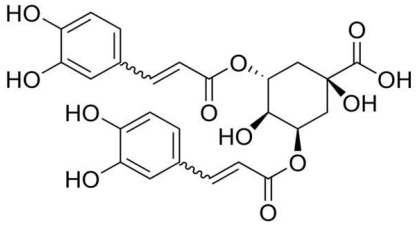
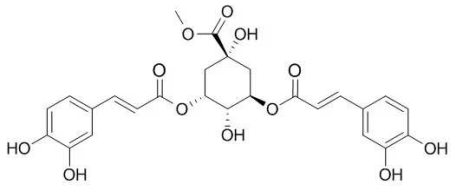
a quelli al 10% [81,94]. Il numero di cicli (un ciclo comprendeva 10 minuti di condizione statica e 10 minuti di fase dinamica) operati alla condizione precedente era cruciale per la resa: otto cicli erano la condizione di estrazione ottimale per ottenere un ricco profilo chimico [87].
Altri studi utilizzano la SFE per estrarre e analizzare il profilo degli acidi grassi della *Salicornia.* Come dimostrato da Adewale Folayan et al. 2019, sono state ottenute elevate quantità di acidi grassi saturi e insaturi, come l'acido miristico, palmitico, linoleico e linolenico [95].

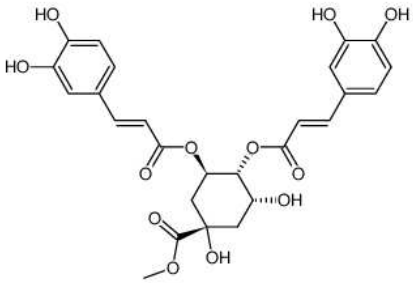
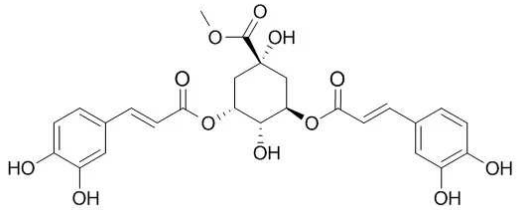
1.3.5 Estrazione assistita da enzimi (EAE)

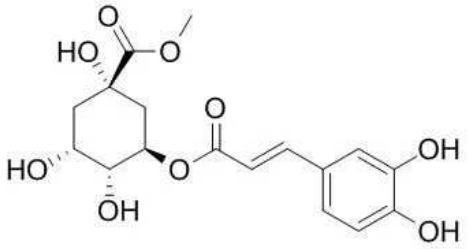
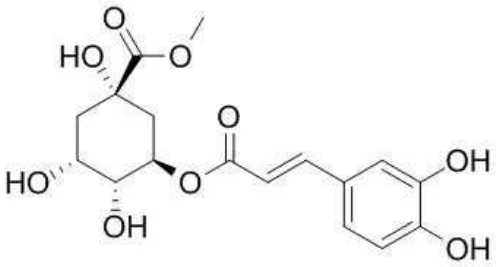
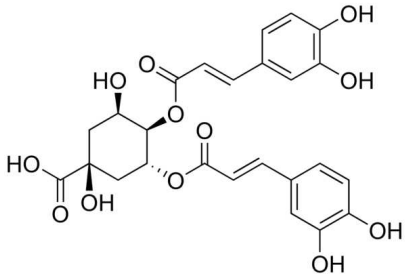
L' estrazione assistita da enzimi (EAE) è una tecnologia di estrazione green determinata da numerosi fattori, tra cui pH, temperatura, tempo di trattamento e selezione degli enzimi. In particolare, il monitoraggio del pH e della temperatura è essenziale per garantire un'attività enzimatica ottimale. La scelta dell'enzima giusto consente l'estrazione di composti specifici dalla matrice. Ad esempio, la pectinasi ha migliorato l'estrazione di polifenoli e fenoli difficili da estrarre a causa del loro alto peso molecolare [96]. La pectinasi idrolizza le macromolecole di pectina che costituiscono la membrana cellulare, esponendo i polifenoli intrappolati al solvente. Altri tipi di enzimi generalmente utilizzati nell'estrazione sono la cellulasi e l'emicellulasi, che partecipano alla rottura della parete cellulare [97]. L'EAE della *Salicornia* è spesso combinata con altre tecniche di estrazione, come descritto in vari studi. Estratti con un elevato contenuto di fenoli (in particolare, acido procatecico, caffeico e ferulico, quercetina e isorhamnetina) e una significativa attività radical scavenging sono stati ottenuti accoppiando l'EAE e l'UAE attraverso due step: in primo luogo, la Salicornia è stata sospesa in acqua e trattata con vyscozime (miscela di enzimi cellulitici) per 12 ore a 40 °C; successivamente, è stata estratta con ultrasuoni in etanolo per 3 ore [98]. In un altro studio l'isorhamnetina e l'acanthoside B sono stati estratti da *S. europaea* trattando la matrice con pectinasi e cellulasi a 50 °C per 15 h seguita da estrazione con UAE in etanolo al 50% per 3 h [99].

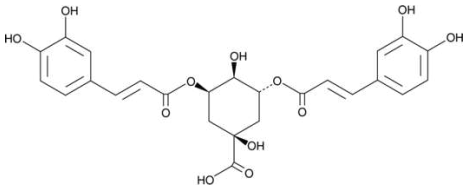
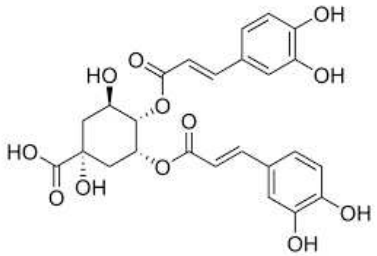
I principali polifenoli presenti nelle diverse specie di *Salicornia,* insieme alle loro quantità, alle tecnologie di estrazione e ai benefici per la salute sopra menzionati, sono riassunti nella Tabella 2.

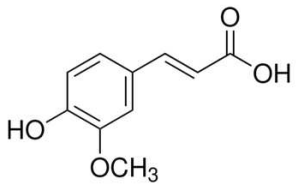
Polifenoli	Formula chimica	Tipo di Salicornia	Metodo di estrazione	Contenuto totale di polifenoli	Effetti benefici	Bibliografia
 Acido Clorogenico	$C_{16}H_{18}O_9$	*S. europaea,ramosissima, herbacea*	Macerazione in EtOH	0,22 mg/g		[21]
			Macerazione in H2O, 100 °C, 5 h.	14,1 mg/g dw		[60]
			UAE, 80% EtOH, 1h, 25 °C	53,19 ug/g fw	Attività Antipertensiva, Antimicrobica Riduzione iperplasia	[89] [61]
			Macerazione in 80% MeOH, RT, 72 h.	0,0758 mg/g dw		[78]

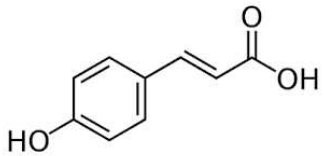
			Macerazione in acqua a 100°C, 5 min MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	0,0342 mg/g dw		
 Acido 3-caffeoil-5-diidrocaffeoilchinico	$C_{25}H_{24}O_{12}$	*S. herbacea*	Macerazione in MeOH 24h, RT	75,6 ± 2,3 mg/100 g peso fresco	Inibizione della formazione di CE-OOH	[37]
 Acido metil estere 3-caffeoyl-5-diidrocaffeoilchinico	$C_{26}H_{26}O_{12}$	*S. herbacea*	Macerazione in MeOH 24h, RT	69,3 ± 1,4 µg/100 g fw	Inibizione formazione CE-OOH	[37]

 acido metil estere 3-caffeoil-4-diidrocaffeoilchinico	$C_{26}H_{26}O_{12}$	*S. herbacea*	Macerazione in MeOH 24h, RT	71,9 ± 1.9 µg/100 g fw	Inibizione formazione CE-OOH	[37]
 acido metil estere 3,5-dihydrocaffeoylquinic acid methyl ester	$C_{26}H_{26}O_{12}$	*S. herbacea*	Macerazione in MeOH 24h, RT	171,9 ± 1,5 µg/100 g fw	Inibizione CE-OOH formation	[37]

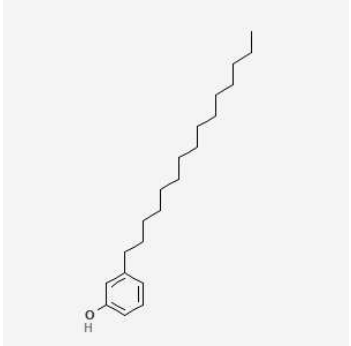
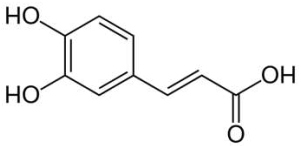
 acido 3-caffeoilchinico	$C_{16}H_{18}O_9$	*S. herbacea*	Macerazione in MeOH 24h, RT		Inibizione CE-OOH formation	[37]
 Acido 3-caffeoilchinicometilesterico	$C_{17}H_{20}O_9$	*S. herbacea*	Macerazione in MeOH 24h, RT		Inibizione formazione CE-OOH	[37]
 acido 3-caffeil-4-dicaffeilchinico	$C_{25}H_{26}O_{12}$	*S. herbacea*	Macerazione in 80% MeOH, RT	8mg/kg dw	Effetto protettivo su funzione endoteliale	[41,61]

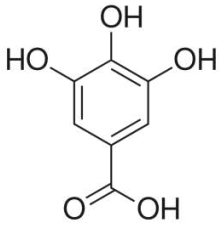
(Acido tuntugmadico)						
 3,5-Acido dicaffeoilchinico	$C_{25}H_{24}O_{12}$	*S. ramosissima*	UAE, 80% EtOH, 1h, 25 °C	25,83 ug/g fw	Attività Antiproliferativa e antipertensiva	[89]
			Macerazione in H_2O a 100°C, 5 min	0,0259 mg/g dw		[78]
			MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	0,0280 mg/g dw		
	$C_{25}H_{24}O_{12}$	*S. ramosissima*	UAE, 80% EtOH, 1h, 25°C	11,75 ug/g fw	Attività Antiproliferativa e antipertensiva	[89]

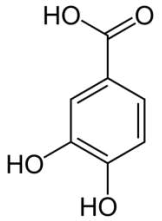
Acido 4,5-dicaffeoilchinico						
			Macerazione in H_20	2,60 ± 0.33 ug/g		[18]
 Acido trans-ferulico	$C_{10}H_{10}O_4$	*S. europaea, herbacea, ramosissima*	EAE, 37°C, 6 h	8,2 mg/g dw	Attività antidiabetica e antipertensiva Inibizione citocromo P450	[60]
			Macerazione in H2O, 100 °C, 5 h.	4,21 ug/g fw		[98]
			UAE, 80% EtOH, 1h, 25°C	8,45 mg% dw		[61]
			EAE 12h,40°C +			

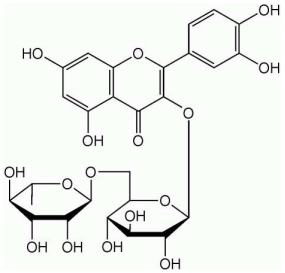
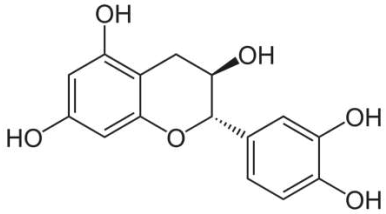
			UAE in EtOH 3h	0,1346 mg/g dw		[78]
			Macerazione in MeOH, RT, 72 h.	0,0578 mg/g dw		
			Macerazione in 100°C H_20, 5 min			
			MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W			
 Acido *p*-cumarico	$C_9H_8O_3$	*S. europaea, herbacea, ramosissima*	Macerazione in H_20	3,19 ug/g dw	Attività Antipertensiva inibizione cytocromo P450	[18] [60]

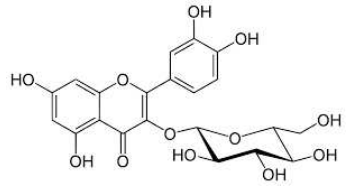
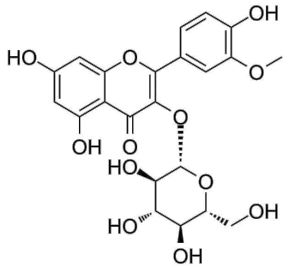
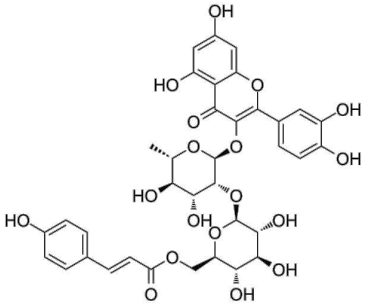
	Macerazione in H2O, 100 °C, 5 h.	0,32 mg/g dw	
	UAE, 80% EtOH, 1h, 25°C	2,75 ug/g fw	[61]
	Macerazione in MeOH RT, 72 h.		[78]
		0,0483 mg/g dw	
	Macerazione in H_20 100°C, 5 min	0,0349 mg/g dw	
	MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 w		

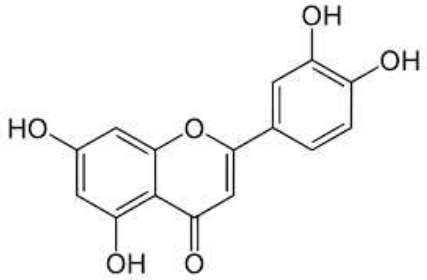
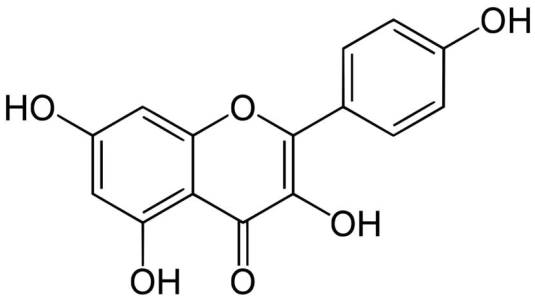
 Pentadecilferulato	$C_{25}H_{40}O_4$	*S. herbacea*	80% acetone, RT, 24 h.	–	Anticancer activity	[8]
 Acido caffeico	$C_9H_8O_4$	*S. europaea, herbacea, ramosissima*	Macerazione in EtOH	0,28 mg/g dw		[21]
			Macerazione in H2O, 100 °C, 5 h.	9,5 mg/g dw	Attività antibatterica	[60]
			EAE	6,87 mg% dw	Inibizione citocromo P450	[98]
			12h,40°C + UAE in EtOH 3h	0,0144 mg/g dw		[78]

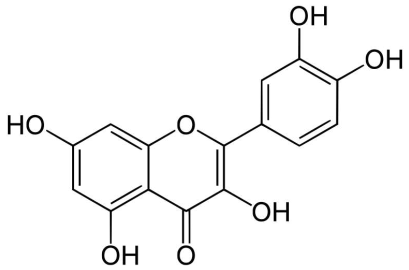
			Macerazione in acqua a 100°C, 5 min MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	0,0032 mg/g dw		
 Acido gallico	$C_7H_6O_5$	*S. europaea*	Macerazione in EtOH	0,8 mg/g dw		
			Macerazione in acqua a 100°C , 5 min MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	0,21 mg/g dw 0,15mg/g dw	Attività antibatterica Inibizione citocromo P450	[21] [78]

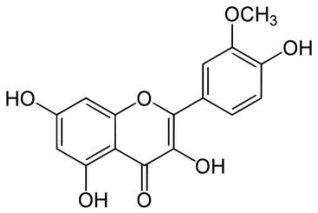
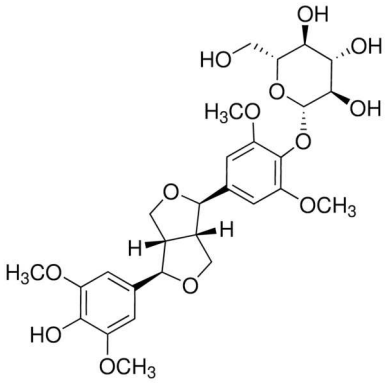
 Acido Protocatecuico	$C_7H_6O_4$	*S. europaea,herbacea, ramosissima*	Macerazione in H_2O, 100 °C, 5 h.	8,4 mg/g dw	Miglioramento e prevenzione delle malattie vascolari	[60]
			EAE 12h,40°C + UAE in EtOH 3h	1,54 mg% dw		[98]
			Macerazione in H_2O a 100°C , 5 min	0,1275 mg/g dw		[78]
			MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	0,0929 mg/g dw		

 Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	*S. europaea, ramosissima*	Macerazione in EtOH Macerazione in acqua a 100°C , 5 min MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	10,05 mg/g dw 0,0999 mg/g dw 0,0781 mg/g dw	Attività antibatterica	[21] [78]
 Catechina	$C_{15}H_{14}O_6$	*S. europaea, ramosissima*	Macerazione in EtOH Macerazione in H_2O a 100°C, 5 min MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	1,17 mg/g dw 0,1116 mg/g dw 0,0046 mg/g dw	Attività antibatterica	[21] [78]

