



**HAL**  
open science

## Caratterizzazione di metaboliti secondari presenti in varie specie di *Cistus* (fam. Cistaceae) in Sardegna

Patrizia Monica Mastino

► **To cite this version:**

Patrizia Monica Mastino. Caratterizzazione di metaboliti secondari presenti in varie specie di *Cistus* (fam. Cistaceae) in Sardegna. Other. Université Pascal Paoli; Università degli studi della Tuscia (Viterbo, Italie), 2017. Italian. NNT : 2017CORT0001 . tel-03416378

**HAL Id: tel-03416378**

**<https://theses.hal.science/tel-03416378>**

Submitted on 5 Nov 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI**

**Corso di Dottorato di Ricerca in**

**BIOTECNOLOGIE VEGETALI - XVIII Ciclo.**

**in co-tutela di tesi con**

**UNIVERSITA' DI CORSICA-PASQUALE PAOLI  
ECOLE DOCTORALE "Environnement et Société"- UMR CNRS 6134 SPE**

**CARATTERIZZAZIONE DI METABOLITI SECONDARI PRESENTI IN VARIE SPECIE DI *CISTUS*  
(FAM. *CISTACEAE*) IN SARDEGNA**

**s.s.d. BIO/15**

**Tesi di dottorato di:**

Dott. Patrizia Monica Mastino

**Coordinatore del corso:**

Prof. Stefania Masci

Firma .....

**Direttore di Tesi**

Prof. Marianna Usai

Firma .....

**Direttore di tesi**

Prof. Jean Costa

Firma.....

**Data della discussione**

03/05/2017

# RINGRAZIAMENTI

Il mio dottorato di ricerca in Biotecnologie Vegetali è arrivato a conclusione grazie a tante persone che hanno contribuito alla realizzazione del presente lavoro.

Un grandissimo grazie alla Prof. Stefania Masci che mi ha spinto ad intraprendere la strada del dottorato e che ha sempre creduto in me e senza la quale questo lavoro non sarebbe stato possibile.

Grazie ai miei tutors, la Prof.ssa Marianna Usai e il Dott. Mauro Marchetti, per avere consentito praticamente lo svolgimento della mia attività di ricerca e che mi hanno accompagnata non solo con i loro preziosi insegnamenti e suggerimenti, ma anche regalandomi la loro profonda amicizia.

Un sincero ringraziamento al Prof. Jean Costa che mi ha permesso di fare un'esperienza per me indimenticabile. Un grazie a tutti i ricercatori del laboratorio di "Chimie des Produits Naturels" dell'Università di Corte in Corsica per l'accoglienza e la collaborazione e in particolare a Frank Renucci per il suo aiuto nelle attività sperimentali e a Jean-Marie Desjobert per il supporto tecnico-scientifico e la sua grande simpatia.

Grazie alla Dott. Claudia Giuliano per il supporto e la collaborazione in campo microbiologico.

Tengo particolarmente a ringraziare i membri della giuria: la Prof. Roberta Bernini dell'Università della Tuscia, Viterbo, il Prof. Alain Muselli e il Dott. Julien Paolini dell'Università di Corsica-Pasquale Paoli per l'interesse dimostrato verso il mio lavoro e per aver accettato di far parte della commissione giudicatrice.

Il mio ringraziamento va anche e soprattutto alla mia famiglia, per avere considerato il mio lavoro sempre e comunque importante.

E infine grazie a tutte le amiche e gli amici che mi sono stati vicini e che mi hanno sopportato nei momenti no.

# Indice

ABSTRACT.....	1
RIASSUNTO.....	2
RÉSUMÉ .....	4
RÉSUMÉ VULGARISÉ.....	6
RIEPILOGO DIVULGATIVO.....	8
INTRODUZIONE.....	10
CAPITOLO I.....	12
1.1 Flora sarda ed etnobotanica.....	12
1.1.1 La flora e la vegetazione della Sardegna.....	12
1.1.2 Cistaceae.....	15
1.1.2.1 Genere Cistus .....	16
1.1.3.1 Il Cisto nella medicina popolare sarda.....	24
1.2 I metaboliti secondari delle piante.....	25
1.2.1 Il metabolismo vegetale.....	25
1.2.2 I terpeni.....	26
1.2.3 Composti fenolici.....	29
CAPITOLO II.....	40
2.1 L'organizzazione del lavoro sperimentale.....	40
2.2 Studio bibliografico sul genere Cistus .....	41
2.3 Raccolta del materiale vegetale.....	43
2.4 Estrazione dei principi attivi.....	45
2.4.1 Estrazione degli oli essenziali.....	45
2.4.2 Estrazione dei composti volatili.....	46
2.4.3 Estrazione della frazione polifenolica .....	47
2.4.3.1 Estrazione dei campioni raccolti nel 2014.....	47
2.4.3.2 Estrazione dei campioni raccolti nel 2015.....	49
2.5 Caratterizzazione chimica degli estratti.....	50
2.5.1 Caratterizzazione degli oli essenziali.....	50
2.5.1.1 Analisi gas cromatografica degli oli essenziali Cistus 2014.....	50
2.5.1.2 Analisi Gas Massa degli oli essenziali Cistus 2014.....	50
2.5.1.3 Identificazione dei costituenti Cistus 2014.....	51
2.5.1.4 Analisi gas cromatografica degli oli essenziali Cistus 2015.....	51
2.5.1.5 Analisi Gas Massa degli oli essenziali e frazione volatile Cistus 2015.....	51
2.5.1.6 Identificazione dei costituenti Cistus 2015.....	52
2.5.2 Caratterizzazione della frazione polifenolica.....	52
2.5.2.1 Analisi HPLC-DAD-ESI-MS.....	52
2.5.2.2 Analisi CL-UHP-SM/SM.....	55
2.6 Caratterizzazione attività biologica.....	56
2.6.1 Microorganismi e terreni di coltura.....	56
2.6.2 Diluizioni degli estratti .....	56
2.6.3 Attività antimicrobica.....	56

CAPITOLO III.....	58
3.1 Oli essenziali.....	58
3.1.1 Raccolta 2014.....	58
3.1.2 Raccolta 2015 <i>C. creticus</i> ssp.....	69
3.1.3 Raccolta 2016 <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> .....	80
3.2 Frazione fenolica.....	90
3.2.1 Raccolta 2014.....	90
3.2.1.1 <i>Cistus creticus</i> ssp.....	93
3.2.1.2 Altre specie di <i>Cistus</i> vegetanti in Sardegna.....	104
3.2.2 Raccolta 2015 <i>C. creticus</i> ssp.....	116
3.3 Attività antibatterica e antifungina.....	124
CONCLUSIONI.....	129
Problématique de Thèse et Principaux Résultats .....	133
BIBLIOGRAFIA.....	137

## ABSTRACT

*Cistaceae* family is widespread in the Mediterranean regions with several species and is traditionally known as a natural remedy. *Cistus* genus is present in Sardinia with populations of *C. monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. albidus* and *C. creticus* subspecies: *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *corsicus* and *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, but few previous phytochemical researches have been reported on *Cistus* species growing in Sardinia.

The aim of this research is to characterize the secondary metabolites in extracts of different species of *Cistus* in Sardinia and to evaluate antimicrobial activities.

The fresh aerial parts of the plants were extracted by using hydro-distillation for essential oils and several traditional solvents for the phenolic compounds. The chemical characterization of extracts has been realized by means of different chromatographic techniques such as GC/MS, HPLC-DAD-ESI-MS and CL-UHP-SM/SM. Antimicrobial activity was determined as Minimum Inhibitory Concentration by using an agar macrodilution method.

A comparative analysis on the composition of essential oils showed the existence of six different profiles. *C. creticus* subsp. *eriocephalus* showed a high amount of manoyl oxide and its isomer. *C. salvifolius* has pointed out the group of labdanes; another consistent percentage is made of perfumed molecules as ionone and its derivate. Several linear hydrocarbons were produced by *C. monspeliensis*, and the heneicosane was the most represented element. In *C. albidus* no labdane-type diterpenes were identified. Analysis of *C. creticus* subsp. *creticus* revealed several oxygenated sesquiterpenes and labdane-type diterpenes, especially manoyl oxide. *C. creticus* subsp. *corsicus* was qualitatively very similar to *C. creticus* subsp. *creticus*, notably concerning the labdane-type compounds. The analysis of the seven essential oils of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* show interesting characteristics and they would appear divided in two groups with different metabolic profiles. Among solvent extracts the obtained results allowed the detection of several phenolic compounds including phenolic acids, monomeric and dimeric flavan-3-ols, flavonol glycosides. They are characterized by a high percentage of rosmarinic acid and derivatives and of quercetin and derivatives. *C. salvifolius* is quantitatively most rich of phenolic compounds. The extracts exhibited any pronounced differences in their antimicrobial activities and revealed that Gram-positive bacteria are more sensitive to the *Cistus* extracts than Gram-negative bacteria.

**Key Words:** *Cistus* in Sardinia, essential oils, phenolic extracts, antimicrobial activity

## RIASSUNTO

La famiglia delle *Cistaceae* è molto diffusa nelle regioni del Mediterraneo con numerose specie ed è tradizionalmente conosciuta come rimedio naturale verso diverse patologie. Il genere *Cistus* è presente in Sardegna con popolazioni di *C. monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. albidus* e *C. creticus* con le sue sottospecie: *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, ma esistono pochi studi sul genere *Cistus* presente in Sardegna e sulla natura dei suoi metaboliti secondari.

Lo scopo di questa ricerca è la caratterizzazione dei metaboliti secondari presenti negli estratti di diverse specie di Cisto sardo e di valutare l'attività antimicrobica degli estratti.

Il materiale vegetale è stato estratto usando la tecnica dell'idrodistillazione per ottenere gli oli essenziali e diversi solventi tradizionali per ottenere la frazione fenolica. La caratterizzazione chimica è stata realizzata con diverse tecniche cromatografiche come GC/MS, HPLC-DAD-ESI-MS e CL-UHP-SM/SM. L'attività antimicrobica è stata determinata come Concentrazione Minima Inibitoria usando il metodo della macrodiluizione in agar.

L'analisi comparativa sulla composizione degli oli essenziali mostra l'esistenza di sei diversi profili. *C. creticus* subsp. *eriocephalus* mostra un'alta quantità di manoyl oxide e dei suoi isomeri. *C. salvifolius* ha messo in evidenza il gruppo dei labdani mentre un'altra consistente percentuale è costituita da molecole profumate come lo ionone ed i suoi derivati. Gli idrocarburi lineari rappresentano la percentuale maggiore in *C. monspeliensis* e l'heneicosane è il composto principale. In *C. albidus* non sono stati identificati diterpeni del gruppo dei labdani. L'analisi del *C. creticus* subsp. *creticus* ha rivelato la presenza di diversi sesquiterpeni ossigenati e di diterpeni del gruppo dei labdani. *C. creticus* subsp. *corsicus* è qualitativamente simile al *C. creticus* subsp. *creticus*, soprattutto per quel che concerne i composti labdanici. L'analisi di sette oli essenziali di *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* mostra caratteristiche interessanti e sembra che potrebbero essere divisi in due gruppi con differenti profili metabolici.

Tra gli estratti in solvente i risultati ottenuti hanno permesso di individuare numerosi composti fenolici che comprendono acidi fenolici, flavan-3-oli monomeri e dimeri e flavonoli glicosidici. Tutti e sei sono caratterizzati da un'alta percentuale di acido rosmarinico e derivati e di quercitina e derivati. *C. salvifolius* è la specie quantitativamente più ricca di composti fenolici. Tutti gli estratti non mostrano differenze significative per quel che riguarda l'attività antimicrobica, in particolare i batteri gram positivi sono più sensibili agli estratti dei batteri gram

negativi. Per nessun estratto è stata messa in evidenza un' interessante attività antimicotica.