 Isoquercitrina 6-O-metilossalato	$C_{24}H_{23}O_{16}$	*S. herbacea*	Macerazione in MeOH, RT, 24 h	0,47 mg/kg fw	Attività antinfiammatoria	
 Isorhamnetina 3-O-β-D-glucopiranoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	*S. herbacea*	Macerazione in H_2O , 100 °C, 5 h. Macerazione in MeOH, RT, 24 h	16,2 mg/g dw 1,25 mg/kg fw	Attività antinfiammatoria Miglioramento e prevenzione delle malattie vascolari	[60] [55]
 Quercetina 3-O-β-D-glucopiranoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	*S. herbacea*	Macerazione in H_2O , 100 °C, 5 h. Macerazione in MeOH, RT, 24 h.	3,4 mg/g dw 2,15 mg/kg fw	Miglioramento e prevenzione delle malattie vascolari	[60] [55]

 Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	*S. europaea*		0,019 mg/g dw		
 Kampferolo	$C_{15}H_{10}O_6$	*S. europaea, herbacea, ramosissima*	UAE, 80% EtOH, 1h, 25°C	108,1-24,.6 mg/100 g 10,90 ug/g		[89]
			Macerazione in H_2O a 100°C, 5 min	0,0052 mg/g dw	Inibizione citocromo P450	[78]
			MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	0,0047 mg/g dw		[61]

			Macerazione in MeOH, RT 72 h.			
 Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	*S. europaea, herbacea, ramosissima*	Macerazione in H_2O, 100 °C,5 h	2,5 mg/g dw		[60]
			EAE 12h,40°C + UAE in EtOH 3h	12,63 mg%dw	Inibizione cytochrome P450 Miglioramento e prevenzione delle malattie vascolari	[98]
			Macerazione in boiling water, 5 min MAE, 5–10 min 72–94 °C, 300 W	0,0340 mg/g dw 0,0284 mg/g dw		[78]

 Isorhamnetina	$C_{16}H_{12}O_7$	*S. europaea, herbacea*	Macerazione in H_2O, 100 °C, 5 h. EAE 12h,40°C + UAE in EtOH 3h	18,4 mg/g dw 6,65 mg% dw	Miglioramento e prevenzione delle malattie vascolari	[60] [98]
 Syringaresinolo-4-O- β -D-glucopyranoside	$C_{28}H_{36}O_{13}$	*S. europaea*	-	-	Attività antiestrogenica e antitumorale	

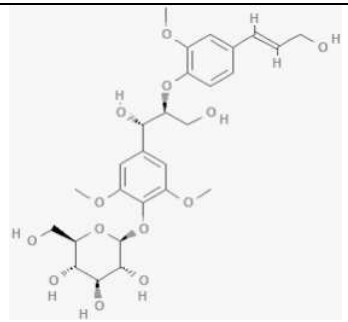
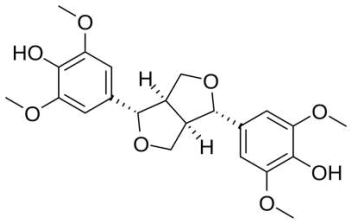
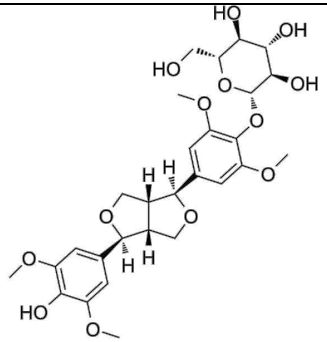
 Longifloroside B	$C_{27}H_{36}O_{13}$	*S. europaea*				
 (-)-siringaresinolo	$C_{22}H_{26}O_8$	*S. europaea*	-	4,25 mg/Kg		
 Acantoside B	$C_{28}H_{36}O_{13}$	*S. europaea*	EAE 50°C, 15h + Macerazione in 50% EtOH, 3h	2,40 mg/g	Attività neuroprotettiva	[99]

Tabella 2. Metodi di estrazione, quantità ed effetti salutari dei polifenoli della *Salicornia.*

1.4 Solventi eutettici (DESs e NADESs)

Con l'aumento delle tecniche green e sostenibili, si sta concentrando la ricerca su solventi alternativi per sostituire quelli tradizionali. Uno dei modi più efficienti per ottenere processi più ecologici è la sostituzione di solventi pericolosi e inefficienti con altri più sicuri ed efficienti. Una classe di solventi che soddisfa questi criteri è rappresentata dai Deep Eutectic Solvents (DESs). I DESs sono in linea con i 12 principi della chimica verde e presentano molti notevoli vantaggi quali il basso costo, la facilità di sintesi e l'elevata biodegradabilità [100]. I Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) si differenziano dai DES in quanto sono composti da componenti presenti in natura e generalmente riconosciuti come sicuri (Generally Recognized As Safe - GRAS) [101]. Inoltre il loro uso è consentito nelle formulazioni alimentari e farmaceutiche [102].

I DES sono miscele eutettiche liquide di accettori di legami idrogeno (HBA) e donatori di legami idrogeno (HBD) (Fig. 6). L'instaurarsi di legami a idrogeno (H-bonds) porta alla formazione di una miscela eutettica omogenea dopo una semplice agitazione di questi componenti a temperature moderate. I DESs possono essere preparati con un'ampia gamma di sostanze chimiche. Il cloruro di colina (ChCl) funge solitamente da HBA, mentre i carboidrati, gli alcoli, gli acidi, le ammidi e i composti fenolici fungono da HBD. I DESs a base di ChCl sono i solventi più utilizzati per estrarre efficacemente i polifenoli.

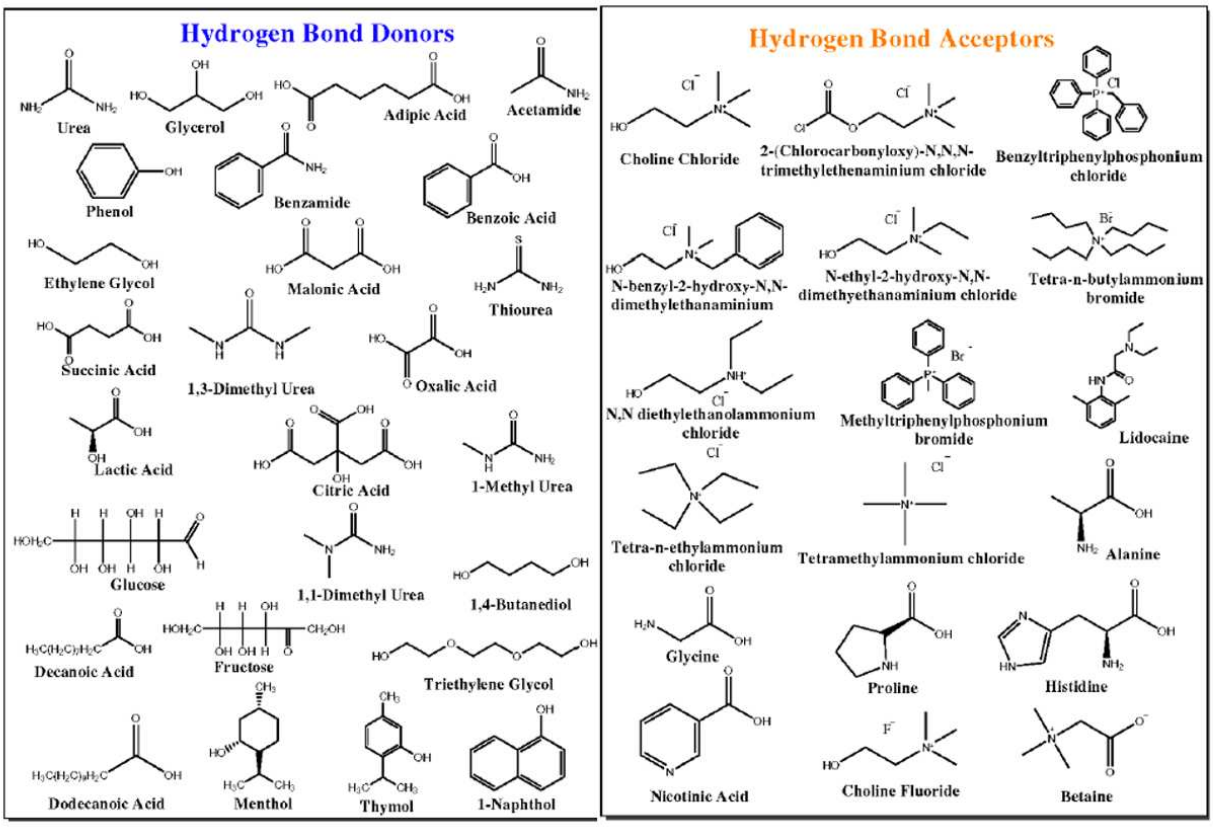


Figura 6. HBA e HBD più comuni per la sintesi dei DESs/NADESs [103].

In generale, la polarità, la diffusività, il punto di fusione, la viscosità e la conduttività sono proprietà fisico-chimiche cruciali dei DESs che influenzano la resa di estrazione dei polifenoli. Le proprietà fisico-chimiche dei DESs variano a seconda delle loro strutture. Fondamentalmente, i punti di fusione dei DESs sono significativamente più bassi dei punti di fusione dei loro singoli componenti [104,105]. Si ritiene che il rapporto tra i donatori di legami a idrogeno dei DESs determini il loro punto di fusione perché l'aumento delle interazioni di legame a idrogeno con i gruppi anionici provoca una riduzione delle interazioni con i gruppi cationici. Questa debole interazione tra i gruppi anionici e cationici porta alla riduzione del punto di fusione [106].

Il tipo di donatore di legami idrogeno, il tipo di sale e il loro rapporto molare sono i fattori che influenzano la densità, la tensione superficiale e la viscosità dei DESs [106,107]. I DESs hanno, in generale, una maggiore viscosità e una minore conduttività rispetto ad altri solventi molecolari. La viscosità dei DESs è molto elevata, ciò è dovuto alla presenza di un'estesa rete di legami a idrogeno tra i composti, che limita la mobilità delle molecole libere all'interno dei DESs. Anche altre interazioni, come quelle di van der Waals ed elettrostatiche, possono contribuire all'elevata viscosità dei DESs. Per ovviare a questo

inconveniente si è sempre fatto ricorso all'aggiunta di acqua, in quantità non eccessiva, che potrebbe contribuire all'indebolimento delle interazioni di legame a idrogeno tra i costituenti dei DESs [108,109].

Analogamente all'andamento della viscosità, la tensione superficiale dei DESs presenta una correlazione lineare con la temperatura, con una diminuzione della tensione superficiale all'aumentare della temperatura. In generale, i DESs sono noti per avere una tensione superficiale più elevata rispetto alla maggior parte dei solventi convenzionali. [110].

La densità è un'altra importante proprietà fisico-chimica di un solvente. È stato riportato che la maggior parte dei DESs ha una densità superiore a quella dell'acqua. I rapporti molari dei componenti dei DESs hanno effetti importanti nel modulare le densità dei DESs. Come riportato in uno studio precedente, un aumento del rapporto tra ChCl e glicerolo (HBD) ha portato a una diminuzione della densità della miscela. I range di polarità dei DES dipendono dalle composizioni dei DESs. Si ritiene che le polarità dei DES siano legate alla struttura molecolare del donatore di legami idrogeno. Un altro fattore importante è la temperatura dei DESs, in quanto l'aumento della temperatura porta a una diminuzione della loro polarità. Inoltre, l'aumento della temperatura comporta anche una riduzione dell'acidità dei DESs [110,111,112].

Inoltre, si ritiene che i DESs abbiano una buona solubilità per molti componenti, tra cui specialmente farmaci e attivi di origine naturale. È stato ipotizzato che gli accettori di legami a idrogeno nei DESs siano di vitale importanza per migliorare l'efficienza della dissoluzione degli ingredienti farmaceutici, come l'acido fenilacetico, l'acido acetilsalicilico e l'acido benzoico. I DESs ChCl:urea e ChCl:acido malonico (con rapporti 25:75 e 50:50) hanno dimostrato avere una buona solubilità nei confronti di farmaci scarsamente solubili, come griseofulvina, itraconazolo, acido benzoico [113,114].

La caratteristica principale dei DESs come agenti estrattivi per i prodotti naturali è la loro capacità di dissoluzione degli attivi naturali, ovvero la capacità di donare e accettare protoni ed elettroni. Ciò favorisce l'instaurarsi di legami idrogeno tra le molecole. Anche le variabili proprietà fisico-chimiche dei DESs, come la loro viscosità e polarità, sono importanti nel processo di estrazione. Ad esempio, la differente polarità dei DESs li rendono solventi efficienti per l'estrazione di diversi gruppi di composti naturali. I DESs sono altamente viscosi, il che potrebbe ostacolare il trasferimento di massa e ridurre la resa dell'estrazione, ma la loro viscosità può essere ridotta in modo significativo

aggiungendo semplicemente una quantità adeguata di acqua. Ciò comporta inoltre una diminuzione della basicità e un aumento della polarità [111,115,116].

Il processo di estrazione dei polifenoli con i DESs comprende il trasferimento di massa da una fase solida a una liquida e la dissoluzione dei polifenoli. I DESs sono buoni solventi con basse proprietà di solvatazione e possono solvatare altamente i polifenoli grazie alle loro polarità simili e alle interazioni chimiche, come i legami H, le interazioni dipolo-dipolo e le forze di van der Waals. Le interazioni dei legami H tra i DESs e i polifenoli sono così forti da superare le altre forze elettrostatiche. Le interazioni di van der Waals diventano più deboli degli ingombri sterici dei gruppi eterei, con conseguente dispersione degli anelli aromatici nei DESs. L'elevata dissoluzione dei polifenoli e la diffusività dei DESs facilitano la diffusione delle molecole di polifenoli all'esterno delle cellule vegetali. Tuttavia, sperimentalmente, è costoso e richiede tempo trovare il DESs ottimale per l'estrazione dei composti desiderati. A tal proposito l'utilizzo di metodi computazionali di screening e di predizione della solubilità [117,118] in grado di ottimizzare le condizioni di reazione e ridurre il numero di esperimenti necessari a trovare il solvente più adatto all'estrazione, come il COSMOtherm software (Conductor-like Screening Model for Real Solvents - COSMO-RS), rappresenta un ausilio importante ai fini dell'aumento della resa estrattiva.

In alcuni casi, dopo il processo di estrazione, il liquido risultante ricco di polifenoli viene estratto per recuperare i polifenoli utilizzando varie strategie, tra cui la retroestrazione, l'aggiunta di antisolvente e la cromatografia di adsorbimento con resine microporose. Tuttavia, quando si utilizzano i NADESs come mezzo di estrazione, il processo di recupero non è necessario. Inoltre, i NADESs possono essere utilizzati come sistema di stoccaggio per stabilizzare i polifenoli o come sistema di formulazione per distribuire i polifenoli nei prodotti farmaceutici, nutraceutici e cosmetici [119,120,121].

Recenti ricerche sugli estratti ricchi di polifenoli che utilizzano i NADESs hanno rivelato eccellenti attività antiossidanti e antiproliferative e una bassa citotossicità. Ad esempio, l'estratto di NADESs dalla buccia di mango è risultato in grado di ritardare l'ossidazione dell'olio di girasole e dell'olio di soia e di aumentare il tempo di conservazione, indicando il suo potenziale come conservante naturale. Inoltre, i NADESs hanno migliorato la biodisponibilità di flavonoidi, antociani, isoflavoni e rutina in cellule rispetto alle loro soluzioni acquose. Di conseguenza, gli estratti di NADESs ricchi di polifenoli potrebbero servire come agente per veicolare la somministrazione di attivi nell'industria farmaceutica e cosmetica. I risultati di farmacocinetica hanno mostrato che il NADESs ha migliorato

la biodisponibilità delle antocianine del 140% rispetto al solvente metanolo:acqua:acido formico [122,123,124]. Ritardando la neutralizzazione del chimo gastrico, i NADESs hanno migliorato la stabilità dei composti fenolici durante la digestione *in vitro*. Questi risultati implicano che, oltre a essere un solvente ecologico per l'estrazione dei polifenoli, il NADESs può essere impiegato come veicolo 'ready to use' per migliorare l'assorbimento orale di attivi polifenolici.

Pertanto, gli estratti di NADESs ricchi di polifenoli possono essere facilmente utilizzati come ingredienti o additivi per vari prodotti. I solventi eutettici (DESs) e i solventi eutettici naturali (NADESs**)** offrono soluzioni innovative ai problemi ambientali e industriali derivanti dall'uso di solventi tossici e non biodegradabili. I NADESs, in particolare, rappresentano un'alternativa verde e sicura, adatta per applicazioni biologiche e farmaceutiche, grazie alla loro composizione naturale e alla biocompatibilità. L'uso di questi solventi potrebbe svolgere un ruolo cruciale nel promuovere la green chemistry riducendo l'impatto ambientale.

1.5 Ottimizzazione dell'estrazione

Attualmente, la ricerca sta focalizzando la sua attenzione nell'applicazione di tecniche adeguate per l'estrazione di composti bioattivi da matrici vegetali, che consentano di risparmiare tempo ed energia ed avere abbondanti rese [125,126]. In questo senso, l'estrazione green, basata sull'uso di solventi alternativi (acqua, etanolo o loro miscele) e di prodotti naturali rinnovabili e sulla messa a punto di processi di estrazione più rapidi con operazioni unitarie e consumi energetici ridotti, si adatta perfettamente allo scopo sopra menzionato. Il consumo di energia può essere ridotto, ad esempio, ottimizzando i parametri operativi dei processi di estrazione (il tempo di estrazione, il rapporto solvente-solido e la temperatura), in particolare attraverso tecnologie innovative (ad esempio, ultrasuoni). In molti casi, queste tecnologie innovative appaiono efficienti dal punto di vista energetico, poiché consentono di raggiungere rese massime in tempi di estrazione ridotti. Per trovare le condizioni migliori per massimizzare il recupero dei composti bioattivi, l'uso di modelli di ottimizzazione è essenziale [127]. La Response Surface Methodology (RSM), che consente l'ottimizzazione simultanea dei singoli fattori e delle loro possibili interazioni fornendo un'equazione polinomiale che si adatta ai dati

sperimentali, è solitamente preferita all'approccio più dispendioso che esamina un fattore alla volta [10,70].

Capitolo 2 Materiali e metodi

2.1 Reagenti chimici

Acetonitrile, etanolo, acido formico e acqua di grado HPLC-DAD sono stati forniti da Merk Life Science S.r.l. (Milano, Italia). L'acetonitrile, l'acqua e l'acido formico di grado HPLC-MS sono stati ottenuti da Romil (Deltek, Italia). Gli standard di riferimento dei composti naturali sono stati forniti da Extrasynthese (Lione, Francia) o Merck Chemicals (Milano, Italia). L'isorhamnetin-3-O-glucoside e l'isorhamnetin-3-O-rutinoside sono stati acquistati da Extrasynthese (Genay, Francia) e utilizzati come standard di riferimento HPLC; il 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH), il metanolo, il reagente di Folin-Ciocalteu, l'acido gallico (GA) e il carbonato di sodio sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Il sale di ammonio 2,20-Azinobis (acido 3-etilbenzotiazolinico-6-solfonico) (ABTS) è stato acquistato da Alfa Aesar (Karlsruhe, Germania). I reagenti per la sintesi dei solventi eutettici colina cloruro, xilitolo, urea, prolina, acido malico, betaina e glucosio sono stati procurati da Merk Life Science S.r.l. (Milano, Italia).

2.2 Materiale vegetale

Gli esperimenti sono stati condotti su punte di *S. europaea* raccolte sulla costa adriatica pugliese (40° 59' 41.64“ N, 17° 13' 21.14” E) nel giugno 2023. I campioni raccolti sono stati congelati immediatamente a -2 °C e conservati al buio fino al momento dell'analisi. In seguito la *S. europaea* è stata essiccata in stufa per 48h alla temperatura di 40 °C. Successivamente è stata ridotta in polvere tramite macinazione con un omogeneizzatore di base IKA A11 (IKA®-Werke GmbH & Co., Staufen, Germania) e setacciata (Endecotts Ltd., Londra, Regno Unito) per ottenere una granulometria omogenea con particelle di diametro di circa 200 μm.

2.3 Estrazione polifenoli da *S. europaea*

250 mg di campione in polvere accuratamente pesati (EU-C1200, Gibertini s.r.l., Novate Milanese, Milano, Italia) in provette Eppendorf da 2 mL in presenza di acqua/etanolo

(1:1, v/v), sono stati utilizzati in ogni esperimento secondo le condizioni di estrazione previste dal disegno sperimentale. Per l'UAE dei polifenoli è stato utilizzato un bagno ad ultrasuoni (Elmasonic P30H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germania) funzionante in modalità continua a temperatura (25 ± 2 °C), potenza (100 W) e frequenza (37 kHz) fisse. Successivamente, gli estratti sono stati centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti a 25 °C (EPPENDORF 5810R, Amburgo, Germania), filtrati attraverso un filtro di cellulosa a siringa da 0,45 μm e analizzati mediante HPLC-DAD.

2.4 Disegno sperimentale e analisi statistica

Sulla base di esperimenti di screening preliminari è stato scelto come solvente di estrazione il rapporto acqua/etanolo (1:1, v/v). I valori del tempo di estrazione (X_1) e del rapporto solido-solvente (X_2), rispettivamente 10 minuti e 1:10 (mg/mL), sono stati esplorati per ottimizzare l'estrazione dei flavonoli da *S. europaea*. L'ottimizzazione dei fattori X_1 e X_2 è stata effettuata mediante un disegno sperimentale del tipo Central Composide Design (CCD) standard a due fattori. Sono stati condotti dodici esperimenti randomizzati, comprese quattro repliche al valore centrale del disegno per valutare la somma dei quadrati dell'errore puro e il test di lack of fit (Tab.3).

Estrazioni	Rapporto matrice:solvente	Tempo (min)
1	1:10	10
2	1:10	10
3	1:10	10
4	1:10	10
5	1:16	10
6	1:10	15
7	1:7	10
8	1:10	5

Estrazioni	Rapporto matrice:solvente	Tempo (min)
1	1:10	10
2	1:10	10
9	1:8	7.5
10	1:14	15
11	1:8	15
12	1:14	7.5

Tabella 3. Esperimenti di ottimizzazione del CCD

Il CCD è stato progettato e analizzato mediante RSM utilizzando il pacchetto software STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). È stata sviluppata un'equazione polinomiale del secondo ordine (modello quadratico) per adattare i dati sperimentali grezzi dei composti di isorhamnetina:

$$Yi = B_0 + \Sigma B_i X_i + \Sigma BiiXi2 + \Sigma BijXiXj$$

dove Yi è la funzione di risposta della variabile di output (concentrazione di isorhamnetina); B0 è un coefficiente costante; Bi sono i coefficienti di regressione dei termini lineari, quadratici e interattivi; e Xi, Xj rappresentano le variabili indipendenti. Dopo l'analisi della varianza (ANOVA), sono stati determinati i coefficienti di regressione dei singoli termini lineari, quadratici e di interazione e l'adattamento dei

modelli matematici è stato eseguito valutando l'R^2 e l'R^2_{adj}. Per convalidare il modello, sono stati eseguiti estratti sperimentali in triplo con le condizioni ottimizzate dell'UAE.

2.5 HPLC-DAD *Salicornia europaea* L.

Il metodo utilizzato per la valutazione quali-quantitativa del profilo polifenolico degli estratti di Salicornia ha previsto l'utilizzo di un sistema HPLC 1260 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), costituito da un degassatore, da un comparto colonna termostatato, da una pompa quaternaria per il trasporto dei solventi e da un sistema detector a serie di diodi (DAD). Sono stati iniettati 3 µl di campione attraverso una colonna a fase stazionaria inversa Zorbax SB-C18 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 3.5 µm (150 x 4.6 mm i.d.), protetta da una precolonna Gemini C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) 5 µm (4 x 2 mm i.d.), secondo il seguente gradiente di eluizione: Solvente A – H_2O/HCOOH 0.1%, Solvente B – CH_3CN:

Tempo (minuti)	%B
0.00	10.0
4.00	15.0
8.00	15.0
15.00	30.0
18.00	40.0
22.00	55.0
25.00	55.0
30.00	100.0
32.00	100.0
35.00	10.0

Tabella 4. Gradiente solvente B per analisi HPLC-DAD

La temperatura della colonna è stata mantenuta a 40 °C e la velocità di flusso della fase mobile è stata impostata a 0.8 mL/min. Le lunghezze d'onda (λmax), nell'intervallo 190-

400 nm, per la rivelazione UV sono state settate a 280 nm, 330 nm e 360 nm, corrispondenti ai massimi di assorbimento di acidi idrossibenzoici e catechine, acidi idrossicinammici e flavonoli, rispettivamente. L'identificazione del profilo polifenolico è stata effettuata per sovrapposizione dei cromatogrammi dei campioni ai cromatogrammi di standard puri, tenendo conto delle posizioni dei massimi di assorbimento (λ max), dei profili degli spettri di assorbimento e dei tempi di ritenzione.

2.7 HPLC-MS *Salicornia europaea* L.

La composizione dei flavonoidi dell'estratto di *S. europea* è stata stabilita utilizzando un sistema UHPLC Vanquish Flex interfacciato al Diode Array Detector FG e allo spettrometro di massa Orbitrap Exploris 120 (ThermoFisher Scientific, Milano, Italia), dotato di una sorgente di ionizzazione elettrospray riscaldata (HESI-II). Per la separazione cromatografica è stato utilizzato un gradiente binario di H2O (A) e MeCN (B), entrambi contenenti lo 0,1% di acido formico (0-3 min, 2% B; 3-5 min, 2-13% B; 5-9 min, 13% B; 9-12 min, 13-18% B; 12-13 min, 18% B; 13-17 min, 18-30% B; 17-20 min, 30% B; 20-30min, 30-40% B; 30-38min, 40-60% B; 38-39min, 60-98% B). La temperatura della colonna è stata impostata a 30°C e il volume di iniezione è stato di 5 µL. Gli spettri UV-VIS sono stati acquisiti nell'intervallo 200-600 nm. La rivelazione MS è stata eseguita in modalità di ionizzazione positiva e negativa, utilizzando una modalità di funzionamento Full MS (intervallo di scansione 300-1000 *m/z*) e una modalità di funzionamento dipendente dai dati (DDA), entrambe con una risoluzione di 30K (FWHM) e un'energia di collisione HCD a gradini di 20, 40 e 60 Hz. Per il controllo dello strumento e l'acquisizione dei dati è stato utilizzato il software XcaliburTM (versione 4.4, ThermoFisher Scientific). L'identificazione dei flavonoidi si è basata sui dati HRMS (masse precise, formule molecolari e spettri di frammentazione) e sugli spettri UV.

2.8 Selezione dei NADESs

Per calcolare la solubilità dei polifenoli e le condizioni ottimali di estrazione da *S. europaea* nei NADESs, è stato utilizzato il software BIOVIA COSMOtherm 2020, versione 20.0.0 (Dassault Systèmes, Parigi, Francia). La geometria molecolare e

l'ottimizzazione energetica dei composti dei DES e dei polifenoli utilizzati nel presente studio sono state realizzate con il software BIOVIA TmoleX19, versione 2021 (Dassault Systèmes, Parigi, Francia). Per la simulazione COSMO, il primo passo ha coinvolto l'ottimizzazione della geometria molecolare e della densità utilizzando la Trasformata Discreta di Fourier (DFT). In questo studio, ogni molecola è stata ottimizzata con il modello COSMO-BP-TZVP dal pacchetto software Tmolex, interfacciato con TURBOMOLE. I calcoli COSMO sono stati eseguiti con BIOVIA COSMOtherm 2020 (versione 20.0.0) utilizzando il funzionale BP_TZVP_C30_19. È stato osservato che la solubilità dei polifenoli in diversi solventi è inversamente correlata al coefficiente di attività (γ) del sistema.

2.9 Preparazione dei NADEs

Il NADESs è stato preparato secondo il metodo descritto da Panic et al. (2021) con alcune variazioni. I componenti del NADESs sono stati collocati in tubi separati, a cui è stato aggiunta acqua al 30% (v/v). Successivamente, è stato utilizzato un incubatore a secco oscillante adottando un numero di giri pari a 3000 rpm, temperatura di 50 °C e un tempo di 3h, fino ad ottenere un liquido omogeneo e limpido. Un elenco completo delle abbreviazioni dei NADESs e dei loro rapporti molari è riassunto nella Tabella 5.

HBA	HBD	Rapporto HBA:HBD	Nome estratto
Betaine	Citric acid	1:1	B:CA
Betaine	Surcrose	4:1	B:Suc
Choline Clorure	Urea	1:2	ChCl:U
Choline Clorure	Xilitol	5:2	ChCl:Xil
Citric acid	Glucose	1:2	CA:Glc
Proline	Malic acid	1:1	Pro:MA

Tabella 5. NADESs selezionati per l'estrazione di polifenoli da *S. europaea* L.

2.10 Estrazione dei polifenoli da *S. europaea* con NADESs

L'estrazione è stata eseguita in bagno ad ultrasuoni (Elmasonic P30H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germania). Tutte le estrazioni sono state condotte con una potenza di 100 W e frequenza di 37 HZ per 30 minuti ad una temperatura pari a 30 °C. Per l'estrazione sono stati utilizzati rapporti solido-liquido pari a 1:10 (g/mL) con 1g di Salicornia secca in 10 mL di NADESs selezionato. Inoltre, in parallelo come controllo, è stato effettuata un'estrazione in miscela idroalcolica di EtOH:H_20 (1:1 v/v), nelle stesse condizioni adottate per gli estratti in NADESs. In seguito gli estratti sono stati filtrati con imbuto gauche a pressione ridotta per accelerare il processo di filtrazione.

2.11 Saggi antiossidanti

Il contenuto totale di polifenoli (TPC) è stato misurato mediante il saggio di Folin-Ciocalteau. Per quantificare il TPC dei campioni è stata preparata una retta di calibrazione usando come standard l'acido gallico a concentrazioni 0.24- 0.025 mg/mL ($y = 5,8893x + 0,0224$; $R^2 = 0,992$). [128].

L'attività antiradicalica dell'estratto è stata valutata mediante tre tipi di saggi, DPPH, ABTS e FRAP, che permettono di quantificare le proprietà *scavenging* dell'estratto.

Il saggio del DPPH permette di andare a misurare l'attività antiradicalica dell'estratto nei confronti del radicale stabile 1,1-difenil-2-picrilidrazile (DPPH) valutando la variazione di assorbanza a 517 nm della soluzione di DPPH con l'estratto dopo 30 min di reazione condotta al buio a 30 °C. La capacità di scavenger dell'estratto è stata valutata anche attraverso il saggio ABTS: il catione radicalico ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) è caratterizzato da una intensa colorazione blu-verde; in seguito all'aggiunta di antiossidanti nell'ambiente di reazione, che cedono uno o più atomi di idrogeno al radicale cationico, si verifica un decremento del valore iniziale dell'assorbanza misurata a 734 nm dopo 15 minuti di reazione al buio a T_{amb}. La retta di calibrazione è stata preparata usando come standard il Trolox a concentrazioni 0.150-0.025 mg/mL ($y = -4,6703x + 0,6765$; $R^2 = 0,9899$) [128].

Il saggio FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) è stato anch'esso utilizzato per valutare la capacità antiossidante dell'estratto. La capacità delle molecole antiossidanti presenti nell'estratto di ridurre il complesso Fe(III) a Fe(II), è stata monitorata

spettrofotometricamente, alla lunghezza d'onda di 593 nm per 15 minuti a 37 °C. La retta di calibrazione è stata preparata usando come standard il Trolox a concentrazioni 0.2 - 0.075 mg/mL[128,129].

2.12 Saggi biologici – Valutazione attività antimicrobica

Seguendo le raccomandazioni del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012), è stato utilizzato il metodo della microdiluizione in brodo per determinare le concentrazioni minime inibitorie (MIC, mg/mL) *in vitro* [130]. La concentrazione dei composti studiati è stata impostata al valore massimo per creare soluzioni stock. Quindi, le soluzioni madre sono state diluite 1:10 con Mueller Hinton Broth aggiustato per i cationi (Oxoid, Milano, Italia). Successivamente, sono state ottenute nei pozzetti serie di concentrazioni da 512 mg/mL a 2 mg/mL eseguendo diluizioni seriali nel terreno di coltura appropriato. Sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici della collezione ATCC, ceppi Gram-positivi come *S. aureus* 29212/29213 e ceppi Gram-negativi come *E Coli.* 25922 e *K. pneuomoniae* 13883. Per preservare la purezza delle colture e consentirne la riproducibilità, le criovial di tutti i ceppi microbici sono state allestite nel terreno di coltura e conservate a -80 °C. Il Mueller Hinton Broth (MHB) è stato utilizzato per preparare le precolture di ciascun ceppo batterico, che sono state poi incubate per 3-5 h a 37 °C. In conformità alla procedura CLSI M7-A9 [130], la torbidità della sospensione di cellule batteriche è stata calibrata a 0,5 McFarland Standard utilizzando un approccio spettrofotometrico (OD625 nm 0,08-0,10). La sospensione standardizzata è stata poi ulteriormente diluita (1:100) con MHB per raggiungere 1-2 10^6 CFU/mL. Un'aliquota di 200 μL dell'inoculo finale è stata inserita in ciascun pozzetto. Come controllo della crescita, sono stati preparati diversi pozzetti contenenti solo brodo inoculato.
Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 h e i valori di MIC sono stati calcolati come la più bassa concentrazione di composti alla quale non c'era crescita batterica rilevabile otticamente. Ogni esperimento è stato eseguito in doppio e ripetuto due volte per determinare le MIC. La gentamicina è servita come antibiotico standard di riferimento per lo studio. Inoltre, è stata esaminata l'attività antibatterica del solo DMSO (utilizzato come diluente per i composti studiati); pertanto, per tutta la sperimentazione sono stati utilizzati volumi di questo solvente con una concentrazione inferiore al 5% [131].