***Parole Chiave:*** *Cistus* in Sardegna, oli essenziali, estratti fenolici, attività antimicrobica

## RÉSUMÉ

La famille des Cistacées est très répandue sur le pourtour du bassin méditerranéen. Elle regroupe de nombreuses espèces et elle est connue pour ses usages en médecine traditionnelle. En Sardaigne, le genre *Cistus* comprend les espèces *C. monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. albidus* et *C. creticus*. Cette dernière se décline en trois sous espèces *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *corsicus* et *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. Bien que certaines espèces du genre *Cistus* L. soient particulièrement abondantes dans le maquis sarde et que leur intérêt en ethnobotanique soit reconnu, nous ne retrouvons qu'un faible nombre de travaux dans la littérature traitant de la nature et de la teneur des principes actifs, notamment en ce qui concerne les composés phénoliques.

L'objectif de ce travail est de réaliser une étude comparative des huiles essentielles et des compositions phénoliques des espèces de Cistes poussant à l'état spontané en Sardaigne, d'étudier leurs activités antimicrobiennes.

Les huiles essentielles ont été préparées par hydrodistillation tandis que les extraits enrichis en composés phénoliques ont été obtenus à l'aide des solvants usuels. La caractérisation de la composition chimique a été réalisée à l'aide de différentes techniques chromatographiques et spectrométriques (GC-FID, GC/MS, LC-MS). L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en utilisant la macro-dilution en agar.

Pour les huiles essentielles issues des différentes espèces, nous avons identifié globalement 111 constituants et nous avons observé six profils distincts. *C. creticus* subsp. *eriocephalus* est dominé par le manoyl oxide et son stéréoisomère 13-épi. *C. salvifolius* est caractérisé par des teneurs importantes en molécules odorantes, comme l'ionone. *C. monspeliensis* présente de fortes teneurs en hydrocarbures à longue chaîne tel que l'héneicosane. *C. albidus* se distingue par l'absence de diterpènes de type labdane. *C. creticus* est caractérisé par de forts pourcentages en sesquiterpènes oxygénés et en labdanes. Concernant cette espèce, la subsp. *corsicus* (espèce endémique Corso-Sarde) présente de fortes similitudes avec la subsp. *creticus*, en particulier au niveau de la fraction diterpénique riche en labdanes. En revanche, la subsp. *eriocephalus* se distingue des deux autres taxons; notamment du fait de l'absence de production d'huile essentielle pour certaines populations Sardes.

L'analyse des extraits au méthanol acidifié, des échantillons recueillis en 2014, ont permis de d'identifier 72 composés phénoliques. Il s'agit principalement d'acides phénoliques, de flavan-3-ols et flavonoïdes glycosylés. D'un point de vue quantitatif, l'espèce la plus riche en composés phénoliques est *Cistus salvifolius* alors que *Cistus albidus* présente les plus faibles teneurs. Au niveau des profils en polyphénols, les subsp. *corsicus* et *eriocephalus* présentent une empreinte métabolique relativement semblable en comparaison de celle observée pour la subsp. *creticus*. Les extraits phénoliques montrent des activités antibactériennes, en particulier vis à vis des bactéries Gram positives, tandis qu'aucune activité antifongique significative n'a été observée contre les champignons pathogènes du genre *Candida*.

**Mots-clés:** *Cistus* de Sardaigne, huiles essentielles, composés phénoliques, activités antimicrobiennes

## RÉSUMÉ VULGARISÉ

La famille des Cistacées se compose de plantes herbacées ou ligneuses comprenant de nombreuses espèces très répandues sur le pourtour du bassin méditerranéen. Elles sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies. Les arbustes du genre *Cistus* poussent à l'état spontané et certains d'entre eux sont endémiques de la Sardaigne. Les différentes espèces sont *C. monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. albidus* et *C. creticus* se déclinant en trois sous-espèces : *C. creticus subsp. creticus*, *C. creticus subsp. corsicus* et *C. creticus subsp. eriocephalus*.

Les cistes sont des espèces pionnières des environnements dégradés, terres arides et habitats désertés par les hommes. La Cistaie s'installe souvent après les incendies et sont les premiers arbustes à émerger après le feu grâce à la bonne thermo-résistance des graines.

Bien que certaines espèces du genre *Cistus* L. soient particulièrement abondantes dans le maquis sarde et que leur intérêt en ethnobotanique soit reconnu, il n'existe, à notre connaissance, qu'un petit nombre de travaux scientifiques sur la composition chimique des Cistes de Sardaigne.

L'objectif de ce travail est, pour les différentes espèces de Cistes présentes en Sardaigne, de réaliser une étude comparative des compositions des huiles essentielles, d'une part, et de celles des extraits phénoliques, d'autre part. Il s'agit, également, d'étudier leurs activités antimicrobiennes.

Les huiles essentielles ont été préparées par hydrodistillation tandis que les extraits phénoliques ont été obtenus par extraction avec les solvants usuels. La caractérisation de la composition chimique a été réalisée à l'aide de différentes techniques chromatographiques.

L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

L'analyse chimique des huiles essentielles par chromatographie a permis d'identifier globalement 111 constituants. Les échantillons se répartissent en six profils différents, caractéristiques de chaque espèce et sous-espèce. L'analyse des échantillons d'huile essentielle de *Cistus creticus* montre des caractéristiques intéressantes. La sous espèce. *corsicus* (espèce endémique Corso-Sarde) présente de fortes similitudes avec la sous espèce. *creticus*. En revanche, la subsp. *eriocephalus* se distingue des deux autres taxons ; notamment du fait de

l'absence de production d'huile essentielle pour certaines populations Sardes.

L'analyse des extraits a permis de déterminer 72 composés. Il s'agit principalement d'acides phénoliques, flavan-3-ols et de flavonoïdes glycosylés. Tous les extraits sont caractérisés par de forts pourcentages d'acide rosmarinique et de ses dérivés ainsi que de quercitine et ses dérivés. *Cistus salvifolius* est l'espèce quantitativement la plus riche en composés phénoliques. Les extraits phénoliques montrent des activités antibactériennes, en particulier vis à vis des bactéries Gram positives, tandis que l'activité antifongique n'a pas été soulignée contre les champignons pathogènes du genre *Candida*.

**Mots-clés :** *Cistus* de Sardaigne, huiles essentielles, composés phénoliques, activités antimicrobiennes, activités anti-oxydantes.

## RIEPILOGO DIVULGATIVO

La famiglia delle Cistaceae è costituita da piante erbacee o legnose che comprende numerose specie molto diffuse nelle regioni del Mediterraneo e usate tradizionalmente come rimedi naturali verso diverse patologie. Gli arbusti del genere *Cistus* sono piante autoctone ed endemiche della Sardegna, facilmente coltivabili nel nostro territorio, e presenti con popolazioni di *C. monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. albidus* e le sottospecie di *C. creticus*: *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. Si tratta di arbusti che si adattano a qualsiasi condizione di crescita e per questo motivo considerati specie pioniere degli ambienti degradati e abbandonati dall'uomo che vengono completamente ricoperti dai cisti. Esiste una stretta correlazione tra incendio e presenza dei cisteti, grazie alla buona termo-resistenza dei semi.

Nonostante le diverse specie di cisto si ritrovino in abbondanza su tutto il territorio sardo, esistono pochi studi sul genere *Cistus* presente in Sardegna e sulla natura dei suoi metaboliti secondari.

Lo scopo di questa ricerca è la caratterizzazione dei metaboliti secondari presenti negli estratti delle diverse specie di cisto sardo e di valutarne l'attività antimicrobica e antiossidante.

Il materiale vegetale è stato estratto usando la tecnica dell'idrodistillazione per ottenere gli oli essenziali e diversi solventi tradizionali per ottenere la frazione fenolica. La caratterizzazione chimica è stata realizzata con diverse tecniche cromatografiche come GC/MS, HPLC-DAD-ESI-MS e CL-UHP-SM/SM. L'attività antimicrobica è stata determinata come Concentrazione Minima Inibitoria usando il metodo della macrodiluzione in agar.

La composizione chimica degli oli essenziali determinata per via gascromatografica ha permesso l'identificazione, per ogni specie, di numerosi composti e i campioni presentano sei profili estremamente diversi tra loro e caratteristici di ciascuna specie e sottospecie. L'analisi di sette oli essenziali di *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* mostra caratteristiche interessanti e sembra che potrebbero essere divisi in due gruppi con differenti profili metabolici.

La frazione fenolica delle Cistacee, riveste una notevole importanza per le sue caratteristiche antiossidanti e antibatteriche, come descritto in alcune pubblicazioni. I risultati ottenuti dalla caratterizzazione degli estratti di cisto sardo hanno permesso di individuare numerosi composti fenolici che comprendono acidi fenolici, flavan-3-oli monomeri e dimeri e flavonoli glicosidici.

Tutti e sei sono caratterizzati da un'alta percentuale di acido rosmarinico e derivati e di quercitina e derivati. *C. salvifolius* è la specie quantitativamente più ricca di composti fenolici.

Tutti gli estratti non mostrano differenze significative per quel che riguarda l'attività antimicrobica, in particolare i batteri gram positivi sono più sensibili agli estratti dei batteri gram negativi. Per nessun estratto è stata messa in evidenza un'interessante attività antimicotica.

**Key Words:** *Cistus* in Sardegna, oli essenziali, estratti fenolici, attività antimicrobica

# INTRODUZIONE

Le piante da sempre sono state fonte di nutrimento e cura per gli esseri viventi. Il loro duplice compito di produttori di sostanze nutritive e medicinali ha giocato un ruolo fondamentale nell'evoluzione (e co-evoluzione) degli organismi erbivori e onnivori.

Le piante possiedono la caratteristica di essere molto più ricche degli animali nella loro diversità biochimica. La spiegazione di questo fenomeno risiede probabilmente nel fatto che le piante sono vincolate al suolo e hanno dovuto sviluppare una molteplicità di meccanismi di adattamento più di quanto sia stato necessario per gli animali, i quali hanno a disposizione altri strumenti per la loro sopravvivenza (per esempio, lo spostamento per la ricerca del cibo o la fuga per la difesa). Ad esempio i principi biologicamente attivi potenzialmente utilizzabili in nutraceutica, fitoterapia o come additivi alimentari, sono da ricercarsi tra i metaboliti secondari (o speciali) delle piante, ovvero i prodotti del metabolismo che non sono essenziali per la semplice crescita, sviluppo o riproduzione della pianta, quali mucillagini, gomme, glicosidi, tannini, alcaloidi, saponine, antrachinoni, flavonoidi, oli essenziali hanno ruoli funzionali ben precisi, volti a difendere in primo luogo le piante dagli stress di natura abiotica (temperatura, luce, disponibilità di acqua, ecc.) e biotica (attacchi di erbivori, funghi, batteri e virus) (Maffei, 2015).

Negli ultimi decenni la chimica delle sostanze naturali è stata oggetto di un'intensa attività di ricerca; infatti, sebbene la maggior parte dei farmaci di ultima generazione sul mercato sia di origine sintetica, le sostanze naturali ed in particolare i metaboliti secondari di origine vegetale, isolati e caratterizzati da un grande e vario numero di specie, hanno avuto ed hanno un ruolo fondamentale nella ricerca e nello sviluppo di nuovi farmaci.

La diversità chimica che caratterizza le molecole naturali rende lo studio delle loro caratteristiche biologiche, non solo una delle principali fonti di nuovi composti potenzialmente utilizzabili per la realizzazione di nuovi farmaci, ma anche uno strumento utile per la scoperta di nuovi meccanismi d'azione e per l'identificazione delle specie vegetali con lo studio della chemiotassonomia. È per questo che gli studi fitochimici rappresentano un campo in continua evoluzione ed in continuo progresso, grazie soprattutto a nuove tecniche che hanno permesso di raggiungere con maggiore facilità e in minor tempo gli scopi desiderati; di pari passo anche gli

studi di botanica, di etnobotanica, di farmacologia e di medicina hanno subito un incremento e ad oggi grazie a questa interdisciplinarietà è possibile avere molte più informazioni sulle piante medicinali e sul loro impiego razionale in campo medico.

In questo contesto, lo studio dei metaboliti secondari estraibili da piante ed erbe si è rivelato uno dei campi più importanti e promettenti della botanica applicata e della chimica moderna, sia per le nuove tecniche estrattive dalle matrici vegetali e sia per le possibilità di utilizzo delle molecole biologicamente attive.