Capitolo 3 Risultati e discussione

3.1 Estrazione dei polifenoli da *S. europaea*

3.1.1 Screening dei fattori che influenzano l'efficienza dell'UAE

L'identificazione dei parametri più significativi per l'ottimizzazione di una o più risposte di interesse è un passo cruciale nello sviluppo di un disegno sperimentale.

In questo studio è stato sviluppato un disegno Pluckett-Burman (P-B) a due fattori (tempo di estrazione e rapporto solido-solvente) e a due livelli per valutare quali parametri operativi influenzano l'estrazione di polifenoli, in particolare flavonoli, da S. *europaea* con la tecnica UAE. Ogni fattore è stato testato ai due livelli più promettenti, selezionati in base a precedenti esperimenti e alle caratteristiche del bagno a ultrasuoni utilizzato. La matrice di progettazione dei risultati sperimentali è riportata nella Tabella 2 (vedi 2.4). I diagrammi di Pareto degli effetti standardizzati sono stati riportati per illustrare efficacemente quale fattore ha avuto un impatto significativo sull'UAE dei due tipi di flavanoli analizzati in questo studio, che assorbono alle lunghezze d'onda massime selezionate, in particolare l'isoramnetina 3-O-glucoside e l'isoramnetina 3-O-rutinoside (a 320 nm e 360 nm). È stato osservato che il rapporto solido-solvente (X_1) e il tempo di estrazione (X_2) sono stati i fattori più significativi (Figura 7). Questo comportamento è stato riportato in modo simile in un recente studio sulle estrazioni a ultrasuoni dai baccelli di carruba, in cui il rapporto tra solido e solvente è stato uno dei fattori più influenti nel recupero dei polifenoli, mentre, contrariamente al nostro risultato, il tempo di estrazione non è stato un fattore determinante per il recupero dei polifenoli [10].

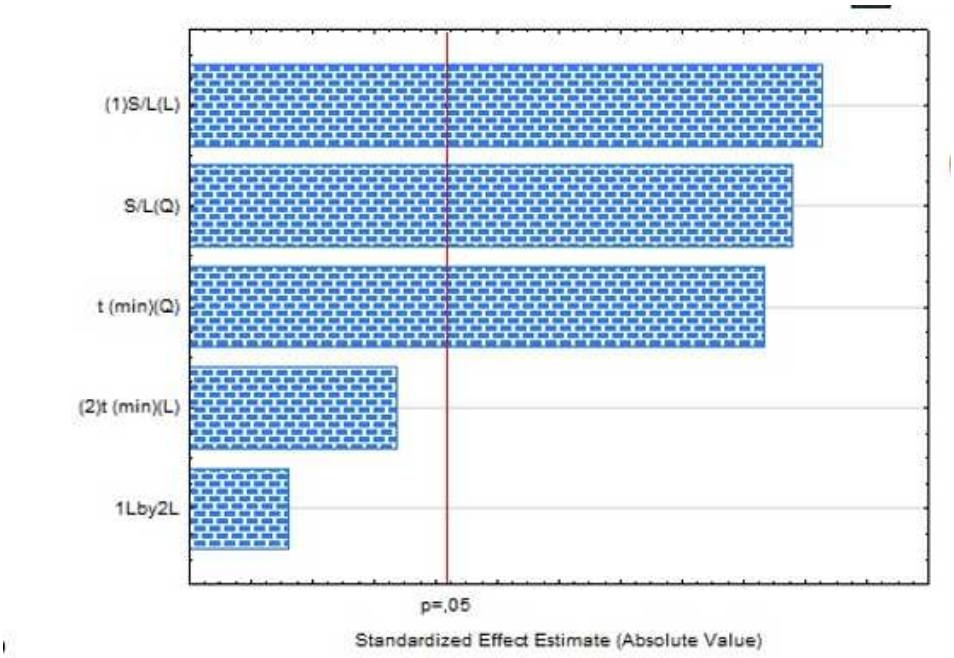


Fig. 7 Pareto Chart e diagrammi di probabilità normale degli effetti standardizzati del disegno di screening Plackett-Burman a due fattori sull'estrazione dei flavanoli.

3.1.2 Ottimizzazione Multiresponse degli UAE mediante CCD-RSM

Per l'ottimizzazione dei due fattori selezionati (X_1 e X_2) che influenzano l'estrazione dei polifenoli da *S. europaea*, è stato scelto un CCD standard (con valori di a0 = 1.4142 e aR = 1.0781, rispettivamente, per l'ortogonalità e la rotabilità del modello) La Tabella 6 mostra le concentrazioni, espresse in mg/mL, delle due isoramnetine identificate (isoramnetina-3O-glucoside e isoramnetina-3O-rutinoside) e i valori dei fattori per i 12 esperimenti, eseguiti in modo casuale per ottenere una stima accurata dell'errore sperimentale. Per descrivere la relazione empirica tra le concentrazioni di polifenoli e le condizioni operative (rapporto solido-solvente e tempo di estrazione), la Tabella 7 presenta le equazioni polinomiali predittive del secondo ordine generate applicando i modelli di regressione quadratica ai valori sperimentali trasformati Box-Cox per gli UAE.

Esperimento	Rapporto (S/L) g/mL	Tempo (min)	Isoramnetina-3O-rutinoside mg/mL	Isoramnetina-3O-glucoside mg/mL
1 (C)[a]	1:10	10	38.36	6.43
2 (C)	1:10	10	32.72	5.49
3 (C)	1:10	10	38.51	6.46
4 (C)	1:10	10	36.29	6.09
5	1:16	10	25.53	4.28
6	1:10	15	38.33	6.43
7	1:7	10	47.33	7.94
8	1:10	5	36.27	6.08
9	1:8	7.5	46.19	7.75
10	1:14	15	29.22	4.9
11	1:8	15	45.69	7.66
12	1:14	7.5	27.98	4.69

Tabella 6. Composite Central Design (CCD) a due fattori utilizzato per l'ottimizzazione dell'UAE. [a] Condizioni al punto centrale.

Composto	Equation	R^2 [a]	R^2_{adj} [b]	Lack of Fit (p [c])
Isoramnetina-3-O-rutinoside	$-177.29 + 15.5X_2 + 2822\ X_1 - 12332X_1^2$	0.9488	0.9061	0.3002
Isoramnetina-3-O-glucoside	$-35.43 + 8.9X_2 + 315.93X_1 - 505.70X_1^2$	0.8713	0.7806	0.4497

Tabella 7. Equazioni quadratiche per i valori trasformati Box-Cox dei composti predominanti estratti con UAE da *S. europaea.*

Ripetendo le osservazioni al punto centrale per quattro volte, come di solito si raccomanda nel caso di CCD a due fattori, è stata verificata la non significatività ($p>0,05$) della lack of fit test del modello, dimostrando l'affidabilità dei polinomi generati. I coefficienti di determinazione (R^2) erano generalmente >0,8, indicando che solo <20% delle variazioni totali non erano spiegate dai modelli e un buon grado generale di correlazione tra i valori osservati e previsti. Inoltre, i coefficienti di determinazione aggiustati (R^2_{adj}) erano vicini a R^2, confermando la bontà dei modelli statistici (Tabella 7). Il fattore più significativo ($p<0,01$) che ha influenzato l'estrazione di tutti i composti è stato il termine lineare di X_1; un aumento di questo fattore è stato generalmente associato a un aumento della resa in polifenoli, come mostrato dalle superfici di risposta prodotte utilizzando le equazioni polinomiali ottenute (Figura 8).

Questo risultato potrebbe essere particolarmente significativo in termini di sostenibilità e risparmio di solvente, ed è in linea con le affermazioni riportate in letteratura. Infatti, una diminuzione del rapporto solido-solvente porta tipicamente a un migliore rigonfiamento del materiale vegetale, che migliora il trasferimento di massa dei polifenoli e, di conseguenza, la resa di estrazione.

In particolare, l'uso di concentrazioni medie di etanolo (50%) in acqua aumenta l'efficienza di estrazione grazie alla maggiore solubilità dei fenoli, soprattutto quando si utilizzano metodi di estrazione non convenzionali. Infine, anche il termine quadratico di X_1 è risultato significativo, con coefficienti positivi responsabili delle superfici di risposta generali a forma di campana generate, come illustrato per il caso specifico della isoramnetina-3O-rutinoside (Figura 8).

Infine, sono state condotte ulteriori prove di estrazione nelle condizioni ottimali riconosciute dal modello RSM per confermare l'affidabilità del modello multirisposta. I dati sperimentali ottenuti sono stati poi confrontati con la resa fenolica stimata, rivelando una discrepanza tra i valori inferiore al 10% , che è effettivamente coerente con altri studi presenti in letteratura. La forte correlazione mostrata tra i risultati previsti e quelli sperimentali convalida l'efficacia e la robustezza dei modelli di RSM nel determinare i parametri di estrazione ottimali regolando il peso dei valori di risposta.

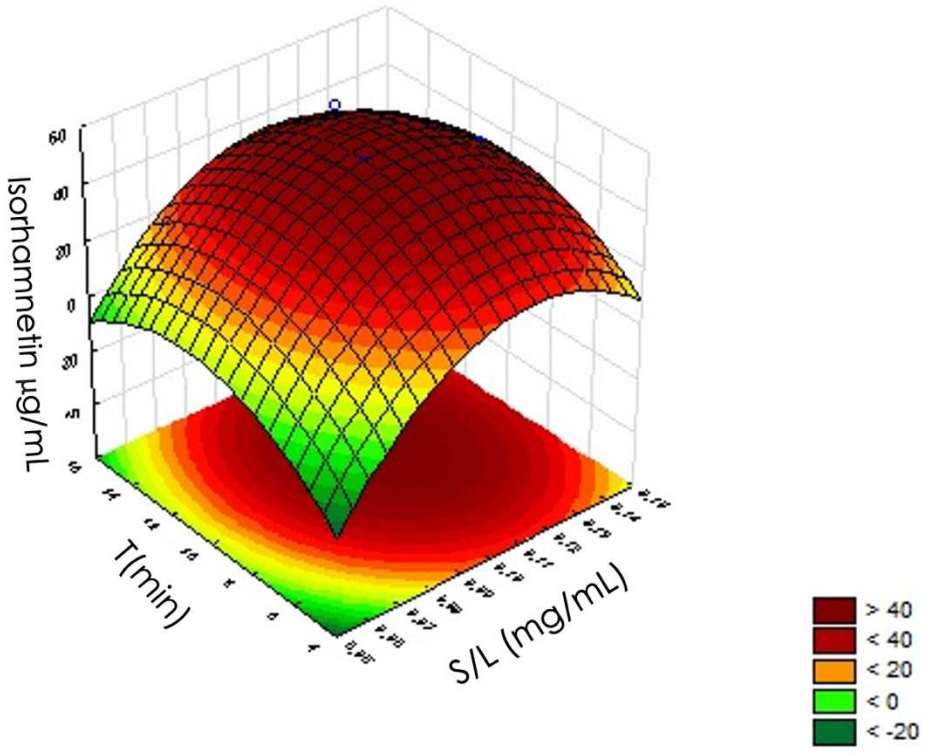


Figura 8 Grafici RSM che mostrano gli effetti del rapporto matrice solvente (X_1) e del tempo di estrazione (X_2) sul recupero di flavanoli da *S. europaea* mediante UAE.

Osservando i profili, le risposte previste più desiderabili (con un punteggio di 0,83) sulle variabili dipendenti sono state ottenute contemporaneamente ai livelli X_1 e X_2 di 11 min e 1:9 g/mL, rispettivamente (Figura 8).

3.1.3 Identificazione e quantificazione per UHPLC-HRMS/MS e HPLC-DAD dei principali composti isoramnetinici estratti da *S. europaea*

L'UHPLC-HRMS ha portato all'identificazione di 13 composti appartenenti alla sottoclasse dei flavonoli, come riportato nella Tabella 8. Tutti i metaboliti riconosciuti presentavano caratteristiche simili a quelle dei metaboliti della pianta. Tutti i metaboliti riconosciuti hanno mostrato modelli di frammentazione simili, con frammenti chiave osservati a *m/z* 315,0499/314,0421 e a *m/z* 317,0658, rispettivamente in modalità di ioni negativi e positivi. Questi frammenti sono stati attribuiti all'aglicone dell'isorhamnetina e

la struttura è stata ulteriormente convalidata dalla presenza dello ione 1,3A$^-$ a m/z 151,0026 dal riarrangiamento Retro-Diels-Alder.

I dati dettagliati della spettrometria di massa hanno permesso di comprendere le variazioni strutturali specifiche all'interno delle molecole glicosilate dei derivati dell'isorhamnetina (composti 1-13). Sulla base degli ioni prodotto diagnostici (-)-HRMS^2 risultanti dalla perdita di specifiche unità zuccherine, i composti 1 e 2 sono stati identificati provvisoriamente come isorhamnetin 3-O deossi-esoso-pentoso ($C_{33}H_{40}O_{20}$). Gli ioni prodotto per questi composti sono stati osservati alle m/z 609,1453, 477,1042 e 314,0434 che corrispondono a una successiva perdita di unità di desossi-esoso (NL 146,0574, $C_6H_{10}O_4$), pentoso (NL 132,0417, $C_5H_8O_4$) ed esoso (NL 162,0523, $C_6H_{10}O_5$) dallo ione precursore. Lo stesso approccio è stato applicato per l'identificazione dei glicosidi dell'isoramnetina 3-13 rilevati nell'estratto di *S. europaea*. Inoltre, i possibili siti di glicosilazione sullo scheletro del flavonolo sono stati stabiliti analizzando il rapporto tra gli ioni prodotto a m/z 315,0499 e 314,0421 negli spettri (-)-HRMS/MS, corrispondenti allo ione aglicone (Y_0^-) e allo ione aglicone radicale ([Y_0-H]$^-$) [132].

Nel complesso, la combinazione di dati HRMS/MS e UV ha offerto un quadro solido per l'identificazione completa dei derivati dei flavonoli in *S. europaea*.

ID	RT (min)	Composto	Formula molecolare	[M-H]$^-$ (m/z)	Errore (ppm)	Frammenti (m/z)	MSI livello
1	9.1	3-*O*-deossiesosil-pentosil Isorhamnetina	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755.2038	-0.3	314.0434, 299.0198, 271.0249, 151.0027	2
2	9.3	3-*O*-deoxyhesosil-esosil-pentosil Isorhamnetina	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755.2043	-0.4	314.0433, 299.0196, 271.0248, 151.0025	2
3	10.3	3-*O*-dideossiesoso-esosil Isorhamnetina	$C_{34}H_{42}O_{20}$	769.2194	-0.3	314.0432, 299.0198, 271.0249, 151.0028	2
4	10.5	3-*O*-dideossiesose-	$C_{34}H_{42}O_{20}$	769.2192	-0.6	314.0435, 299.0196,	2

		esose Isorhamnetina				271.0249, 151.0029	
5	11.5	3-*O*-deossiesoso-esoso Isorhamnetina	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.1614	-0.8	314.0432, 299.0196, 271.0249, 151.0026	2
6	11.7	*O*-esosil-pentosil Isorhamnetina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1456	-0.8	315.0509, 300.0272, 271.0248,151.0022	2
6	11.9	*O*-esosil-pentosil Isorhamnetina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1445	-0.7	315.0508, 300.0269, 271.02251,151.0024	2
7	12.4	3-*O*-deossiesose-esosil Isorhamnetina	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.1614	-0.5	314.0433, 299.0197, 271.0249, 151.0033	2
8	12.6	3-*O*-deossiesose-malonilhesosil Isorhamnetina	$C_{31}H_{34}O_{19}$	709.1627	0.7	314.0433, 299.0197, 271.0249,151.0019	2
9	12.7	*O*-deossiesose-malonilesosil Isorhamnetina	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.1620	0.3	315.0509, 300.0270, 271.0249, 151.0028	2
10	13.0	3-*O*-esoside Isorhamnetina	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477.1043	1.0	314.0433, 271.0247, 151.0030	2
11	13.3	*O*-deossiesose-malonilesosil Isorhamnetina	$C_{31}H_{34}O_{19}$	709.1626	0.6	314.0433, 299.0196, 271.0249, 151.0023	2
12	14.3	3-*O*-malonilesoside Isorhamnetina	$C_{25}H_{24}O_{15}$	563.1042	-0.1	519.1140, 314.0432, 299.0196, 271.0247, 151.0390	2
13	14.7	*O*-malonilesoside Isorhamnetina	$C_{25}H_{24}O_{15}$	563.1041	-0.1	519.1147, 315.0509,	2

		299.0197, 271.0248, 151.0023

RT: tempo di ritenzione; [a]Secondo metabolomics standards initiative (MSI).

Tabella 8. Dati UHPLC-HRMS dei principali flavonoli rilevati nell'estratto di *Salicornia europaea* L.

Lo spettro di massa completo, che corrisponde ai picchi UV a λ_{max} di 355 nm, ha permesso l'identificazione del picco di base e la determinazione della sua formula molecolare, consentendo la caratterizzazione dei composti. La quantificazione dei diversi composti dell'isoramnetina è stata realizzata utilizzando una curva di calibrazione dell'isorhamnetina 3-O-glucoside come composto analitico di riferimento attraverso HPLC-DAD (Figura 6 e Tabella 8) (y = 9,4894 x + 6,577; R^2 = 0,9996).

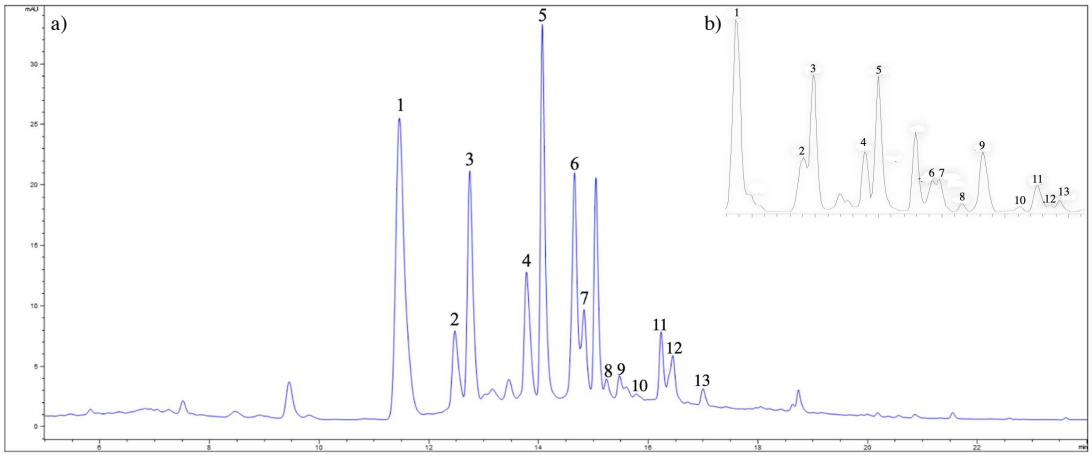


Fig. 6. a) Cromatogramma HPLC-DAD a 360 nm dell'estratto ottimizzato di Salicornia; b) Cromatogramma UHPLC-MS dell'estratto ottimizzato di Salicornia (focus sui flavonoli identificati).

In particolare, i composti 1, 3, 5 e 6 erano più concentrati nell'estratto ottimizzato di *S. europaea* e sono stati identificati per la prima volta in queste specie. La quantità di isoramnetin-3-O-glucoside (8,14 mg/g d.w.) è superiore a quelle riportate da Lee e colleghi [133] 0,503 mg/g d.w. e 2,327 mg/g [134]. L'isoramnetina-3-O-rutinoside è stata quantificata per la prima volta *in S. europaea,* mentre in letteratura era stata identificata solo in *S. fruticosa e S. patula* [135,136].

3.1.4 Valutazione dell'attività antiossidante

L'attività antiossidante degli estratti è stata valutata utilizzando i saggi Folin-Ciocalteu (F-C), DPPH e ABTS. Poiché gli estratti di *S. europaea* analizzati hanno mostrato numerosi componenti attivi, sono stati eseguiti tre diversi saggi antiossidanti per raccogliere informazioni più complete. Pertanto, sono stati scelti i saggi F-C, DPPH e ABTS perché sono metodi convenzionali per la determinazione delle proprietà antiossidanti delle matrici vegetali e sono complementari in quanto basati su meccanismi a singolo elettrone (F-C) o a trasferimento di idrogeno (DPPH, ABTS) più legati alle molecole antiossidanti fenoliche [137,138]. I risultati dei saggi antiossidanti misurati sui diversi estratti compreso in condizioni ottimizzate sono riportati nelle Figure 10, 11, 12. Come ci si aspettava, l'estratto in condizioni ottimizzate è più ricco di composti fenolici totali, con un contenuto di 6,03 mg GAE/g. Questo valore è in linea con altri articoli in cui i valori erano simili ma leggermente superiori (7,77 mgGAE/g) (Cristina, Costa, et al. 2018) e 8,86 mg GAE/g in *S. ramosissima* (Pinto, Diana, et al. 2021). Questi risultati potrebbero essere dovuti alle differenze tra le specie di Salicornia, alle differenze nelle condizioni pedo-climatiche della *S. europaea* analizzata in questo studio e anche a lievi differenze nelle condizioni di estrazione (rapporto, tempo e temperatura). Anche i risultati dell'attività antiradicalica dei saggi del DPPH e ABTS mostrano come l'estratto ottimizzato abbia dato i risultati migliori con valori di IC_{50} 0,01 mgGAE/g e 18,41mgTE/g dry.

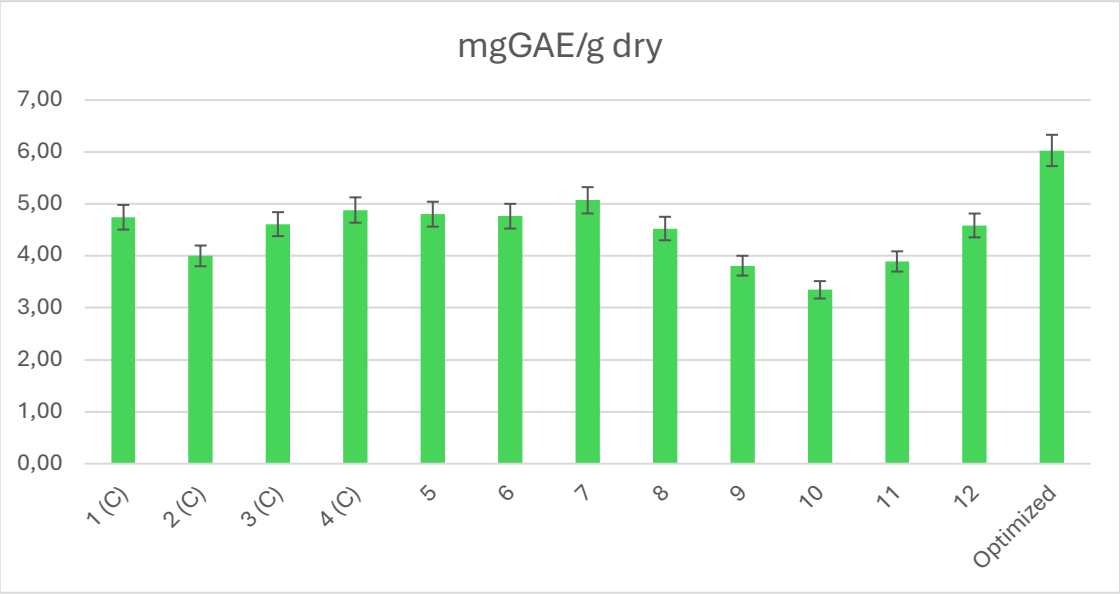


Fig. 10 Contenuto totale di Polifenoli (TPC) negli estratti di *S. europaea* L.

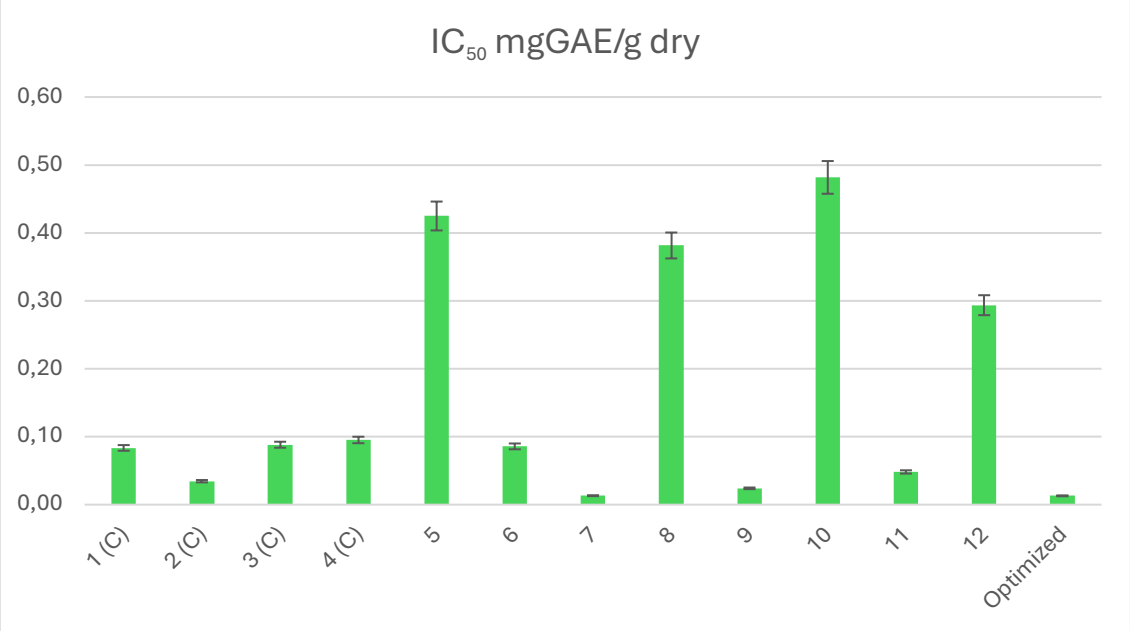


Fig.11: Risultati del saggio DPPH negli estratti di *S. europaea* L.

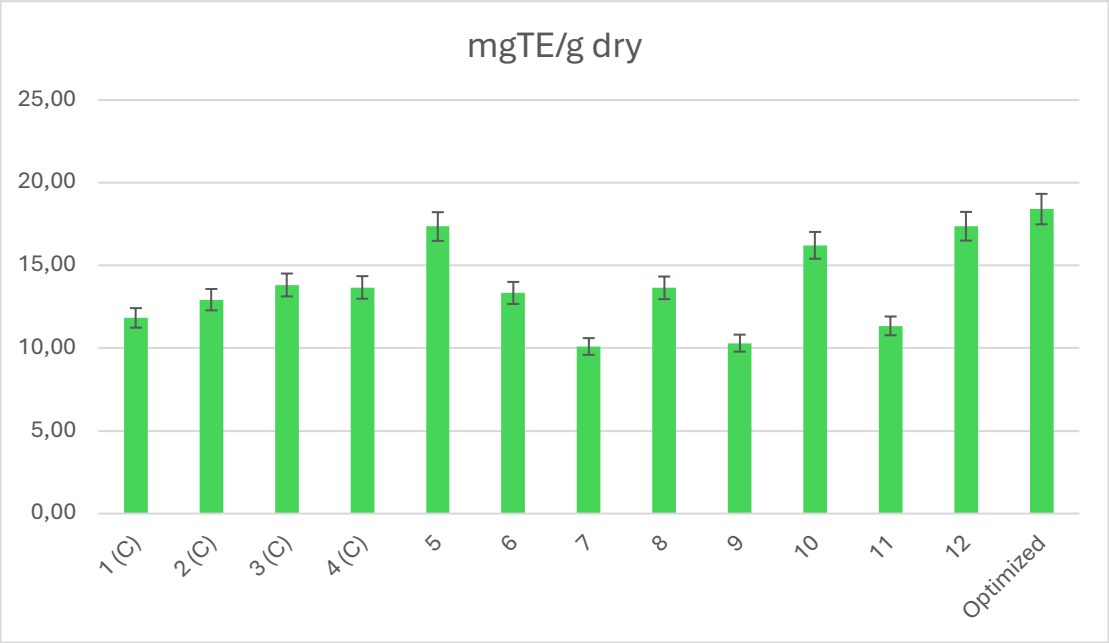


Fig.12:Risultati ABTS negli estratti di *S. europaea* L.

3.2 Ottimizzazione estrazione green *S.europaea* attraverso NADESs

3.2.1 Screening dei NADESs con *COSMOtherm*

Il processo di identificazione del solvente ottimale per l'estrazione di specifici composti bioattivi è una fase cruciale; tuttavia, richiede tempo ed energia. Pertanto, il software COSMOtherm è stato utilizzato per vagliare 60 NADESs e selezionare il solvente più promettente da utilizzare per l'estrazione dei polifenoli.

Per selezionare il NADESs più promettente per l'estrazione dei polifenoli dalla *Salicornia,* il primo passo è stato quello di valutare la solubilità di due dei polifenoli più rappresentativi identificati nella *S. europaea* in 60 DES con due o tre componenti in diversi rapporti molari, utilizzando la funzione di calcolo del coefficiente di attività dell'opzione COSMOtherm. Il calcolo del coefficiente di attività è stato eseguito utilizzando il 30% di acqua per i DES idrofili e senza acqua per i DES idrofobici. L'uso

del 30% di acqua è stato scelto in quanto è noto che l'alta viscosità dei DES limita l'efficienza di estrazione e l'aggiunta di acqua porta ad una riduzione della stessa ed un aumento della polarità [139]. Per selezionare il solvente migliore per l'estrazione dei polifenoli attraverso la simulazione COSMO sono stati selezionati due flavonoidi, l'isoramnetina e la quercetina. Questi due flavonoidi sono stati scelti in quanto sia da letteratura che da precedente studio di identificazione e ottimizzazione di polifenoli è emerso come i più rappresentativi per la matrice selezionata. Per entrambi sono stati elaborati i coefficienti di attività (lnγ). La Tabella 6 presenta i risultati dei 6 DES selezionati con i migliori valori di lnγ per i composti citati. Dallo screening con COSMOtherm è emerso che quando il coefficiente di attività del DES testato era basso, la solubilità dei flavonoidi era maggiore. Come si può riscontrare dalla Tabella 9 i DES selezionati sono tutti idrofili, questo risultato corrisponde anche al principio "like dissolves like", secondo il quale i composti polari come i flavonoidi vengono estratti meglio con solventi polari. In questo caso, i DES a base di acidi organici, come il Pro:MA (Proline: Malic acid), sono più polari e hanno valori di pH più bassi; di conseguenza questi solventi sono migliori per estrarre i composti più polari [140].

	Ratio	lnγI	lnγQ
B:CA	1:1	-1,51	-4,4
B:Suc	4:1	-6,649	-10,661
ChCl:U	1:2	-3,39	-7,3
ChCl:Xil	5:2	-3,69	-7,61
CA:Glc	1:1	-0,74	-0,359
Pro:MA	1:1	-0,486	-2,116

Tabella 9. Previsione del ln γ_{soluto} per Isoramnetina e Quercetina nel NADESs utilizzando COSMO-RS.

3.2.2 Valutazione dell'attività antiossidante

Dal grafico (Figura 13) possiamo riscontrare come il NADESs ottenuto utilizzando come accettore di legami idrogeno (HBA) la prolina, e come donatore (HBD) l'acido malico, ha portato ad avere un estratto con un contenuto maggiore di polifenoli. Si

riscontra inoltre, come il contenuto di polifenoli risulta essere maggiore anche rispetto all'estratto idroalcolico, uno dei più comuni solventi utilizzati per estrarre compostattivi da matrici vegetali.

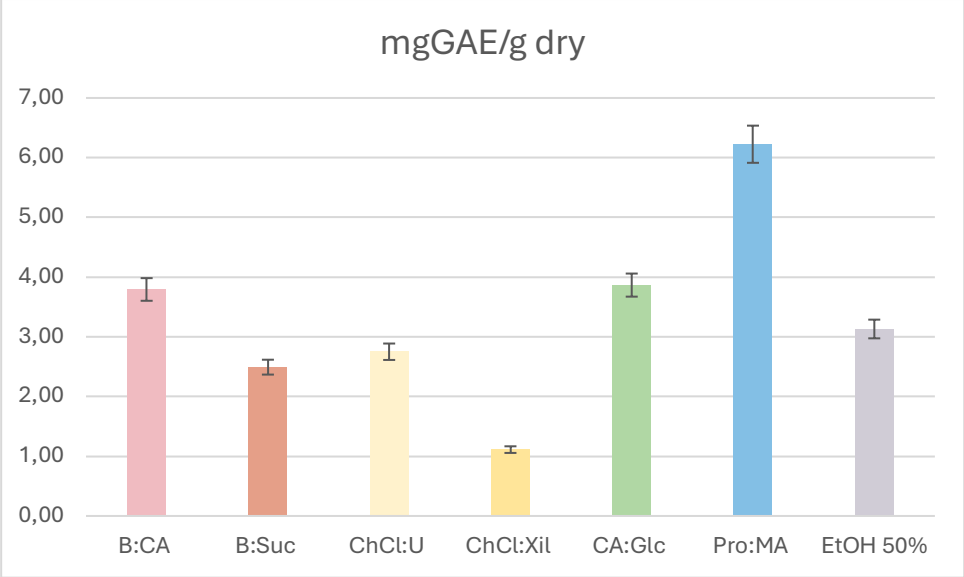


Figura 14: Contenuto totale di Polifenoli (TPC) negli estratti di *S. europaea* L.