Il programma del mio Dottorato in Biotecnologie Vegetali, svolto in co-tutela con l' Université de Corse "Pasquale Paoli"-Corte presso il Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (CPN), è stato principalmente finalizzato all'estrazione dei metaboliti secondari di piante del genere *Cistus*, appartenenti alla famiglia delle *Cistaceae* (estremamente diffuse in tutto il territorio della Sardegna) ed alla successiva caratterizzazione della composizione chimica e dell'attività biologica e antiossidante. Le matrici vegetali sarde da studiare sono state individuate, in via preliminare, sulla base di informazioni di origine etnobotanica riguardanti in particolare l'attività antibatterica e antimicotica.

L'attività di ricerca è stata svolta presso i Laboratori del Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio dell' Università degli Studi di Sassari, l'Istituto di Chimica Biomolecolare del C.N.R. di Sassari e presso il Laboratoire de Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, Corte.

Come tecniche di estrazione sono state privilegiate le tecniche tradizionali come l'idrodistillazione e l'estrazione in solvente. La caratterizzazione chimica degli oli essenziali è stata realizzata mediante l'impiego della gascromatografia, accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Nel caso delle frazioni estratte in solvente, per la caratterizzazione qualitativa e quantitativa, si è ricorso alla cromatografia in fase liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC/MS).

Su tutti gli estratti fenolici sono stati eseguiti test miranti a determinarne l'attività biologica (antibatterica, antimicotica), in collaborazione con la Dott.ssa Claudia Juliano presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari.

# CAPITOLO I

## Flora sarda e metaboliti secondari

### 1.1 Flora sarda ed etnobotanica

#### 1.1.1 La flora e la vegetazione della Sardegna

La Sardegna rappresenta un' eco-regione del Mediterraneo centrale dotata di un patrimonio di biodiversità vegetale unico in ambito europeo, con oltre 2300 piante vascolari spontanee stimate, fra cui 300 specie endemiche, e circa 900 di esse sono conosciute in vario modo e utilizzate per gli scopi più disparati.

I primi studi sulla flora della Sardegna risalgono alla seconda metà del '700 ma è solo nei primi anni dell'800 che ha inizio un'indagine sistematica su tutto il territorio isolano per merito di Giuseppe Giacinto Moris (Medico Piemontese), il quale diede vita ad un'opera dal titolo "*Flora sardoa*" che, sebbene incompleta, fu fondamentale per la conoscenza del patrimonio vegetale dell'isola e punto di partenza di ulteriori e più approfondite ricerche.

Da quel momento in poi il contributo di numerosi botanici delle Università sarde e in particolare le indagini effettuate dall'Arrigoni (2010) hanno consentito di definire lo stato delle conoscenze attuali della flora sarda.

Diversi sono i fattori che hanno contribuito a caratterizzare e differenziare il paesaggio vegetale naturale dell'Isola da altri territori anche topograficamente vicini. Primo fra tutti, la privilegiata posizione geografica dell'isola al centro del Mediterraneo e soprattutto le condizioni di isolamento nel quale l'Isola si viene a trovare a partire dal Miocene inferiore e che hanno determinato la differenziazione genetica di specie che pertanto risultano uniche al mondo.

Un altro elemento che ha influito in maniera decisiva sulla composizione floristica della Sardegna è il quadro climatico, dato dall'alternarsi di due stagioni, una caldo-arida e una freddo-



Figura 1: Sardegna ripresa dal satellite

umida. Il deficit idrico estivo rappresenta il principale fattore limitante e costringe la flora ad una serie di adattamenti strutturali e funzionali.

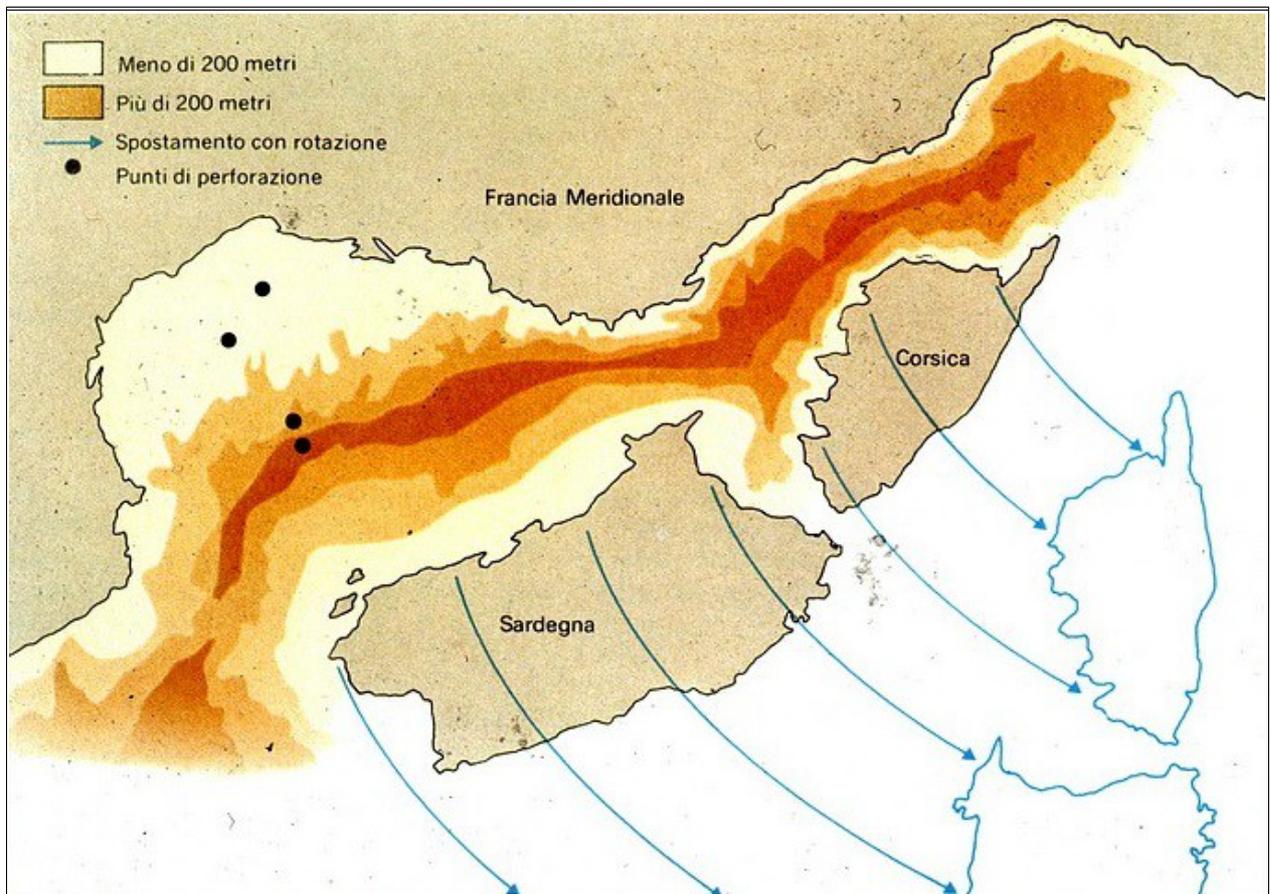
Le condizioni di isolamento prolungato dovuto alla presenza di barriere geografiche, ecologiche o biologiche che impediscono la dispersione e la diffusione di una determinata specie hanno determinato per numerose entità (soprattutto quelle più polimorfe) una differenziazione morfologica e genetica in risposta alle condizioni ambientali, tale da produrre fenomeni di speciazione.

Le maggiori affinità floristiche sono condivise con la Corsica, con la quale sino a circa 10.000 anni or sono costituiva un'unica entità geografica, formando un grande blocco che è stato spesso ritenuto come una microzolla o microcontinente.

Trenta milioni di anni fa tale blocco ha incominciato ad allontanarsi dalla placca europea, in particolare dalla Provenza, ruotando in senso antiorario, in maggior misura il versante sud rispetto a quello settentrionale (Fig. 2). In seguito, l'isolamento fu interrotto brevemente per fenomeni legati alla chiusura dello stretto di Gibilterra (5,6 milioni di anni fa) e alle glaciazioni (l'ultimo massimo glaciale risale a circa 15.000 anni fa) favorendo lo sviluppo di evoluzioni autoctone di specie ed intere biocenosi. Pertanto l'Isola è oggi caratterizzata da endemismi tipicamente sardi e altri condivisi con la vicina Corsica con la quale costituisce il Dominio floristico Sardo-Corso (si citano tra i tanti possibili esempi *Genista corsica*, *Crocus minimus*, *Colchicum corsicum*, *Silene velutina*, *Helleborus argutifolius*, *Cistus creticus subsp. corsicus*).

In Sardegna è stata messa in evidenza la presenza di un ricco contingente di specie vegetali suscettibili di interesse farmacologico: ben oltre 390 specie sono riconosciute come medicinali (Camarda e Satta, 1996; Atzei, 2003) e 20 sono inserite nella XI Edizione della F.U.I. in quanto riconosciute officinali in senso stretto. In modo particolare, le piante che compongono la “macchia mediterranea” sono state oggetto di attenzione da parte di studiosi di campi tra loro molto differenti, che vanno dalla botanica sistematica, alla ingegneria naturalistica, alla fitochimica, all'agronomia, all'etnobotanica, all'alimentazione, alla linguistica, nonostante, ancora oggi, la presenza di queste specie nel nostro territorio sia considerata invasiva dagli abitanti. La conoscenza delle caratteristiche biologiche, agronomiche e produttive di queste piante costituisce un passo importante per permettere di valorizzarne le potenzialità.

La macchia mediterranea è un tipo di formazione vegetale legnosa, proprio del clima mediterraneo (zona litoranea e sublitoranea), costituito prevalentemente da arbusti generalmente sempreverdi e sclerofillici, associati a piante lianose anch'esse in prevalenza xerofitiche e spesso spinescenti.



*Figura 2: Distacco del blocco Sardo-Corso dalla placca continentale. Le frecce azzurre indicano la rotazione delle due regioni per raggiungere la posizione odierna.*

Nelle radure, ridotte nella macchia chiusa o continua, più estese nella macchia discontinua o aperta, trovano posto le piante erbacee.

Le specie arbustive che entrano nella composizione della macchia mediterranea sono circa 150, ma la massa principale è costituita solo da una quarantina di esse (Atzei et al., 2004).

Poiché la macchia mediterranea ricopre una parte consistente del territorio sardo, ne segue che l'utilizzo delle piante della macchia interessa, ed ha interessato particolarmente nel passato, una vasta fascia della popolazione dell'Isola e che ricopre tutti gli aspetti degli usi tradizionali costituendo un bagaglio di conoscenze mantenuto grazie al sapere tramandato oralmente dalla popolazione anziana (Angioni, 1989; Camarda, 1990).

Per tutti questi motivi la valorizzazione degli arbusti della macchia mediterranea sarda va vista in un quadro che tenga conto della tradizione e delle loro potenzialità di utilizzo in numerosi campi, che vanno dalla tutela ambientale allo sfruttamento sostenibile delle risorse, dalle produzioni di pregio (alimentari e non) alle nuove scoperte per la salute umana.

### 1.1.2 *Cistaceae*

La famiglia delle *Cistaceae* appartiene all'ordine delle *Parietales* o *Cistales*. Comprende arbusti, suffrutici o erbe sia perenni sia annue. Hanno foglie semplici a margine intero, comunemente opposte soprattutto nella parte inferiore del fusto, meno frequentemente sparse; possono essere stipolate o meno, ma in tal caso il picciolo è dilatato a forma di guaina e sono per lo più caratterizzate da un indumento tomentoso di tricomi stellati.

I fiori possono essere solitari o portati in cime terminali pauciflore, sempre pentameri ed ermafroditi.

Il calice, persistente nel frutto, può essere formato da cinque o tre sepali, contorti nel boccio, spesso disuguali se cinque, normalmente due sono più piccoli, oppure, come in *Helianthemum*, molto ridotti così che il calice appare con soli 3 sepali.