Dai valori di IC_{50} ottenuti dal saggio del DPPH (Figura 14) si evince come anche in questo caso l'estratto in prolina e acido malico (Pro:MA) ha dato uno dei risultati migliori con un IC_{50} mgGAE/g dry pari a 0,09 che segue quello con colina-cloruro:urea (ChCl:U) con un valore pari a 0,05.

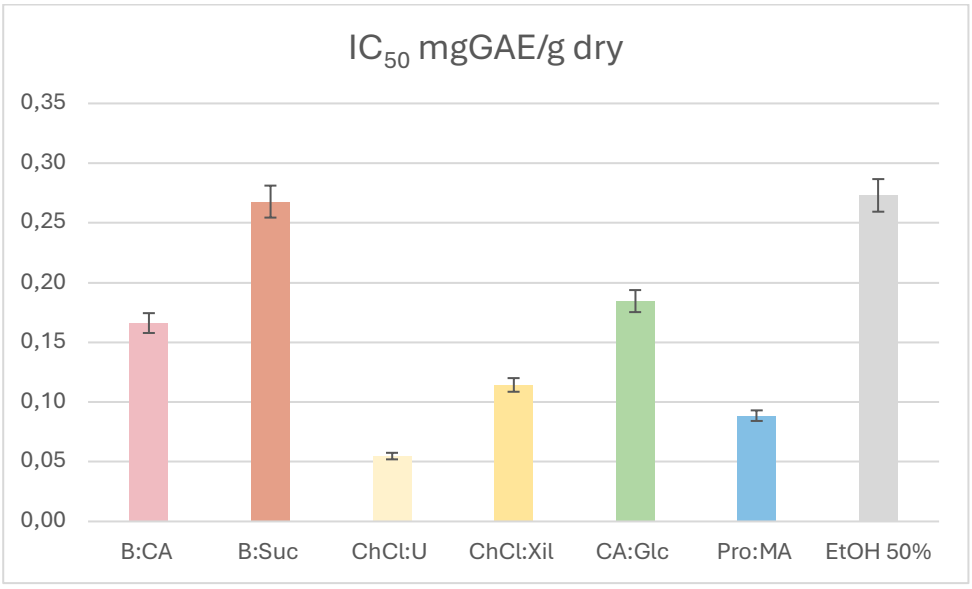


Figura 14: Risultati del saggio DPPH negli estratti di *S. europaea* L.

I risultati ottenuti in seguito a saggio antiradicalico dell'ABTS (Figura 15), mostrano un'interessante attività da parte degli estratti ottenuti con solventi Pro:MA, ChCl:U e miscela idroalcolica EtOH 50% .

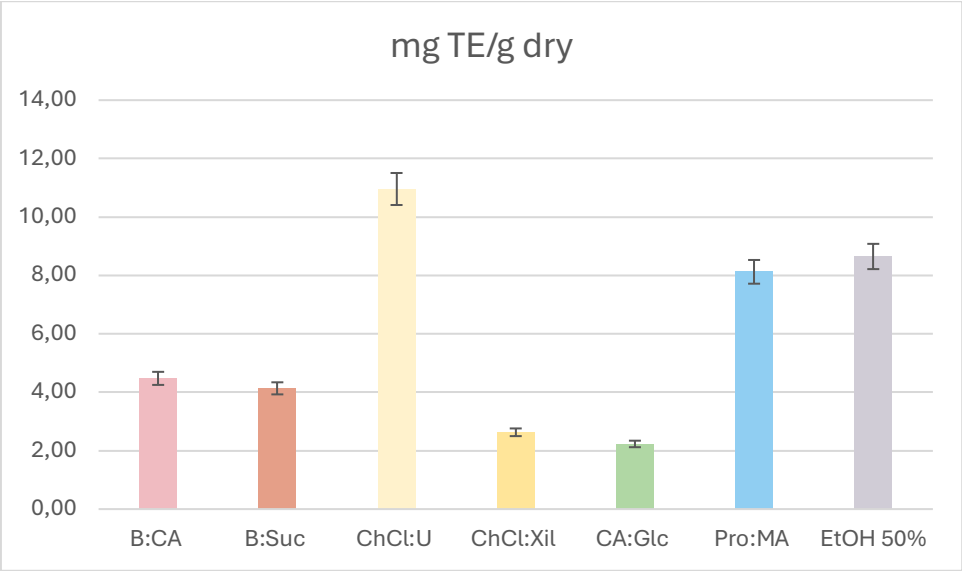


Figura 15:Risultati ABTS negli estratti di *S. europaea* L.

I risultati sono confermati anche dai valori ottenuti dal saggio del FRAP (Figura 16) in cui gli estratti in ChCl:U e Pro:MA risultano essere i migliori.

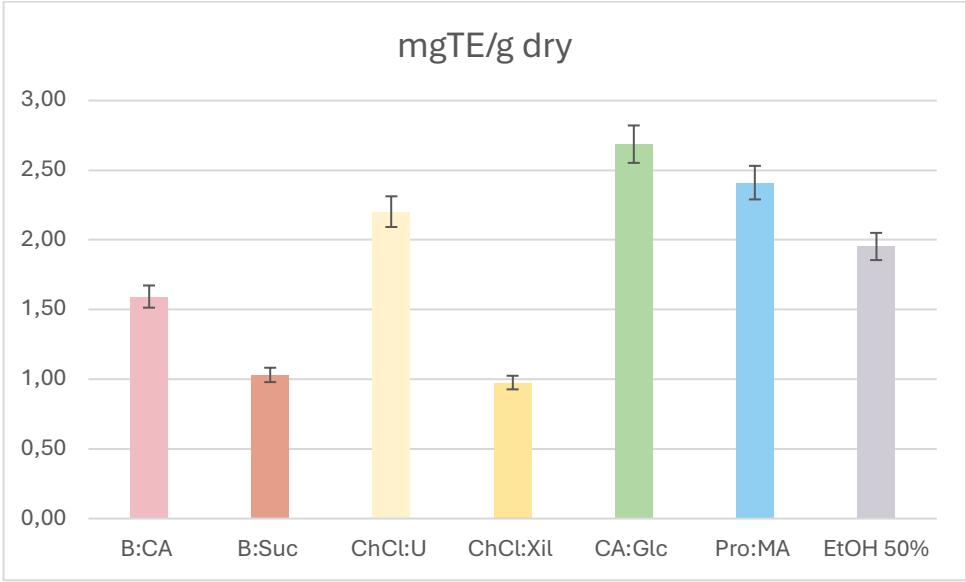


Figura 16 :Risultati FRAP negli estratti di *S. europaea* L.

Pertanto, in conclusione, gli estratti che hanno avuto i migliori esiti sono stati quelli in solventi come colina-cloruro:Urea e prolina:acido malico. Le estrazioni con questi due tipi di solventi non convenzionali hanno mostrato di avere nel complesso una maggiore attività antiradicalica rispetto all'estratto ottenuto con la miscela idroalcolica, uno dei solventi estraenti più comunemente utilizzati per estrazioni in campo alimentare.

In conclusione, possiamo affermare come i risultati dell'attività antiossidante mostrano in maniera corale come l'estratto in proline:malic acid (Pro:MA) possieda la migliore attività rispetto agli altri DES e all'estratto di controllo con etanolo (70%, v/v). Questo risultato può essere giustificato dal fatto che Pro:MA possiede caratteristiche fisico-chimiche ottimali per le estrazioni di polifenoli, come il basso pH e la polarità simile ai solventi organici polari solitamente utilizzati per l'estrazione di fenoli, come l'etanolo e il metanolo.

Inoltre, come è possibile visualizzare in Figura 17, è stato effettuato un monitoraggio volto a valutare la stabilità degli estratti di *S. europaea* nell'arco di tempo di 3 mesi. Attraverso il saggio del Folin è stato valutato come è cambiato il contenuto totale dei polifenoli degli estratti conservati a temperatura ambiente e al buio nell'arco del tempo. Il monitoraggio è stato effettuato ogni mese successivo all'estrazione per 3 mesi. Dai risultati è possibile riscontrare e dimostrare come gli estratti con NADESS presentano una stabilità nel tempo di gran lunga maggiore rispetto a quello in miscela idroalcolica. Questo risultato è confermato anche da numerosi studi volti ad affermare i numerosi vantaggi nell'utilizzo di queste nuove metodiche estrattive green non convenzionali [140, 141].

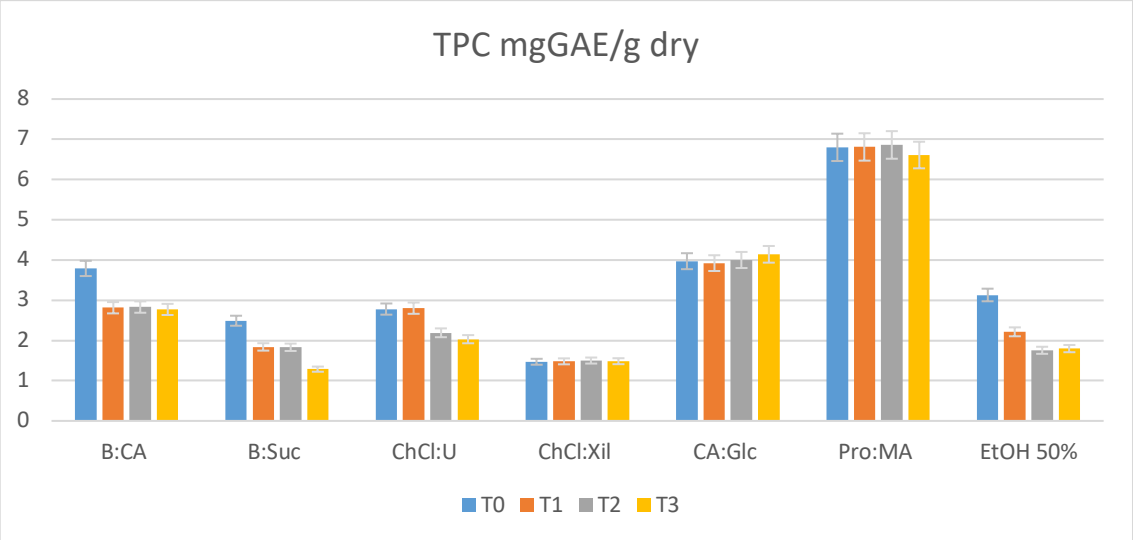


Figura 17*:* Monitoraggio del contenuto di polifenoli negli estratti di *S. europaea* L.

3.2.3 Risultati dell'attività antimicrobica

La valutazione dell'attività antimicrobica degli estratti è stata svolta in conformità alle raccomandazioni del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), mediante il metodo della microdiluizione in brodo, su batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e Gram-negativi (*Escherichia coli* 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) appartenenti alla collezione ATCC, utilizzando come farmaco di riferimento la gentamicina.

Nella Tabella 10 sono riportati i risultati dell'attività antibatterica degli estratti. E' possibile riscontrare come gli estratti Pro:MA e B:CA abbiano dato i risultati più promettenti nei confronti dei batteri Gram positivi e Gram negativi esaminati. La loro attività risulta comunque inferiore rispetto a quella della gentamicina. Pertanto gli estratti verranno testati su una più ampia gamma di ceppi batterici per poter indagare in modo completo la loro potenziale attività antibatterica.

	MIC (mg/mL)			
	Gram-positive		Gram-negative	
Extract	*S. aureus* ATCC 25923	*S. aureus* ATCC 29213	*E. coli* ATCC 25922	*K. pneumoniae* ATCC 13883
B:Ca	4.3	2.2	4.3	8.6
B:Suc	R	R	R	R
ChCl:U	R	R	R	R
ChCl:Xil	R	R	R	R
CA:Glc	3.8	3.8	3.8	7.6
Pro:MA	3.6	1.8	3.6	7.2
EtOH 50%	R	R	R	R
Gentamicina	0.5	0.5	2	16

Tabella 10. Attività antibatterica degli estratti di S. *europaea* (MIC,mg/mL, gentamicin μg/mL). R= Resistente

Capitolo 4 Conclusione

Al giorno d'oggi, l'uso di sostanze naturali come risorsa per la salute è diventato sempre più popolare, ed in particolare il recupero di antiossidanti, minerali, pigmenti e oli da matrici vegetali fresche e sottoprodotti agroindustriali. A questo proposito, focus di questo lavoro di tesi è stato lo studio delle caratteristiche chimiche e le proprietà biologiche della *Salicornia europea* L., una pianta alofita che cresce sulle coste dell'area mediterranea. In numerosi studi è emerso come la *S. europea* presenti un alto livello di molecole bioattive, tra cui prevalgono i polifenoli. Questi preziosi composti hanno una notevole attività antiossidante con un'ampia gamma di benefici per la salute, prevenendo malattie croniche, riducendo l'incidenza del cancro ed esercitando effetti antinfiammatori [142, 143]. Inoltre, la valorizzazione di una pianta infestante quale la *Salicornia* potrebbe essere utile per l'estrazione e l'isolamento di composti bioattivi da utilizzare nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica [141]. In questo contesto, la fortificazione di integratori e prodotti alimentari con estratti ricchi di composti bioattivi provenienti da fonti naturali e sostenibili è di grande interesse. Di solito, l'estrazione di questi composti da matrici vegetali viene effettuata utilizzando solventi organici con effetti pericolosi sull'ambiente e tossicologici sul consumo umano [144]. Un'alternativa a questo problema è l'utilizzo di solventi green, che possono essere presenti nel prodotto finale senza comportare rischi per i consumatori e possono ridurre i costi per l'industria evitando il processo di eliminazione dei solventi che comporta un notevole spreco di energia [145]. Il consumo energetico nei processi di estrazione può essere ulteriormente ridotto ottimizzando i parametri operativi, quali il tempo di estrazione e il rapporto solvente-solido, mediante l'impiego di tecnologie innovative. Queste tecnologie, in molti casi, risultano altamente efficienti dal punto di vista energetico, consentendo di ottenere rese ottimali in tempi di estrazione ridotti. Parallelamente, il progresso dell'economia circolare sarà sostenuto dall'adozione di tecnologie avanzate orientate verso processi più sostenibili [10]. Tra queste, l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) si configura come un approccio ecologico, offrendo una migliore riproducibilità, attrezzature più semplici e meno costose

Alla luce di queste considerazioni lo studio ha mirato ad ottenere un'ottimizzazione multirisposta delle condizioni di estrazione dei polifenoli da *S. europaea* L. attraverso una tecnologia di estrazione non convenzionale (UAE) ottimizzata attraverso gli strumenti statistici CCD e RSM, che ha fornito degli ottimi risultati escludendo l'utilizzo

di solventi tossici e riducendo i tempi di estrazione. I dati raccolti hanno dimostrato che i modelli matematici sviluppati in questo studio sono accurati per la previsione dei composti flavonolici estratti da *S. europea* e che il rapporto solido-liquido e il tempo sono i due fattori che influenzano l'estrazione dei polifenoli. Il metodo UAE proposto si è rivelato una tecnologia efficace e sostenibile per il recupero di derivati flavonolici bioattivi. L'attività antiossidante ha mostrato risultati interessanti che evidenziano come l'ottimizzazione abbia portato ad ottenere una migliore attività antiossidante dell'estratto in tempi ridotti. Altro aspetto considerato nel presente lavoro è stato quello relativo ad una possibile formulazione "ready to use" dell'estratto affiancando alle tecnologie ad ultrasuoni anche l'uso dei solventi eutettici naturali NADESs al fine di ridurre o sostituire l'uso di solventi non green. Nel complesso, i risultati presentati indicano che il metodo di estrazione green che sfrutta i NADESs come solventi estraenti, permette di estrarre un contenuto più elevato di polifenoli da *S. europaea* rispetto all'estrazione classica con EtOH come solvente. La buona estraibilità dei composti polifenolici nel NADESs, supporta l'uso del NADESs per l'estrazione di polifenoli da diversi matrici vegetali e sottoprodotti alimentari. Inoltre, l'attività antiossidativa e antimicrobica degli estratti in NADESs evidenzia il grande potenziale degli estratti ottenuti. Questi risultati suggeriscono che i DESs migliorano la stabilità dei composti estratti durante la conservazione per 90 giorni e preservano anche la loro attività antiossidante, supportando l'idea che intere formulazioni con DESs possano essere incluse nei prodotti finali senza ulteriori fasi di purificazione o separazione. Questo vantaggio può essere di grande interesse per l'industria grazie ad una riduzione dei costi e di tempi di allontanamento del solvente estraente.

In conclusione, questo studio ha confermato il potenziale di S. *europaea* come fonte naturale di un pool di costituenti flavonolici isoramnetinici con effetti benefici per la salute e ha contribuito a nuove conoscenze sulle condizioni ottimali di estrazione. Questo approccio potrebbe consentire lo sviluppo di strategie di scale-up industriale (estendibili ad altre matrici frutticole), "dal laboratorio all'industria". Inoltre, i risultati raccolti mostrerebbero come la procedura seguita possa sostenere la crescente domanda di prodotti ed estratti naturali nel settore alimentare, cosmetico e farmaceutico, riducendo al contempo l'eccessivo sfruttamento delle risorse vegetali.

Bibliografia

1. Corbo, F.; Brunetti, G.; Crupi, P.; Bortolotti, S.; Storlino, G.; Piacente, L.; Carocci, A.; Catalano, A.; Milani, G.; Colaianni, G.; Colucci, S.; Grano, M.;

Franchini, C.; Clodoveo, M.L.; D'Amato, G.; Faienza, M.F. Effects of Sweet Cherry Polyphenols on Enhanced Osteoclastogenesis Associated With Childhood Obesity. *Front. Immunol.* **2019***, 10*, 1001

2. De Santis, S.; Liso, M.; Verna, G.; Curci, F.; Milani, G.; Faienza, M. F.; Franchini, C.; Moschetta, A.; Chieppa, M.; Clodoveo, M.L.; Crupi, P.; Corbo, F. Extra Virgin Olive Oil Extracts Modulate the Inflammatory Ability of Murine Dendritic Cells Based on Their Polyphenols Pattern: Correlation between Chemical Composition and Biological Function. *Antioxidants* **2021,** *10(7),* 1016.
3. Renna Massimiliano; GONNELLA, Maria. Ethnobotany, nutritional traits, and healthy properties of some halophytes used as greens in the Mediterranean basin. *Handbook of Halophytes: From Molecules to Ecosystems towards Biosaline Agriculture*, 2020, 1-19.
4. Zhang LQ, Niu YD, Huridu H et al. Salicornia europaea L. Na+/H+ antiporter gene improves salt tolerance in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.). *Genet. Mol Res.* **2014**, *13:5350–5360.*
5. Zhang S, Wei M, Cao C et al Effect and mechanism of Salicornia bigelovii Torr. plant salt on blood pressure in SD rats. *Food Funct*. **2015**, 6:920–926
6. Isca VMS, Seca AML, Pinto DCGA et al Lipophilic profile of the edible halophyte Salicornia ramosissima. *Food Chem*. **2014** , *165*, 330–336
7. Cho H-D, Lee J-H, Jeong J-H et al Production of novel vinegar having antioxidant and anti-fatigue activities from Salicornia herbacea L. J *Sci. Food. Agric.* **2015**
8. Loconsole, Loconsole, D.; Cristiano, G.; De Lucia, B. Glassworts: From Wild Salt Marsh Species to Sustainable Edible Crops. *Agriculture* **2019**, *9*, 14.
9. Wang, X., Zhang, M., Zhao, Y., Wang, H., Liu, T., & Xin, Z. Pentadecyl ferulate, a potent antioxidant and antiproliferative agent from the halophyte Salicornia herbacea. *Food chemistry*, **2013**, *141*(3), 2066-2074.
10. Clodoveo, M.L.; Crupi, P.; Corbo, F. Optimization of a Green Extraction of Polyphenols from Sweet Cherry (Prunus avium L.) Pulp. *Processes*, **2022**, *10(8),* 1657
11. Clodoveo, M. L., Crupi, P., Annunziato, A., Corbo, F. Innovative extraction technologies for development of functional ingredients based on polyphenols from olive leaves. *Foods*, **2021**, *11(1),* 103.

12. Cárdenas-Pérez, S., Piernik, A., Chanona-Pérez, J. J., Grigore, M. N., Perea-Flores, M. J. An overview of the emerging trends of the Salicornia L. genus as a sustainable crop. *Environmental and Experimental Botany*, **2021**, *191*, 104606.
13. Wang, Hongjun, et al. Extraction, preliminary characterization and antioxidant properties of polysaccharides from the testa of Salicornia herbacea. *Carbohydrate Polymers*, **2017**, *176*, 99-106.
14. Lu, D., Zhang, M., Wang, S., Cai, J., Zhou, X., Zhu, C. Nutritional characterization and changes in quality of Salicornia bigelovii Torr. during storage. *LWT-Food Science and Technology*, **2010**, *43(3),* 519-524.
15. Lima, A. R., Castaneda-Loaiza, V., Salazar, M., Nunes, C., Quintas, C., Gama, F., Barreira, L. Influence of cultivation salinity in the nutritional composition, antioxidant capacity and microbial quality of Salicornia ramosissima commercially produced in soilless systems. *Food Chemistry*, **2020**, *333*, 127525.
16. Wang, D., Wang, Y., Dong, G., Shang, Y., Lyu, Y., Li, F., Yu, X. The chemical composition analysis of dwarf saltwort (Salicornia bigelovii Torr.) and its preservative effects on snakehead fish fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*, **2022**, *46(4),* e16433.
17. Panth, N., Park, S. H., Kim, H. J., Kim, D. H., Oak, M. H. Protective effect of Salicornia europaea extracts on high salt intake-induced vascular dysfunction and hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, **2016**, *17*(7), 1176.
18. Feng, J., Wang, J., Fan, P., Jia, W., Nie, L., Jiang, P., Li, Y. High-throughput deep sequencing reveals that microRNAs play important roles in salt tolerance of euhalophyte Salicornia europaea. *BMC plant biology*, **2015**, *15(1),* 1-17.
19. Man, H. R., Hwa-Jin, P., Jae, Y. C. Salicornia herbacea: Botanical, chemical and pharmacological review of halophyte marsh plant. *Journal of medicinal plants Research*, **2009**, *3(8),* 548-555.
20. Rahmani, R., Arbi, K. E., Aydi, S. S., Hzami, A., Tlahig, S., Najar, R., Debouba, M. Biochemical composition and biological activities of Salicornia europaea L. from southern Tunisia. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **2022**, 1-14.
21. Mishra, A., Patel, M. K., Jha, B. Non-targeted metabolomics and scavenging activity of reactive oxygen species reveal the potential of Salicornia brachiata as a functional food. *journal of functional foods*. **2015**, *13*, 21-31.

22. Kaur, N., Chaudhary, J., Jain, A., Kishore, L. Stigmasterol: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2011**, *2(9),* 2259.
23. Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R., Abdollahi, M. The story of beta-sitosterol-a review. *European journal of medicinal plants*, **2014**, *4*(5), 590.
24. Kim, S., Lee, E. Y., Hillman, P. F., Ko, J., Yang, I., Nam, S. J. Chemical structure and biological activities of secondary metabolites from salicornia europaea l. *Molecules*, **2021**, *26(8),* 2252.
25. Lyu, H., Ma, X., Guan, F., Chen, Y., Wang, Q., Feng, X. 30-Noroleanane triterpenoid saponins from Salicornia europaea Linn. and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2018**, *78*, 106-109.
26. Patel, S. Salicornia: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3 Biotech*. **2016**, *6*(1), 1-10.
27. Elsebaie, E. M., Elsanat, S. Y., Gouda, M. S., Elnemr, K. M. Oil and fatty acids composition in glasswort (Salicornia fruticosa) seeds. *J. App. Chem*, **2013**, *4*, 2278-5736.
28. Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biological Research*, **2004**, *37(2),* 263-277.
29. Liu, Y. W., Zuo, P. Y., Zha, X. N., Chen, X. L., Zhang, R., He, X. X., Liu, C. Y. Octacosanol enhances the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells via activation of the PI3K/Akt and MAPK/Erk pathways. *Lipids*, **2015**, *50(3),* 241-251.
30. Ventura, Y., Wuddineh, W. A., Shpigel, M., Samocha, T. M., Klim, B. C., Cohen, S., Sagi, M. Effects of day length on flowering and yield production of Salicornia and Sarcocornia species. *Scientia Horticulturae*, **2011**, *130(3),* 510-516.
31. Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V., Aluko, R. E. Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, **2022**, e14264.
32. Scalbert, A., & Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, **2000**, *130(8),* 2073S-2085S.
33. Kumar, N., Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, **2019**, *24*, e00370.
34. Gouda, M. S., Elsebaie, E. M. Glasswort (Salicornia spp) as a source of bioactive compounds and its health benefits: a review. *Alex J Fd Sci Technol*, **2016,** *13(1),* 1-7.

35. Petropoulos, S. A., Karkanis, A., Martins, N., Ferreira, I. C. Edible halophytes of the Mediterranean basin: Potential candidates for novel food products. *Trends in food science & technology*, **2018**, *74*, 69-84.
36. Cho, J. Y., Kim, J. Y., Lee, Y. G., Lee, H. J., Shim, H. J., Lee, J. H., Moon, J. H. Four new dicaffeoylquinic acid derivatives from glasswort (Salicornia herbacea L.) and their antioxidative activity. *Molecules*, **2016**, *21(8),* 1097.
37. Chung, Y. C., Chun, H. K., Yang, J. Y., Kim, J. Y., Han, E. H., Kho, Y. H., Jeong, H. G. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, fromSalicornia herbacea. *Archives of pharmacal research*, **2005**, *28(10),* 1122-1126.
38. Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., Saito, I. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*, **2006**, *24(6),* 1065-1073.
39. Heo, K. S., Berk, B. C., & Abe, J. I. Disturbed flow-induced endothelial proatherogenic signaling via regulating post-translational modifications and epigenetic events. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2016**, *25(7),* 435-450.
40. Lee, G. H., Lee, S. Y., Zheng, C., Pham, H. T., Kim, C. Y., Kim, M. Y., Jeong, H. G. Effect of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoylquinic acid from Salicornia herbacea on endothelial nitric oxide synthase activation via calcium signaling pathway. *Toxicological Research*, **2022**, 1-10.
41. Rahman, M. M., Kim, M. J., Kim, J. H., Kim, S. H., Go, H. K., Kweon, M. H., Kim, D. H. Desalted Salicornia europaea powder and its active constituent, trans-ferulic acid, exert anti-obesity effects by suppressing adipogenic-related factors. *Pharmaceutical biology*, **2018**, *56*(1), 183-191.
42. Adamczak, A., Ożarowski, M., Karpiński, T. M. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. *Journal of clinical medicine*, **2019**, *9*(1), 109.
43. Padalino, L., Costa, C., Del Nobile, M. A., & Conte, A. Extract of Salicornia europaea in fresh pasta to enhance phenolic compounds and antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, **2019**, *54*(11), 3051-3057.
44. Ferreira, D., Isca, V. M., Leal, P., Seca, A. M., Silva, H., de Lourdes Pereira, M., .Pinto, D. C. Salicornia ramosissima: secondary metabolites and protective effect

against acute testicular toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, **2018**, *11(1),* 70-80.

45. Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., ... & Jaremko, M. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, **2020**, *25*(22), 5243.
46. Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food chemistry*, **2019**, *299*, 125124.
47. Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B. The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, **2021**, *10(1),* 118.
48. D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., & Carputo, D. The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, **2018**, *17(3),* 611-625.
49. Dias, M. C., Pinto, D. C., Silva, A. M. 2021 Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, **2021**, *26*(17), 5377.
50. David, A. V. A., Arulmoli, R., Parasuraman, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*, **2016**, *10*(20), 84.
51. Ganeshpurkar, A., Saluja, A. K. The pharmacological potential of rutin. *Saudi pharmaceutical journal*, **2017**, *25(2),* 149-164.
52. Kong, C. S., Kim, J. A., Qian, Z. J., Kim, Y. A., Im Lee, J., Kim, S. K., Seo, Y. Protective effect of isorhamnetin 3-O-β-d-glucopyranoside from Salicornia herbacea against oxidation-induced cell damage. *Food and Chemical Toxicology*, **2009**, *47(8),* 1914-1920.
53. Cybulska, I., Zembrzuska, J., Brudecki, G., Thomsen, M. H. Optimizing Methods to Characterize Caffeic, Ferulic, and Chlorogenic Acids in Salicornia sinus-persica and Salicornia bigelovii Extracts by Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Bioresources*, **2021**, *16*(3).
54. Kim, J. Y., Cho, J. Y., Ma, Y. K., Park, K. Y., Lee, S. H., Ham, K. S., Moon, J. H. Dicaffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (Salicornia herbacea L.) and their antioxidative activity. *Food Chemistry*, **2011**, *125(1),* 55-62.
55. Burda, S., Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2001**, *49*(6), 2774-2779.

56. Noh, E. J., Lee, J. Y., Park, S. Y., Park, J. H., Cho, J. Y., Kim, Y. M., Lee, S. K. Salicornia herbacea Aqueous Extracts Regulate NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages and Trophoblasts. *Journal of Medicinal Food*, **2022**, *25(5),* 503-512.
57. Kim, J. Y., Cho, J. Y., Moon, J. H., Choi, G. C., Lee, K. D., Ham, K. S., Kim, S. J. Change of phenylpropanoic acid and flavonol contents at different growth stage of glasswort (Salicornia herbacea L.). *Food Science and Biotechnology*, **2014**, *23(3),* 685-691.
58. Luo, Y., Shang, P., Li, D. Luteolin: a flavonoid that has multiple cardio-protective effects and its molecular mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, **2017**, *8*, 692.
59. Won, K. J., Lee, K. P., Baek, S., Cui, L., Kweon, M. H., Jung, S. H., Kim, B. Desalted Salicornia europaea extract attenuated vascular neointima formation by inibizione the MAPK pathway-mediated migration and proliferation in vascular smooth muscle cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2017**, *94*, 430-438.
60. Essaidi, I., Brahmi, Z., Snoussi, A., Koubaier, H. B. H., Casabianca, H., Abe, N., Bouzouita, N. Phytochemical investigation of Tunisian Salicornia herbacea L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inibizioney activities of its methanol extract. *Food Control*, **2013**, *32*(1), 125-133
61. Pandit, A., Sachdeva, T., Bafna, P. Drug-induced hepatotoxicity: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2012**, (Issue), 233-243.
62. Ho, P. C., Saville, D. J., Wanwimolruk, S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharm Sci*, **2001**, *4(3),* 217-27.
63. Polat Kose, L., & Gulcin, İ. Evaluation of the antioxidant and antiradical properties of some phyto and mammalian lignans. *Molecules*, **2021**, *26*(23), 7099.
64. Köse, L. P., Gulcin, I. Inhibition effects of some lignans on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Rec. Nat. Prod*, **2017**, *11*(6), 558-561
65. Ayres, D. C., Ayres, D. C., Loike, J. D. *Lignans: chemical, biological and clinical properties*. Cambridge university press. **1990**

66. Wang, X. Y., Feng, X., Wang, M., Chen, Y., Dong, Y. F., Zhao, Y. Y., Sun, H. Studies on the chemical constituents of Salicornia europaea. *Zhong yao cai Zhongyaocai Journal of Chinese Medicinal Materials*, **2011**, *34(1),* 67-69.
67. Wang, S., Wu, C., Li, X., Zhou, Y., Zhang, Q., Ma, F., Guo, P. Syringaresinol-4-O-β-D-glucoside alters lipid and glucose metabolism in HepG2 cells and C2C12 myotubes. *Acta pharmaceutica sinica B*, **2017**, *7(4),* 453-460.
68. Jeong, Y. H., Chung, S. Y., Han, A. R., Sung, M. K., Jang, D. S., Lee, J., Seo, E. K. P-Glycoprotein Inibizioney Activity of Two Phenolic Compounds,(−)-Syringaresinol and Tricin from Sasa borealis. *Chemistry & biodiversity*, **2007**, *4(1),* 12-16.
69. Karthivashan, G., Kweon, M. H., Park, S. Y., Kim, J. S., Kim, D. H., Ganesan, P., Choi, D. K. Cognitive-enhancing and ameliorative effects of acanthoside B in a scopolamine-induced amnesic mouse model through regulation of oxidative/inflammatory/cholinergic systems and activation of the TrkB/CREB/BDNF pathway. *Food and Chemical Toxicology*, **2019**, *129*, 444-457.
70. Clodoveo, M.L.; Crupi, P.; Muraglia, M.; Corbo, F. Ultrasound Assisted Extraction of Polyphenols from Ripe Carob Pods (Ceratonia siliqua L.): Combined Designs for Screening and Optimizing the Processing Parameters. *Foods* **2022**, *11(3)*, 284.;
71. Kalia, K., Sharma, K., Singh, H. P., Singh, B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of Potentilla atrosanguinea Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, *56*(21), 10129-10134.
72. Crupi, P., Dipalmo, T., Clodoveo, M. L., Toci, A. T., Coletta, A. Seedless table grape residues as a source of polyphenols: Comparison and optimization of non-conventional extraction techniques. *European Food Research and Technology*, **2018**, *244(6),* 1091-1100
73. Jovanović, A., Petrović, P., Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski, B. Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine*, **2017**, *(37),* 45-49.
74. Panja, P. Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, **2018**, *23*, 173-182.