La corolla, caduca, contorta nel boccio, è formata generalmente da cinque petali, di colore bianco, giallo o roseo di varie sfumature, ad unghia corta e lembo più o meno diviso.

L'androceo è formato di numerosi stami liberi, inseriti su un androforo; in *Cistus* e *Helianthemum* gli stami sono inseriti in modo tale da favorire l'autoimpollinazione.

Il frutto è una cassula coriacea o legnosa, loculicida, circondata dal calice persistente con semi numerosi, piccoli, angolosi.

Nella famiglia sono presenti peli ghiandolari pluricellulari uni-seriati più o meno vischiosi, e resine aromatiche; l'impollinazione è crociata; sono noti casi di cleistogamia (in *Cistus* e *Helianthemum*).

Sono piante diffuse in prevalenza nel bacino del Mediterraneo, prediligono per lo più ambienti aridi, assolati ed alcune specie hanno una spiccata predilezione per i terreni calcarei. Sono comunque presenti in tutto il resto dell'Europa, del Nord-America, del Nord-Africa e dell'Asia occidentale. Questa famiglia comprende sette generi secondo alcuni autori e otto secondo altri.

Per quanto riguarda le specie da ascrivere a questa famiglia esiste una notevole discordanza di opinioni, infatti secondo alcuni autori sarebbero 175, mentre secondo altri 250-300.

Durante gli anni, la classificazione della famiglia delle *Cistaceae* ha subito notevoli modificazioni da parte di molti studiosi, a causa del polimorfismo delle numerose specie che vi appartengono e della loro possibilità di ibridazione interspecifica e intergenica.

Attualmente viene accettata la divisione fatta da Grosser nel 1903 in 7 generi: *Cistus*, *Fumana*, *Helianthemum*, *Tuberaria*, *Halimium*, *Hudsoni* e *Lechea* nell'ambito del quale qualche

AA. successivo distingue il genere *Crocanthemum* per specie americane.

Nella flora dell'Europa meridionale e in quella dell'intero bacino del Mediterraneo, inclusa l'Africa settentrionale e l'Asia occidentale, sono presenti i primi 5 generi, tutti rappresentati in Italia e in Sardegna. Alcune specie sono molto apprezzate nell'industria dei profumi e altre sono state usate sin dai tempi più antichi nella medicina popolare.

### 1.1.2.1 Genere *Cistus* (Camarda e Valsecchi, 2008; Atzei, 2003)

Le piante del genere *Cistus* sono per lo più arbusti generalmente ricoperti da una densa peluria con peli semplici e/o ghiandolosi sia nei giovani fusti che nelle foglie. Le foglie sono opposte, più o meno persistenti, intere, prive di stipole con picciolo più o meno allargato. I fiori sono grandi con almeno 2 cm di diametro, talora con la sola unghia gialla o arancio diventanti giallognoli, bianchi, rosei o rosso-porpora con cinque-tre sepali, solitari, in cime o in racemi. Il calice è dialipetalo di cinque sepali pelosi con corolla di cinque petali e stami numerosi. Il frutto è una cassula triloculare.

Si tratta di arbusti che si adattano a qualsiasi condizione di crescita e per questo motivo considerati specie pioniere degli ambienti degradati e abbandonati dall'uomo che vengono completamente ricoperti dai cisti. Esiste una stretta correlazione tra incendio e presenza dei



cisteti, ma essi sono ugualmente presenti nei terreni denudati dalle arature e impoveriti di sostanza organica. In condizione di naturalità occupano ambienti aperti, rocciai, zone costiere e terreni esposti alla erosione eolica.

Nelle macchie incendiate i cisti, tutti molto eliofili, con la ripresa vegetativa e la ricrescita dei polloni delle sclerofille sempreverdi perdono vitalità e si rarefanno. Si conserva, tuttavia, una notevole banca semi nel terreno, che consente di riprendere il ciclo in caso di verificarsi di nuovi incendi. La capsula coriacea dei semi al passaggio del fuoco si mantiene integra, proteggendoli. Ai semi è associata anche una buona termo-resistenza, che consente loro di germinare abbondanti già alle prime piogge, ricoprendo in breve tempo il terreno

e contribuendo così a dare un'efficace protezione al suolo dall'erosione idrica. Il ruolo di queste piante nell'ecosistema è molto importante, perché nei suoli degradati in poco tempo ricostituiscono una copertura vegetale, esercitando una protezione che favorisce anche la ripresa di specie più esigenti.

Il genere *Cistus* comprende numerose specie, distribuite nelle regioni mediterranee caldo-aride e temperate (Fig 3).

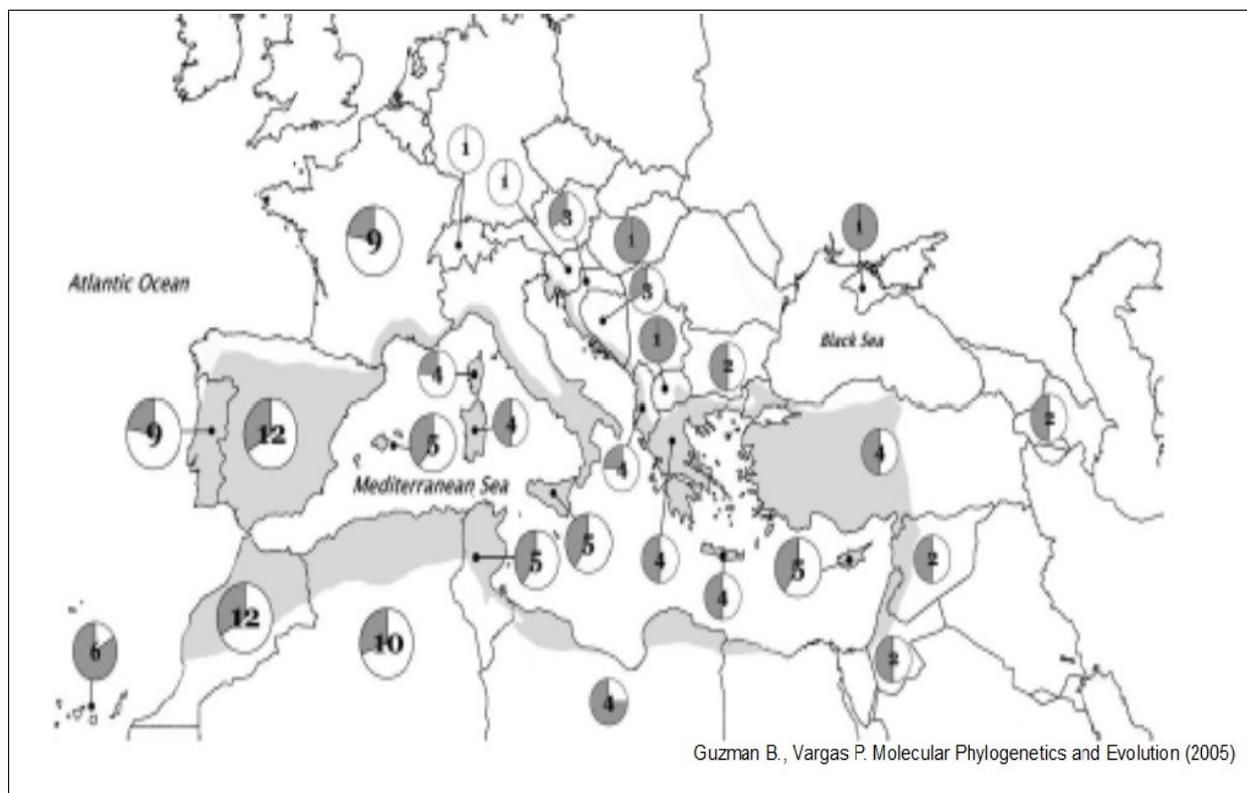


Figura 3: Distribuzione del genere *Cistus*. Nei diagrammi a torta è indicato il numero delle specie presenti in ogni regione ed è indicata la proporzione tra le specie a fiori bianchi (bianco) e a fiori rosa (grigio scuro). Da notare la maggiore biodiversità presente nella regione del Mediterraneo, indicata in grigio.

Da alcune specie si ricava una resina, vischiosa, nerastra o rosso cupa, il laudano, usato come astringente, balsamico e sedativo. Il nome *Cistus* sembra derivare dal greco "kistis" (vescichetta), per indicare la particolare forma rigonfia dei frutti.

Tra le varie specie del genere *Cistus*, in Sardegna ne sono presenti quattro: *C. salvifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. albidus* L., e *C. creticus* L. con le sue tre sottospecie: *C. creticus* L. subsp. *creticus*, *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet. e *C. creticus* L. subsp. *corsicus* (Loisel.) Greuter & Burdet. (quest'ultimo endemico in Sardegna e Corsica).

L'inquadramento tassonomico del genere *Cistus* di seguito riportato è quello descritto da Camarda e Valsecchi (2008) che a sua volta si basa sulla monografia dei Cisti d'Italia di

Rizzotto (1979) ed è in accordo con la trattazione di Pignatti (1982). I cisti a fiori rosa della Sardegna ad eccezione di *Cistus albidus*, sono stati considerati di volta in volta come un complesso costituito da una grande specie suddivisa in sottospecie o varietà. La pelosità, ghiandolosità, la forma e l'increspatura delle foglie hanno grande variabilità, legata anche al luogo di crescita e, in realtà, il complesso *C. incanus/creticus/corsicus* è costituito da entità con esemplari spesso difficilmente distinguibili tra loro. In effetti esistono forme intermedie di cui è difficile accertare se debbano essere considerate nell'ambito della variabilità propria della specie, oppure se si tratti di veri e propri ibridi, come descritto da Vogt et al. (1987) che suggerisce la possibile origine ibrida di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* con *C. salvifolius*, o come avviene in modo evidente nel caso di *C. florentinus* Lam. che trae origine dall'incrocio tra *C. monspeliensis* e *C. salvifolius* e che si riscontra sporadicamente.



*Cistus monspeliensis* in piena fioritura.

***Cistus monspeliensis* L., Sp. Pl.: 524 (1753)**

Nomi italiani: *Cisto marino*; *Cisto di Montpellier*.

Nomi sardi: *Mudregu*; *Mudre'u biancu*; *Mulde'u nieddu*.

Nomi stranieri: Ingl., *Montpellier Rockrose*; Fr., *Ciste de Montpellier*; Ted., *Montpellier-Zistrose*.

Pianta legnosa di 1-2 metri di altezza, molto vischiosa nei rami superiori, di forte odore non gradevole. Rami giovani peloso-ghiandolosi. Corteccia bruna. Foglie lineari o lanceolate, sessili o quasi sessili, di colore verde-scuro, con margine revoluto, rugose nella pagina superiore, poco pelose. Fiori piccoli, di 2-3 cm di diametro, bianchi o bianco-giallognoli; peduncoli eguali al calice, poco pelosi, con molte papille vischiose; calice con sepali

ovato-lanceolati, diseguali, quelli più interni di dimensioni maggiori, mucronati, pelosi e ghiandolosi; corolla con petali troncato-smarginati. Ovario peloso-ghiandoloso nella parte superiore. Stilo breve. Stigma rotondeggiante, lobato. Capsula arrotondata, pelosa nella parte superiore. 2N=18.

**Tipo biologico.** Pianta legnosa, ramificata a poca distanza dalla base e quindi monocormica non

pollonante, semi-sclerofillica. Nanofanerofita.

**Fenologia.** Fiorisce da marzo a maggio e fruttifica a giugno. Dopo la fioritura si ha prima un annerimento, poi una devitalizzazione delle foglie con la loro caduta parziale o totale nel periodo estivo. La ripresa vegetativa avviene dopo le piogge, in autunno, si arresta nei periodi più freddi e riprende ai primi caldi. Nelle zone più aride si comporta come una specie caducifolia.

**Areale.** L'areale di questa specie comprende l'Europa meridionale, l'Africa settentrionale e l'Asia Minore.

**Ecologia.** *C. monspeliensis* vive sui suoli aridi, sterili, sassosi, sabbiosi, estendendosi dalle zone litoranee a quelle montane, sino a circa 1200 m di quota, E' una specie che predilige decisamente i substrati silicei e solo molto raramente si estende sul terreno di natura calcarea.