75. Saini, A., Panesar, P. S. Beneficiation of food processing by-products through extraction of bioactive compounds using neoteric solvents. *LWT*, **2020**, *134*, 110263.
76. Naviglio, D., Scarano, P., Ciaravolo, M., Gallo, M. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A powerful and greener alternative to the latest solid-liquid extraction techniques. *Foods*, **2019**, *8(7),* 245.
77. Silva, A. M., Lago, J. P., Pinto, D., Moreira, M. M., Grosso, C., Cruz Fernandes, V., Rodrigues, F. Salicornia ramosissima bioactive composition and safety: Eco-friendly extractions approach (microwave-assisted extraction vs. conventional macerazione). *Applied Sciences*, **2021**, *11(11),* 4744.
78. Ko, Y. C., Choi, H. S., Kim, S. L., Yun, B. S., Lee, D. S. Anti-Inflammatory Effects of (9Z, 11E)-13-Oxooctadeca-9, 11-dienoic Acid (13-KODE) Derived from Salicornia herbacea L. on Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Macrophage via NF-kB and MAPK Inhibition and Nrf2/HO-1 Signaling Activation. *Antioxidants*, **2022**, *11(2),* 180.
79. Pinto, D., Reis, J., Silva, A. M., Salazar, M., Dall'Acqua, S., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F. Valorisation of Salicornia ramosissima biowaste by a green approach–An optimizing study using response surface methodology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **2021**, *24*, 100548.
80. Vinatoru, M., Mason, T. J., Calinescu, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2017**, *97*, 159-178.
81. Markhali, F. S., Teixeira, J. A., Rocha, C. M. Olive tree leaves—A source of valuable active compounds. *Processes*, **2020**, *8*(9), 1177.
82. Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2008**, *9(2),* 161-169.
83. Cristina, C., Lucia, P., Sara, S., Francesco, S., Nobile Matteo Alessandro, D., & Amalia, C. Study of the efficacy of two extraction techniques from Crithmum maritimum and Salicornia europaea. *J. Food Nutr. Res*, **2018**, *6(3),* 456-463.
84. Rostagno, M. A., Palma, M., Barroso, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, **2003**, *1012(2),* 119-128.
85. Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food research international*, **2004**, *37*(7), 731-738

86. SOUZA, M. M., Silva, B. D., Costa, C. S., Badiale-Furlong, E. Free phenolic compounds extraction from Brazilian halophytes, soybean and rice bran by ultrasound-assisted and orbital shaker methods. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **2018**, *90*, 3363-3372.
87. Faria, G. Y. Y., Souza, M. M., Oliveira, J. R. M., Costa, C. S. B., Collares, M. P., Prentice, C. Effect of ultrasound-assisted cold plasma pretreatment to obtain sea asparagus extract and its application in Italian salami. *Food Research International*, **2020**, *137*, 109435.
88. Oliveira-Alves, S. C., Andrade, F., Prazeres, I., Silva, A. B., Capelo, J., Duarte, B., Bronze, M. R. Impact of drying processes on the nutritional composition, volatile profile, phytochemical content and bioactivity of Salicornia ramosissima J. woods. *Antioxidants*, **2021**, *10(8),* 1312.
89. Kim, H. J., Lee, J. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Salicornia herbacea powder. *Preventive Nutrition and Food Science*, **2009**, *14(2),* 129-133.
90. Uwineza, P. A., Waśkiewicz, A. Recent advances in supercritical fluid extraction of natural bioactive compounds from natural plant materials. *Molecules*, **2020**, *25(17),* 3847.
91. Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, **2012**, *67*, 89-93.
92. Pereira, C. G., Meireles, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, **2010**, *3(3),* 340-372.
93. Heffernan, N., Smyth, T. J., FitzGerald, R. J., Vila-Soler, A., Mendiola, J., Ibáñez, E., Brunton, N. P. Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2016**, *37*, 221-228.
94. Folayan, A. J., Anawe, P. A. L., Ayeni, A. O. Synthesis and characterization of Salicornia bigelovii and Salicornia brachiata halophytic plants oil extracted by supercritical CO2 modified with ethanol for biodiesel production via enzymatic

transesterification reaction using immobilized Candida antarctica lipase catalyst in tert-butyl alcohol (TBA) solvent. *Cogent Engineering*, **2019**, *6(1),* 1625847.

95. Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M. L., Plaza, M. Enzyme-assisted extraction of bioactive non-extractable polyphenols from sweet cherry (Prunus avium L.) pomace. *Food Chemistry*, **2021**, *339*, 128086.
96. Akyüz, A., Ersus, S. Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (Beta vulgaris L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. *Food Chemistry*, **2021**, *335*, 127673.
97. Oh, J. H., Kim, E. O., Lee, S. K., Woo, M. H., Choi, S. W. Antioxidant activities of the ethanol extract of hamcho (Salicornia herbacea L.) cake prepared by enzymatic treatment. *Food Science and Biotechnology*, **2007**, *16(1),* 90-98.
98. Karthivashan, G., Park, S. Y., Kweon, M. H., Kim, J., Haque, M., Cho, D. Y., Choi, D. K. Ameliorative potential of desalted Salicornia europaea L. extract in multifaceted Alzheimer's-like scopolamine-induced amnesic mice model. *Scientific reports*, **2018**, *8(1),* 1-16.
99. Clodoveo ML, Muraglia M, Crupi P, Hbaieb RH, De Santis S, Desantis A, Corbo F. The Tower of Babel of Pharma-Food Study on Extra Virgin Olive Oil Polyphenols. *Foods*. **2022**, *11(13),* 1915.
100. Banjare, Manoj Kumar, et al. Self-assembly of a short-chain ionic liquid within deep eutectic solvents. *RSC advances*, **2018**, 8.15: 7969-7979.
101. Nardecchia, S.; Gutiérrez, M. C.; Ferrer, M. L.; Alonso, M.;Ló pez, I. M.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Del Monte, F. Phase Behaviorof Elastin-Like Synthetic Recombinamers in Deep Eutectic Solvents.Biomacromolecules **2012**, 13, 28.
102. Abbott, A.; Capper, G.; Gray, S. Design of Improved DeepEutectic Solvents Using Hole Theory. ChemPhysChem **2007**, 7, 803−806.
103. Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., ... & Sangoro, J. R., Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical reviews*, **2020**, *121*(3), 1232-1285.
104. Sahin, S.; Bilgin, M. Valorization of peach (Prunus persica L.) waste into speciality products via green methods. Biomass Convers. Bior. **2021**, 12, 123–132
105. Kurtulba¸s, E. Prediction of mass transfer and kinetic behavior during the extraction of high added-value products from sour cherry (Prunus cerasus L.) peels. J. Food Process. Pres. **2022**, 46, e16401.

106. Cvjetko Bubalo, M.; Curko, N.; Tomasevic, M.; Kovacevic Ganic, K.; Radojcic Redovnikovic, I. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. Food Chem. **2016**, 200, 159–166.
107. Benvenutti, L.; Zielinski, A.A.F.; Ferreira, S.R.S. Which is the best food emerging solvent: IL, DES or NADES? Trends Food. Sci. Technol. **2019**, 90, 133–146.
108. Panic, M.; Gunjevic, V.; Cravotto, G.; Radojcic Redovnikovic, I. Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. Food Chem. **2019**, 300, 125185.
109. Li, J.; Chen, W.; Niu, D.; Wang, R.; Xu, F.-Y.; Chen, B.-R.; Lin, J.-W.; Tang, Z.-S.; Zeng, X.-A. Efficient and green strategy based on pulsed electric field coupled with deep eutectic solvents for recovering flavonoids and preparing flavonoid aglycones from noni-processing wastes. J. Clean. Prod. **2022**, 368, 133019.
110. Leal, F.C.; Farias, F.O.; do Amaral, W.; Toci, A.T.; Mafra, M.R.; Igarashi-Mafra, L. Green Solvents to Value Annona muricata L. Leaves as Antioxidants Source: Process Optimization and Potential as a Natural Food Additive. Waste Biomass Valori. **2021**, 13, 1233–1241.
111. Sukor, N.F.; Selvam, V.P.; Jusoh, R.; Kamarudin, N.S.; Rahim, S.A. Intensified DES mediated ultrasound extraction of tannic acid rom onion peel. J. Food Eng. **2021,** 296, 110437.
112. Stefou, I.; Grigorakis, S.; Loupassaki, S.; Makris, D.P. Development of sodium propionate-based deep eutectic solvents for polyphenol extraction from onion solid wastes. Clean Technol. Envir. **2019**, 21, 1563–1574.
113. Ciardi, M.; Ianni, F.; Sardella, R.; Di Bona, S.; Cossignani, L.; Germani, R.; Tiecco, M.; Clementi, C. Effective and Selective Extraction of Quercetin from Onion (Allium cepa L.) Skin Waste Using Water Dilutions of Acid-Based Deep Eutectic Solvents. Materials **2021**, 14, 6465.
114. Vasyliev, G.; Lyudmyla, K.; Hladun, K.; Skiba, M.; Vorobyova, V. Valorization of tomato pomace: Extraction of value-added components by deep eutectic solvents and their application in the formulation of cosmetic emulsions. Biomass Convers. Bior. **2022**, 12 (Suppl. S1), 95–111

115. Yang, J.; Yan, Z.; Li, L.; Zhang, L.; Zhao, M.; Yi, H.; Wang, Z.; Li, G.; Wang, Z.; Li, M.; et al. Green Extraction of Phenolic Compounds from Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn) Leaf Using Deep Eutectic Solvents: Process Optimization and Antioxidant Activity. Separations **2023**, 10, 272.
116. Fu, X.; Wang, D.; Belwal, T.; Xie, J.; Xu, Y.; Li, L.; Zou, L.; Zhang, L.; Luo, Z. Natural deep eutectic solvent enhanced pulseultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. LWT-Food Sci. Technol. **2021**, 144, 111220.
117. Panic, M.; Gunjevic, V.; Radosevic, K.; Cvjetko Bubalo, M.; Ganic, K.K.; Redovnikovic, I.R. COSMOtherm as an Effective Tool for Selection of Deep Eutectic Solvents Based Ready-To-Use Extracts from Grasevina Grape Pomace. Molecules, **2021**, 26, 4722.
118. Benvenutti, L.; Sanchez-Camargo, A.D.P.; Zielinski, A.A.F.; Ferreira, S.R.S. NADESS as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from Myrciaria cauliflora fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. J. Mol. Liq. **2020**, 315, 113761.
119. Lu,W.; Liu, S. Choline chloride–based deep eutectic solvents (Ch-DESs) as promising green solvents for phenolic compounds extraction from bioresources: State-of-the-art, prospects, and challenges. Biomass Convers. Bior. **2020**, 12, 2949–2962.
120. Huang, Y.; Feng, F.; Jiang, J.; Qiao, Y.; Wu, T.; Voglmeir, J.; Chen, Z.G. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. Food Chem. **2017**, 221, 1400–1405.
121. Cui, Q.; Liu, J.-Z.; Wang, L.-T.; Kang, Y.-F.; Meng, Y.; Jiao, J.; Fu, Y.-J. Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. J. Clean. Prod. **2018**, 184, 826–835.
122. Radoševic´, K.; C´ urko, N.; Gaurina Srcˇek, V.; Cvjetko Bubalo, M.; Tomaševic´, M.; Kovacˇevic´ Ganic´, K.; Radojcˇic´ Redovnikovic´, I. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. LWT-Food Sci. Technol. **2016**, 73, 45–51
123. da Silva, D.T.; Smaniotto, F.A.; Costa, I.F.; Baranzelli, J.; Muller, A.; Somacal, S.; Monteiro, C.S.; Vizzotto, M.; Rodrigues, E.; Barcia, M.T.; et al. Natural deep eutectic solvent (NADESS): A strategy to improve the bioavailability of

blueberry phenolic compounds in a ready-to-use extract. Food Chem. **2021**, 364, 130370.

124. Faggian, M.; Sut, S.; Perissutti, B.; Baldan, V.; Grabnar, I.; Dall'Acqua, S. Natural Deep Eutectic Solvents (NADESS) as a Tool for Bioavailability Improvement: Pharmacokinetics of Rutin Dissolved in Proline/Glycine after Oral Administration in Rats: Possible Application in Nutraceuticals. Molecules **2016**, 21, 1531.
125. Jha, A.K.; Sit, N. Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. Trends Food Sci. Technol. **2022**, 119, 579–591.
126. Kashyap, P.; Riar, C.S.; Jindal, N. Effect of extraction methods and simulated in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compound profile, bio-accessibility, and antioxidant activity of Meghalayan cherry (Prunus nepalensis) pomace extracts. LWT Food Sci. Technol. **2022**, 153, 112570.
127. Blackhall, M.L.; Berry, R.; Davies, N.W.; Walls, J.T. Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits' Prunus avium 'Lapins' cherries. Food Chem. **2018**, 256, 280–285.
128. Cavalluzzi, M. M., Lamonaca, A., Rotondo, N. P., Miniero, D. V., Muraglia, M., Gabriele, P., Lentini, G., Microwave-assisted extraction of bioactive compounds from lentil wastes: Antioxidant activity evaluation and Metabolomic characterization. *Molecules*, **2022**, *27*(21), 7471.
129. Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, **2020**, *1*(1), 60-69.
130. M07-A9; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard—Ninety Edition 2012; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, **2012**; Volume 32.
131. Barbarossa, A., Ceramella, J., Carocci, A., Iacopetta, D., Rosato, A., Limongelli, F., & Sinicropi, M. S. Benzothiazole-Phthalimide Hybrids as Anti-Breast Cancer and Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, **2023**, *12*(12), 1651.
132. Zhang, X., Zheng, F., Zhao, C., Li, Z., Li, C., Xia, Y., Xu, G. Novel Method for Comprehensive Annotation of Plant Glycosides Based on Untargeted LC-HRMS/MS Metabolomics. *Analytical Chemistry*, *94*(48), **2022**, 16604-16613.
133. Lee, D., Park, J. Y., Lee, S., & Kang, K. S. In vitro studies to assess the α-glucosidase inhibitory activity and insulin secretion effect of isorhamnetin 3-o-

glucoside and quercetin 3-o-glucoside isolated from Salicornia herbacea. Processes, **2021**, 9(3), 483.

134. Lee, J. H., Lee, S., Park, J. Y., Park, I. H., Kang, K. S., & Shin, M. S.. The Beneficial Effect of Salicornia herbacea Extract and Isorhamnetin-3-O-glucoside on Obesity. Processes, **2023**, 11(4), 977.

135. Sánchez-Gavilán, I., Ramírez, E., & de la Fuente, V. Bioactive compounds in Salicornia patula duval-jouve: A mediterranean edible euhalophyte. Foods, **2021**, 10(2), 410.

136. Elatif, R. A., Shabana, M., Mansour, R., & Awad, H. Chemical composition and biological activity of salicornia fruticosa L. Egyptian Journal of Chemistry, 63(5), **2020**, 1713-1721.

137. Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, **2020**, *9*(8), 709.

138. Opitz, S. E., Goodman, B. A., Keller, M., Smrke, S., Wellinger, M., Schenker, S., & Yeretzian, C. Understanding the effects of roasting on antioxidant components of coffee brews by coupling on-line ABTS assay to high performance size exclusion chromatography. *Phytochemical Analysis*, **2017**, *28*(2), 106-114.

139. Ling, J. K. U., San Chan, Y., Nandong, J., Chin, S. F.,Ho, B. K. Formulation of choline chloride/ascorbic acid natural deep eutectic solvent: Characterization, solubilization capacity and antioxidant property. *Lwt*, **2020**, *133*, 110096.

140. Viñas-Ospino, A., Panić, M., Radojčić-Redovniković, I., Blesa, J., & Esteve, M. J. Using novel hydrophobic deep eutectic solvents to improve a sustainable carotenoid extraction from orange peels. *Food bioscience*, **2023**, *53*, 102570.

141. Panić, M., Stojković, M. R., Kraljić, K., Škevin, D., Redovniković, I. R., Srček, V. G., & Radošević, K. Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food chemistry*, **2019**, *283*, 628-636.

142. Meléndez-martínez, Antonio J., Carotenoids: Considerations for their use in functional foods, nutraceuticals, nutricosmetics, supplements, botanicals, and novel foods in the context of sustainability, circular economy, and climate change. *Annual Review of Food Science and Technology*, **2021**, 12.1: 433-460.

143. Anticona, M., Blesa, J., Frigola, A., & Esteve, M. J. High biological value compounds extraction from citrus waste with non-conventional methods. *Foods*, **2020**, *9*(6), 811.
144. Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Fabiano Tixier, A. S. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, **2019**, *24*(16), 3007.
145. Gullon, P., Gullon, B., Astray, G., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Research International*, **2020,** *137*, 109683.