**Caratteristiche e utilizzazioni.** Il legno di *C. monspeliensis* è il più duro tra quelli nostrani e brucia con fiamma molto vivace e con calore costante, caratteristica utile per la cottura non solo del pane, ma anche delle brocche e delle ceramiche artigianali. E' una pianta rifiutata dal bestiame, solo raramente brucata dalle capre, ed è infestante dei pascoli degradati. Merita invece attenzione come pianta mellifera, molto visitata dalle api.



*Cistus salvifolius*.

***Cistus salvifolius* L., Sp. Pl.: 524 (1753)**

Nomi italiani: *Brentine, Scornabecco.*

Nomi sardi: *Mudegu porceddinu, Murdegu burdu, Mucchiareddu.*

Nomi stranieri: Fr., *Ciste à feuilles de sauge*; Ted., *Salbeiblättrige-Zistrose.*

Arbusto di altezza variabile da 0,2 a 1,6 m, molto ramificato con rami densi e contorti, peloso, ma non vischioso. Corteccia bruno-scuro. Foglie ovali od oblunghe, cuoriformi alla base, picciolate, uninervie, molto reticolate nella pagina inferiore, con peli stellati sulle due pagine. Fiori bianchi, grandi, di 4-5 cm di diametro, isolati o riuniti a due o tre; peduncoli fiorali allungati; calice con sepali ovato-cuoriformi, brevemente mucronati, più o meno tomentosi; corolla con petali rotondeggianti, tronchi superiormente ed unghia breve giallastra. Ovario peloso con lungo stilo a stimma a capocchia.

Capsula globosa, con apice appianato, trivalve, pelosa.  $2N=18$ .

**Tipo biologico.** Arbusto eretto o talvolta prostrato a formare pulvini. Nanofanerofita.

**Fenologia.** Fiorisce da febbraio a giugno e fruttifica a maggio-luglio in relazione all'altitudine.

**Areale.** E' diffuso in tutta la regione mediterranea ed in Asia Minore sino al Caucaso ed all'Iran. In Sardegna è presente in gran parte dell'Isola ad eccezione delle creste più elevate del Gennargentu.

**Ecologia.** Il *C. salvifolius* è indifferente al substrato, seppure con una predilezione per quelli silicei, e si estende dal livello del mare sino alle zone montane, in ambienti soleggiati, aridi e sassosi, ma anche in luoghi freschi ed ombrosi. Nelle zone riparate si sviluppa formando cespugli alti anche mezzo metro.

**Caratteristiche e utilizzazioni.** Le modeste dimensioni, la fragilità e la poca compattezza dei rami ne restringono l'uso. La sua legna brucia con fiamma viva, ma è poco durevole e si usa principalmente come innesco per il fuoco. A differenza di *C. monspeliensis*, viene brucato dagli animali.



*Cistus albidus*.

***Cistus albidus* L., Sp. Pl.: 524 (1753)**

Nomi italiani: *Cisto bianco*.

Nomi sardi: *Montrecu biancu*; *Mudeju areste*; *Mudre'u voinu*.

Nomi stranieri: Fr., *Ciste blancheâtre*; Ted., *Weissliche Zistrose*.

Arbusto alto da 0,5 a 1,2 m, molto ramificato. Rami ricoperti da un denso tomento bianco. Corteccia bruno-cannella che si stacca a lamine sottili. Foglie vellutate, ovali-lanceolate, ristrette alla base, sessili, con la nervatura centrale e due laterali ben evidenti e ricoperte da un fitto intreccio di peli bianchi stellati; margine intero, revoluto. Fiori rosei, grandi 4-6 cm, disposti su peduncoli allungati in racemi sub-corimbosi terminali; peduncolo florale con brattea ovale-lanceolata, simile alle foglie; calice con cinque sepali mucronati, più corti della metà dei petali, ovato cuoriformi, margine revoluto, con abbondanti peli stellati frammisti a peli ghiandolosi; corolla con cinque petali grandi ad

unghia breve. Stami numerosi con antere rotondeggianti. Ovario pubescente con stilo lineare e stimma subconico. Cassula pelosa. Semi di colore marron-scuro, solcati e papilloso.  $2N=18$ .

**Tipo biologico.** Arbusto sempreverde a portamento eretto, cespitoso. Nanofanerofita.

**Fenologia.** Fiorisce in maggio-giugno e matura le capsule in luglio-agosto.

**Areale.** L'areale comprende l'Europa occidentale e meridionale e l'Africa settentrionale. In Sardegna è presente nel settore centrale dell'Isola, in particolare nelle zone medio-montane del Monte Ortobene, dei monti di Orune e dell'Altipiano di Bitti-Buddusò, del Monte Lerno, dove forma estesi cisteti.

**Ecologia.** Tra i cisti della Sardegna, *C. albidus* appare come la specie più mesofila; vive nelle zone sassose dal livello del mare sin oltre i 1000 m di quota, sui substrati preferibilmente di natura silicea, in ambienti soleggiati.

**Caratteristiche e utilizzazioni.** Come *C. salvifolius* viene utilizzato per avviare l'accensione del fuoco. Si presta bene come pianta da giardino, grazie alla sua rusticità, resistenza alla siccità e alla bella fioritura.



Fiori di *Cistus creticus*.

***Cistus creticus* L., Syst., ed. 10, 2: 1077 (1759)**

Sin.: *Cistus incanus* subsp. *creticus* (L.) Heywood in Feddes Repert. 79:60 (1968).

Nomi italiani: *Rosola*.

Nomi sardi: *Murdegu arrubiu*.

Arbusto di 40-50 cm, molto ramoso, peloso-ghiandoloso. Foglie ovali, sessili, di 15-25mm, con margine fortemente ondulato-crespo, reticolate, vischiose; peli stellati e peli ghiandolosi su tutto il lembo e maggiormente sul margine e sulle nervature; guaine corte e saldate fra loro. Fiori rosei o porporini, di 4-5 cm di diametro, disposti in infiorescenze sub-corimbose; pedicelli lunghi, peloso-ghiandolosi, brattea lanceolata, corta; calice con sepali ovali-lanceolati, mucronati, margine basale ripiegato all'esterno, peli semplici e ghiandolosi; corolla con petali grandi, margine ondulato-crenato, unghia breve. Capsula triloculare con densi peli.

**Tipo biologico.** Arbusto sempreverde a portamento eretto. Nanofanerofita.

**Fenologia.** Fiorisce in maggio-giugno, fruttifica in luglio.

**Areale.** L'areale di *Cistus creticus*, come qui è inteso, è accentrato soprattutto sul Mediterraneo orientale e il sistema sardo-corso rappresenterebbe il limite occidentale della sua area di diffusione. In Italia è presente nelle regioni meridionali e in Sicilia, mentre in Sardegna è stato segnalato nelle le aree calcaree costiere centro-orientali.

**Ecologia.** Vive nelle zone aride soleggiate, collinari, su terreni calcarei o argillosi.

**Caratteristiche e utilizzazioni.** Come *Cistus albidus* L.



Fiori di *Cistus corsicus*.

***Cistus corsicus* Loisel.,** Mém. Soc. Linn. Paris, 6: 416 (1827)

Sin.: *Cistus creticus* L. ssp. *corsicus* (Loisel.) Greuter & Burdet in Greuter & Raus, *Willdenowia*, 11 (2) : 275 (1981).

Nomi italiani: Rosola

Nomi sardi: vedi *Cistus creticus* L.

Nomi stranieri: Ted., *Korsische Zistrose*.

Arbusto eretto, ramoso, con rami giovani coperti da peli semplici frammisti a peli stellati. Foglie opposte, ovali o ovali-lanceolate, ricoperte da radi peli bianchi, reticolate e con tre nervature principali ben evidenti; margine leggermente ondulato; guaine fogliari non saldate tra loro e con lunghi peli alla base. Fiori disposti in brevi cime con peduncoli peloso-ghiandolosi; brattee simili alle foglie; calice con 5 sepali, ovali, mucronati, peloso-ghiandolosi, con margine ondulato; corolla rosa, 4-5 cm di diametro. Ovario con ghiandole nettariifere alla base. Capsule con peli lunghi.

**Tipo biologico.** Arbusto cespitoso sempreverde con rami lassi. Nanofanerofita.

**Fenologia.** Fiorisce in aprile-maggio e fruttifica in giugno.

**Areale.** Endemismo sardo-corso, in Sardegna si trova nelle aree scistose intorno al lago di Baratz, nella parte Nord-occidentale dell'Isola.

**Ecologia.** Vive su differenti substrati e in diversi ambienti: nel sottobosco della lecceta mista,

presso le sponde dei corsi d'acqua, nelle zone marginali dei sentieri e in quelle sassose, comportandosi come specie mesofila.

**Caratteristiche e utilizzazioni.** Come *Cistus albidus* L.



*Cistus incanus.*

***Cistus incanus* L. Sp. Pl.: 524 (1753)**

Sin.: *C. creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet; *Cistus incanus* L.; *Cistus garganicus* Ten. (incl.); *Cistus villosus* Auct. Fl. Ital.)

Nomi italiani: *Rosola*.

Nomi sardi: *Mudegu biancu*, *Murdegu femina*, *Mudrecu burdu*.

Nomi stranieri: Ingl., *Hoary Rockrose*; Fr., *Ciste cotonneux*; Ted., *Wollköpfige Zistrose*.

Arbusti con rami giovani ricoperti da lunghi peli bianchi frammisti a peli stellati. Foglie ovali od ovali-lanceolate, picciolate, con apice arrotondato o acuto, pelose e rugose, lembo piano o leggermente ondulato soprattutto nel margine; guaine fogliari saldate nella parte inferiore e con ciuffi di peli alla base del picciolo. Fiori rosa, peduncolati, riuniti a 2-3; calice con 5 sepali pelosi, gli interni ovali od ovali-lanceolati, gli esterni acuminati; corolla di 4-5 cm, con petali 2-3 volte più lunghi dei sepali. Capsula ricoperta da peli. Semi lisci, minuti.

**Tipo biologico.** Arbusto da m 0,30 a 2 di altezza, a portamento eretto o pulvinato. Nanofanerofita.

**Fenologia.** Fiorisce da marzo a giugno e fruttifica in giugno-luglio.

**Areale.** Il suo areale comprende il bacino del Mediterraneo, ad eccezione della Penisola Iberica, dove è probabilmente scomparso, Asia occidentale ed Africa settentrionale.

**Ecologia.** Indifferente al substrato pedologico, vive su qualsiasi tipo di terreno, dal livello del mare ad oltre i 1000 m. Si diffonde nelle zone con clima caldo-arido ed entra a far parte delle formazioni delle macchie costiere o collinari e delle garighe litoranee, dove forma cespi bassi feltrosi. In relazione ai differenti ambienti presenta una grande variabilità nella forma delle foglie, nell'abbondanza del rivestimento peloso.

**Caratteristiche e utilizzazioni.** Come *Cistus albidus* L.

### 1.1.3.1 Il Cisto nella medicina popolare sarda

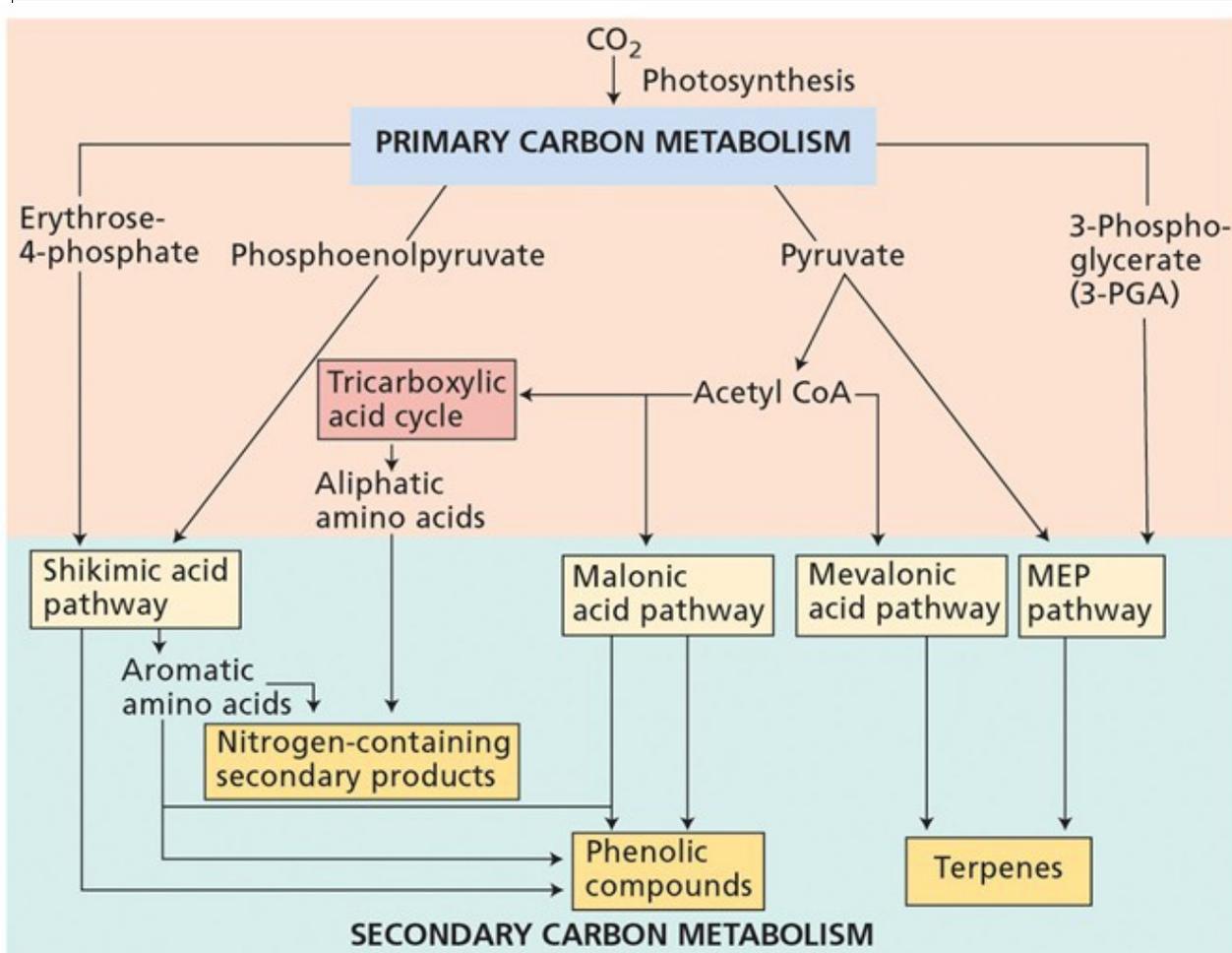
Sebbene le varie specie di Cisto abbiano, oltre alla morfologia, anche caratteristiche fitochimiche differenti, non si può fare sempre riferimento esatto alla utilizzazione delle parti delle singole specie, soprattutto per gli aspetti medicinali. Alcune notizie sono quindi necessariamente generali e si possono riferire a più specie. Le foglie seccate e macerate in infuso o decotto erano usate come astringente ed emmenagogo; spalmate sulle parti contuse erano utilizzate per lenire i dolori e contro la scabbia, le foruncolosi e come cicatrizzanti in genere. Nel Sulcis, per curare la scabbia si facevano lavaggi con la liscivia di radice di cisto rosso, cisto di Montpellier, lentisco e corbezzolo (preparata facendo bollire a lungo, in molta acqua, le ceneri setacciate delle radici suddette, insieme a un pezzo di sapone neutro), mentre per le piaghe si usava fare impacchi con l'acetolito di foglia e fiore fresco (mettendo a macerare per un anno ca. 1 Kg di foglie e fiori in 2 l di aceto). Per la cura dei foruncoli si applicava un impiastro di cassula della sottospecie *corsicus*, pestata insieme con lardo o sego e nell'orticaria con pustoline si praticavano fumigazioni di foglie di *Cistus salvifolius* e lentisco. Un uso abbastanza generalizzato era quello di applicare sulle ferite sanguinolente, come emostatico-vulnerario-cicatrizzante, la poltiglia ottenuta pestando fra due legni secchi alcune foglie fresche o anche applicando, in alternativa, una garza imbevuta del succo ottenuto pestando la foglia, o direttamente il succo. Il Cisto era usato anche come antalgico: a Barisardo si applicava la foglia cotta o macerata sulle contusioni dolorose; a Masainas e nel Sulcis in generale, per il dolore e gonfiore al ginocchio si facevano impacchi di foglie riscaldate, fasciando la parte dolorante; a Piscinas e in altri centri del Sulcis, il Cisto era usato come odontalgico facendo sciacqui del decotto della parte aerea o bevendolo; più in generale, veniva utilizzato per rendere o conservare bianchi e sani i denti. Per i geloni si applicava un ramo riscaldato alla brace; per i dolori reumatici e d'altro genere e nei disturbi al fegato si applicava una fasciatura di rami scaldati alla brace oppure un piatto riscaldato su cui erano posti i rami di Cisto.

Si riteneva efficace anche per allontanare i parassiti dalla carne macellata e, in generale, per tenere lontani gli insetti: a Ghilarza nei depositi delle fave raccolte si mettevano i rami verdi di Cisto. Nell'Arcipelago de La Maddalena, per liberare la casa da mosche, zanzare e altri insetti molesti, si usava catturarli appendendo ad una trave del soffitto rami di *Cistus monspeliensis* (che è molto vischioso) bagnati con acqua zuccherata, per poi sostituirli una volta riempiti di insetti o alla fine della giornata.

## 1.2 I metaboliti secondari delle piante

### 1.2.1 Il metabolismo vegetale

La fotosintesi, il processo attraverso il quale le piante costruiscono molecole organiche a partire da biossido di carbonio ed acqua, fornisce le molecole di base per la sintesi di molti metaboliti indispensabili per la vita stessa delle piante. Possiamo fare una distinzione fra metaboliti e vie metaboliche essenziali per la crescita e lo sviluppo (metabolismo primario) e quelli non necessari per tali fini (metabolismo secondario). Questi ultimi sono sintetizzati utilizzando come molecole di base zuccheri, amminoacidi e numerosi intermedi del metabolismo primario (Fig. 4).



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 13.4 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Figura 4: Percorsi metabolici primari e secondari nel Regno vegetale

La "dispensabilità" di queste molecole nei processi di crescita e sviluppo ha portato in passato a definirne una funzione di scarto, detossificazione, accumulo o eccesso di produzione in

vie metaboliche primarie. Oggi sappiamo che molti metaboliti secondari sono utilizzati nell'ecosistema come segnali chimici e come strumenti metabolici di difesa. I metaboliti secondari possono quindi essere considerati come molecole che sono "dispensabili" per la crescita e lo sviluppo (ad eccezione delle vie metaboliche coinvolte nella sintesi di ormoni vegetali), ma "indispensabili" per la sopravvivenza della specie (Maffei, 2015).

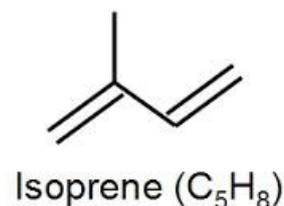
Fra le qualità più evidenti dei metaboliti secondari troviamo sicuramente la loro enorme diversità strutturale, la loro presenza ristretta a determinate famiglie o generi e l'elevata variabilità intraspecifica. Alcune piante hanno evoluto la capacità di sintetizzare ed accumulare metaboliti secondari in quantità notevoli, tramite strutture specializzate che prendono il nome di tessuti secretori. In questi tessuti i metaboliti secondari sono sintetizzati e talvolta accumulati, anche in notevole quantità.

Nel regno vegetale esiste una gran varietà di composti bioattivi con distinte strutture ed attività biologiche che possono essere distinti in quattro grandi gruppi: sostanze azotate, solforose, terpeniche e fenoliche. Queste ultime due famiglie richiedono un approfondimento, perché oggetto di studio di questo lavoro di ricerca.

### 1.2.2 I terpeni

I terpeni costituiscono uno dei gruppi più importanti di composti volatili delle piante. Fanno parte degli oli essenziali, miscele complesse di composti volatili, liquidi e solidi, che si ritrovano nelle strutture vegetali e responsabili dell'aroma caratteristico di fiori, alberi, frutti, erbe, spezie, etc. Questa classe di composti prende origine da due vie biosintetiche principali: la via dell'acido mevalonico (MVA) e la via del metileritrolo fosfato (MEP). Entrambe producono il precursore di base isopentenil pirofosfato (IPP). Questo composto a cinque atomi di carbonio, definito isoprenoide, con il suo isomero il dimetil allil pirofosfato (DMAPP), è l'unità di base con la quale sono costruite molecole via via sempre più complesse e formate da un numero di atomi di carbonio sempre multiplo di cinque.

Strutturalmente, i terpeni sono idrocarburi appartenenti alle famiglie degli alcheni, alcool, esteri, eteri, aldeidi e chetoni. Quando le molecole sono alcoli, aldeidi e chetoni aventi struttura analoga a quella dei terpeni si dà preferenza al termine terpenoide. Si utilizza anche il termine isoprenoide, poiché i terpeni sono costituiti da unità di isoprene legate insieme testa-coda. L'unione di due isopreni dà origine ai monoterpini,



composti a dieci atomi di carbonio, mentre l'aggiunta di un altro residuo isoprenico a un monoterpene origina i sesquiterpeni. La successiva condensazione di una molecola di IPP con un sesquiterpene forma i diterpeni, composti a venti atomi di carbonio, mentre la condensazione di due sesquiterpeni dà origine ai triterpeni. Si parla di politerpeni per i polimeri che contengono un numero variabile di alcune centinaia di residui isoprenici.

### Monoterpeni

Tutti i monoterpeni naturali derivano biogeneticamente da un precursore comune, il geranilpirofosfato (Fig.5); devono quindi contenere dieci atomi di carbonio e possedere uno scheletro carbonioso in accordo alla regola isoprenica. Fino ad ora sono stati isolati ed identificati oltre 500 monoterpeni che differiscono tra loro per lo scheletro carbonioso e per il grado di funzionalizzazione. Sono presenti scheletri aciclici e ciclici (mono-, bi- e tricyclici) con anelli da tre a sette termini.

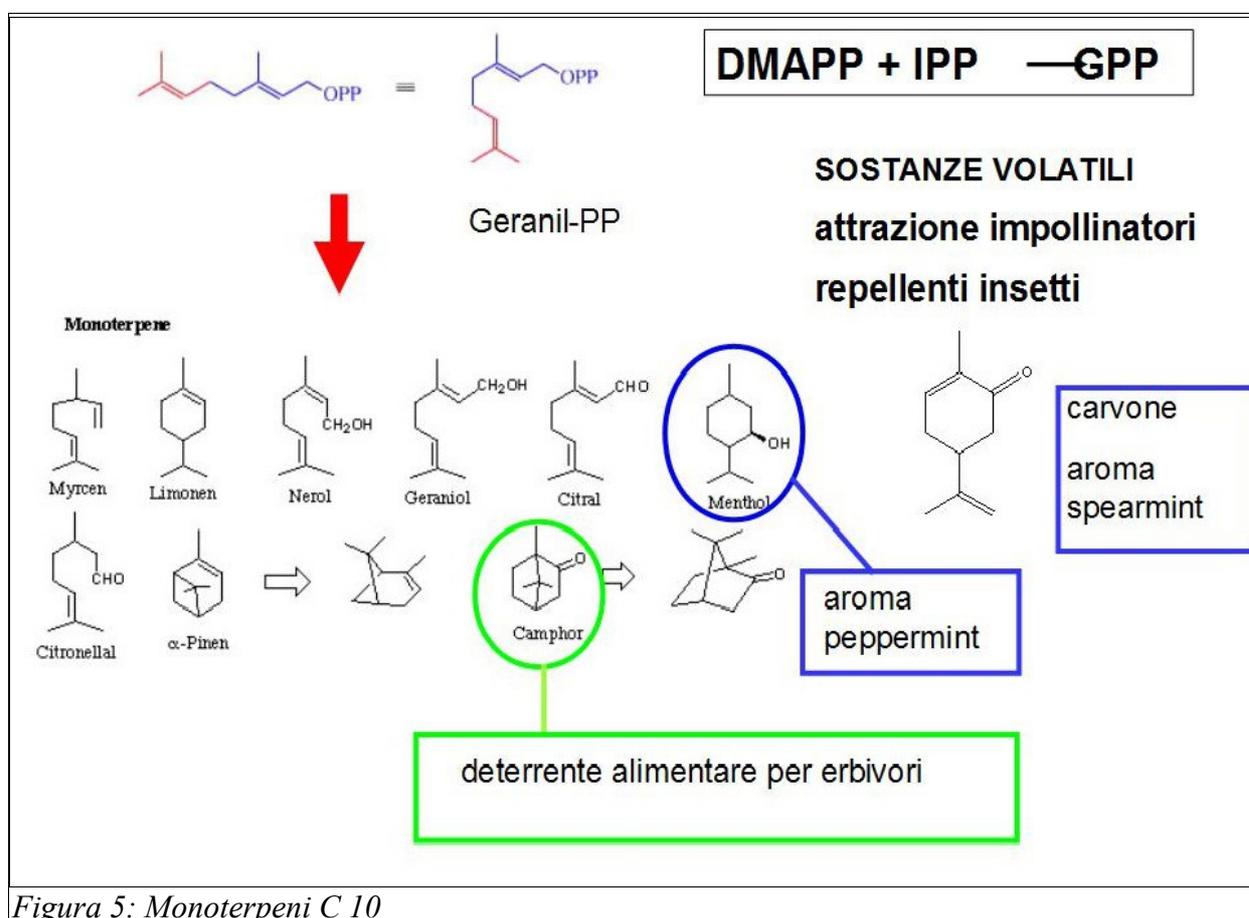


Figura 5: Monoterpeni C 10

### Sesquiterpeni

I sesquiterpeni sono metaboliti secondari di piante e funghi costituiti da uno scheletro a quindici atomi di carbonio. Il precursore di questi composti è il farnesilpirofosfato (Fig.6), che si

origina per condensazione del geranilpirofosfato e dell'isopentenilpirofosfato con meccanismo identico a quello già osservato per i monoterpeni. Caratteristica dei sesquiterpeni è il fatto che essi possono essere costituiti da scheletri molto diversi (a catena aperta, monociclici, biciclici e triciclici) che portano numerose funzioni ossigenate (alcooli, aldeidi, chetoni, acidi etc.) e legami multipli carbonio-carbonio, dando origine a composti con strutture particolarmente complesse. Il doppio legame vicino al gruppo difosfato può adottare una configurazione *cis* o *trans* (in seguito a ionizzazione).

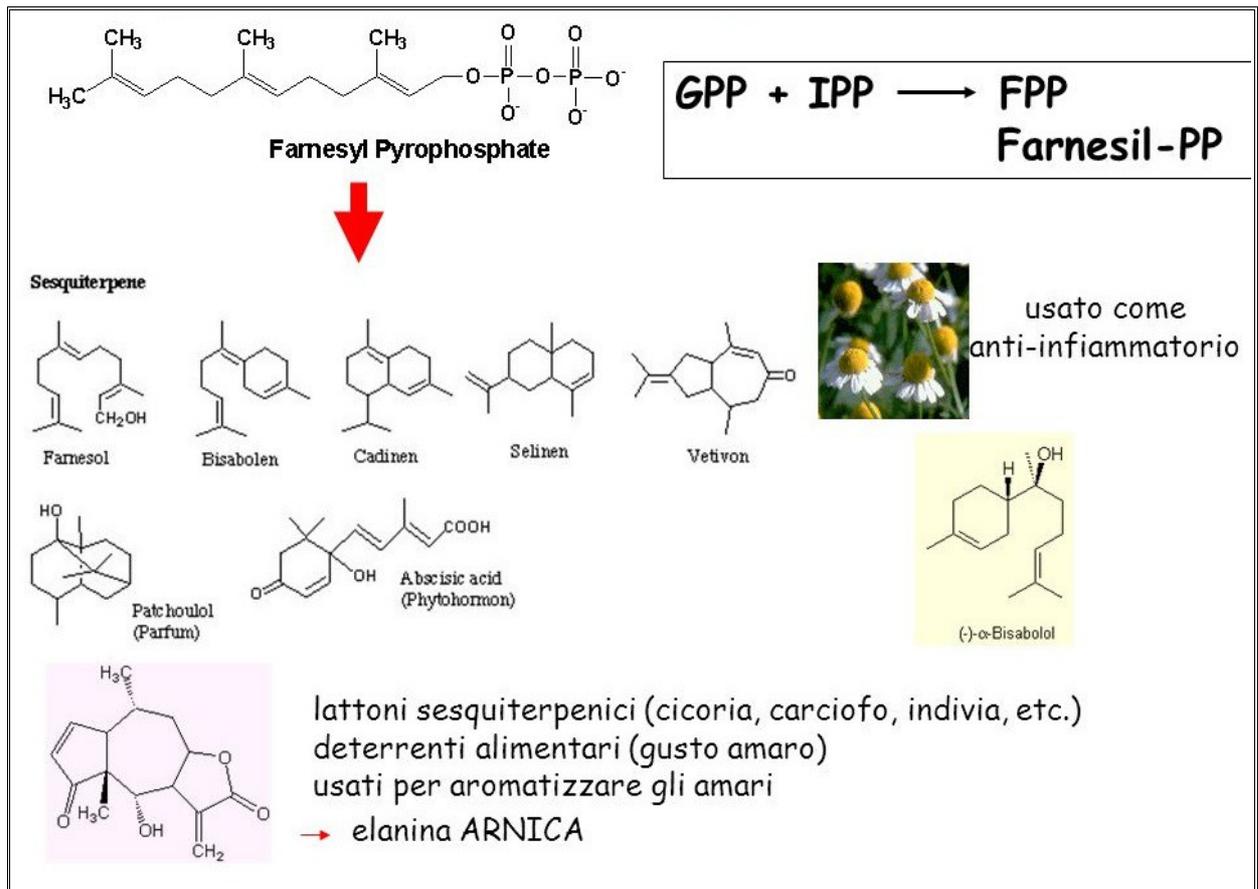


Figura 6: Diterpeni C 20

## Diterpeni

Tutti i diterpeni naturali provengono da un precursore comune: il geranilgeranilpirofosfato (GGPP), unità a venti atomi di carbonio che a sua volta viene biosintetizzato a partire da quattro unità isopreniche unite tra loro testa-coda con un meccanismo identico a quello già descritto per la sintesi del geranilpirofosfato precursore dei monoterpeni (Fig7). Per la loro struttura, è meno

comune trovarli negli oli essenziali, mentre normalmente si trovano nelle resine.

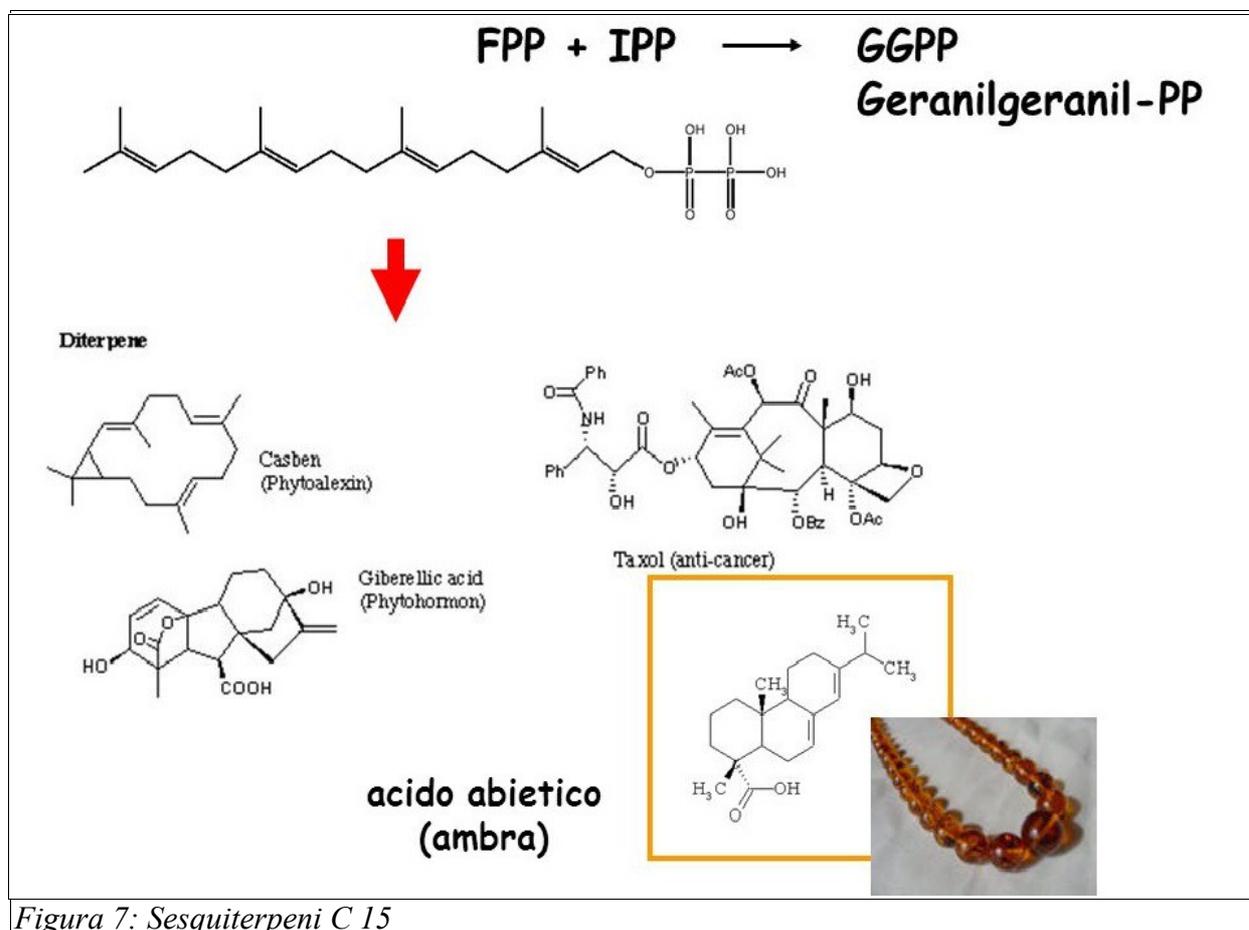


Figura 7: Sesquiterpeni C 15

### 1.2.3 Composti fenolici

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari dei vegetali, che comprende un ampio spettro di sostanze molto eterogenee, ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. La loro estesa presenza nel regno vegetale è indispensabile per la pianta perché svolge un'azione protettiva contro l'irraggiamento UV, gli attacchi di patogeni e di erbivori. L'attività antiossidante dei fenoli risiede nella capacità di essere facilmente ossidati, in condizioni blande, sia dai comuni ossidanti presenti in natura, come i radicali liberi, l'ossigeno e i perossidi, sia dalle radiazioni ultraviolette. L'attività antibatterica e antifungina dei fenoli è dovuta all'azione sinergica del

potere antiossidante e del potere chelante dei gruppi ossidrilici dell'anello fenolico che formano i legami ad idrogeno con le proteine della parete cellulare dei microrganismi.

I composti fenolici si caratterizzano per una grande diversità della loro struttura chimica, si possono ritrovare sia in forma libera (agliconi) oppure legati a composti come saccaridi e acidi organici: sono stati identificati oltre 800 agliconi e circa 4000 sono presenti sotto forma di glicosidi, esteri e altre combinazioni.

Nel regno vegetale i fenoli sono variamente distribuiti e possono essere idrosolubili, liposolubili oppure legati covalentemente a vari costituenti della parete cellulare. Gli esteri solubili hanno generalmente funzioni antiossidanti e antimicrobiche, mentre i fenoli liposolubili e quelli legati alla parete cellulare svolgono prevalentemente una funzione strutturale di *cross-linking* delle catene polisaccaridiche che la costituiscono. I composti solubili sono generalmente costituiti da gruppi fenolici funzionalizzati con zuccheri o acidi organici. Esempi di questi composti sono gli acidi idrossicinnamici del glucosio, della colina, dell'acido chinico, malonico e tartarico, gli esteri gallici dell'epicatechina e gli esteri *p*-cumarici degli antociani. I composti fenolici insolubili si originano principalmente dall'instaurarsi di legami covalenti di tipo estere tra composti fenolici, prevalentemente idrossicinnamati e loro derivati, e composti costituenti la parete cellulare.

I composti fenolici lipofili sono generalmente costituiti da idrossicinnamati legati a steroli, alcoli terpenici o triterpeni e sono comunemente associati alla membrana cellulare.

In base alla struttura dell'anello benzoico, i composti polifenolici possono essere suddivisi in tre sottogruppi:

- C6-C1 acidi fenolici, derivanti dall'acido benzoico, come ad esempio i protocatecui e l'acido gallico;
- C6-C3 acidi idrossicinnamici e fenilpropanoidi, derivanti dall'acido cinnamico come l'acido ferulico e l'acido caffeico, cumarine, isocumarine, cromoni, cromeni,
- C6-C3-C6 flavonoidi e isoflavonoidi di cui fanno parte ad esempio malvidina, quercitina e la classe degli antociani.

### **Fenoli semplici.**

Sono caratterizzati dalla presenza di un solo anello benzenico e pertanto rappresentano le strutture più semplici dei composti fenolici. Si trovano principalmente negli oli essenziali ricavati dalle piante. Un esempio è il timolo.

### **Acidi idrossibenzoici.**

Sono così chiamati per la struttura di base derivata dall'acido idrossibenzoico (Fig. 8). L'acido

gallico e l'acido vanillico sono i composti idrossibenzoici maggiormente presenti e studiati per la loro distribuzione nel mondo vegetale. L'acido gallico è, insieme all'acido ellagico il monomero base dei tannini idrolizzabili (Fig. 9).

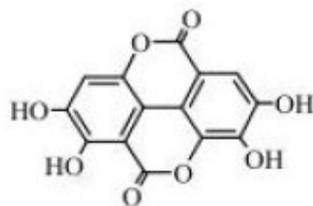


Figura 8: Struttura chimica dell'acido ellagico

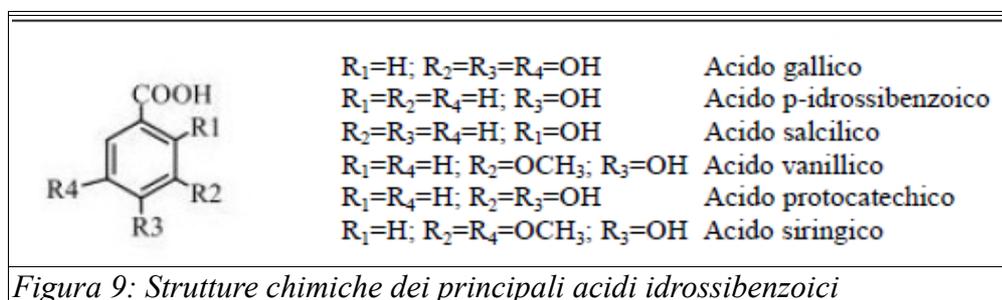
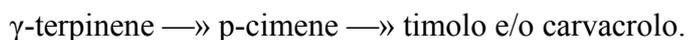


Figura 9: Strutture chimiche dei principali acidi idrossibenzoici

## Fenilpropanoidi

La classe dei fenilpropanoidi (C6-C3) rappresenta un gruppo di sostanze ampiamente diffuse nelle piante, caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con una catena alifatica laterale con tre atomi di carbonio e che derivano dagli aminoacidi fenilalanina e tirosina o da intermedi del metabolismo dell'acido scikimico. Bisogna però precisare che alcuni fenoli, come ad esempio il timolo ed il carvacrolo, non hanno origine dalle vie biosintetiche prima indicate ma provengono da un altro percorso biosintetico che trae origine dal  $\gamma$ -terpinene:



Nella struttura chimica dei fenilpropanoidi sono presenti generalmente gruppi ossigenati quali quelli idrossilici, metossilici o metilendiossilici. Tra essi possiamo citare l'acido cinnamico che si genera per eliminazione di una molecola di ammoniaca dalla catena laterale della L-fenilalanina, mentre la stessa reazione nella L-tirosina porta alla formazione dell'acido 4-cumarico.

La cinnamaldeide è il principale componente dell'olio dalla corteccia della cannella (*Cinnamomum zeylanicum*, *Lauraceae*), molto usata come aroma. Le foglie della cannella contengono una grande quantità di eugenolo che è anche il principale costituente dell'olio di chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*; *Myrtaceae*), usato per molti anni sia come anestetico dentale che come aroma. L'acetolo è il principale costituente dell'olio essenziale di anice e di finocchio (*Pimpinella anisum* e *Foeniculum vulgare*; *Umbelliferae*). La miristicina, contenuta nella noce moscata (*Myristica fragrans* *Myristicaceae*), è un altro esempio di derivato dell'allilfenolo (Fig.10).

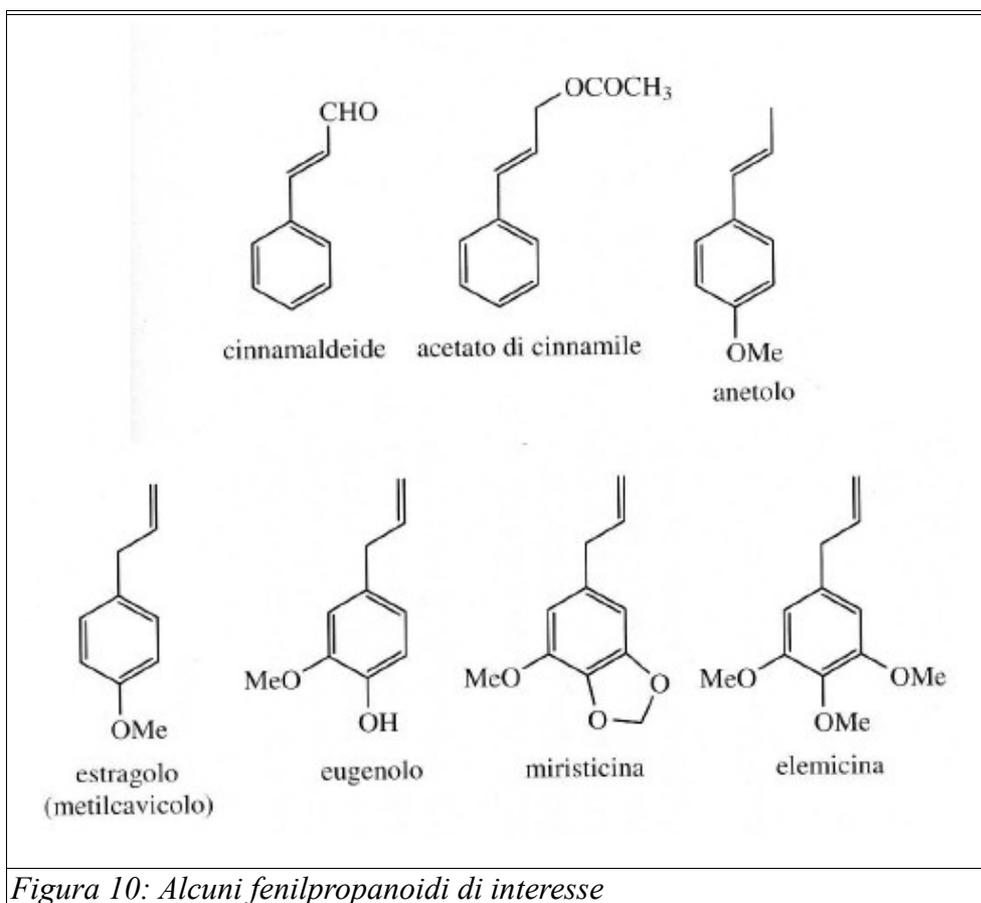


Figura 10: Alcuni fenilpropanoidi di interesse

Gli acidi idrossicinnamici sono fenilpropanoidi derivanti dall'acido p-cumarico (o p-idrossicinnamico). Sono comuni in natura quattro varianti della loro formula di base C6- C3: acido caffeico, cumarico, ferulico e sinapico (Fig. 11). Si trovano nel regno vegetale legati chimicamente ad altri composti. Ad esempio, l'acido clorogenico (Fig. 12) deriva dall'esterificazione dell'acido caffeico con l'acido chinico. Gli acidi idrossicinnamici svolgono,

nelle piante, azione antibiotica e varie funzioni connesse all'inibizione della crescita e della germinazione.

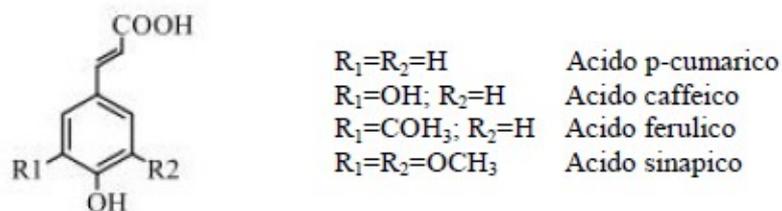


Figura 11: Strutture chimiche dei principali acidi idrossicinnamici

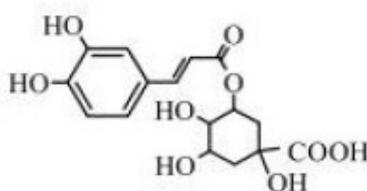


Figura 12: Struttura chimica dell'acido clorogenico.

### Flavonoidi.

Derivati del benzo- $\gamma$ -pirone, sono formati da due anelli aromatici (A e B) e da un eterociclo di collegamento (Fig. 13).

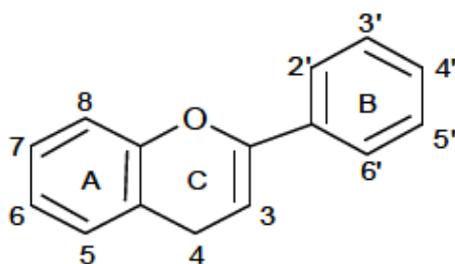
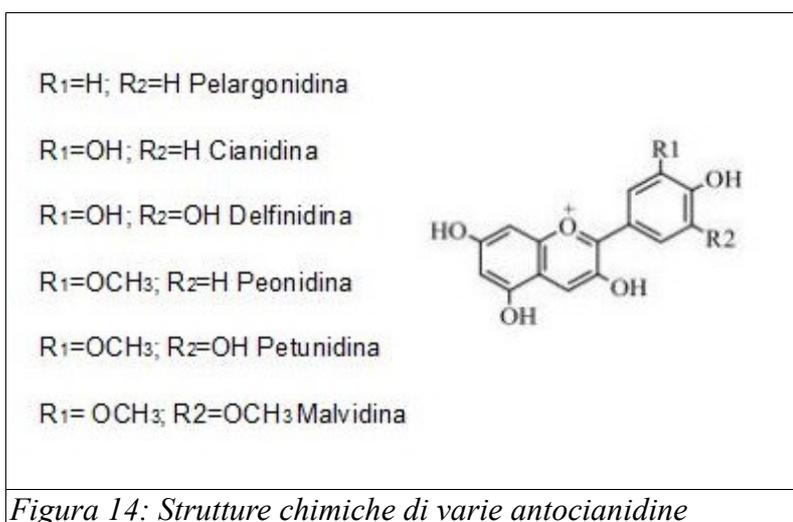


Figura 13: Scheletro base dei flavonoidi: a seconda della natura del grado di ossidazione dell'eterociclo ossigenato si distinguono le varie strutture dei composti facenti parte di questa classe.

In base al tipo di eterociclo, ai suoi sostituenti ed ai sostituenti degli anelli benzenici, i flavonoidi sono suddivisi in:

- Antocianidine
- Flavonoli
- Flavani
- Flavanoni
- Flavoni
- Isoflavoni
- Tannini idrolizzabili

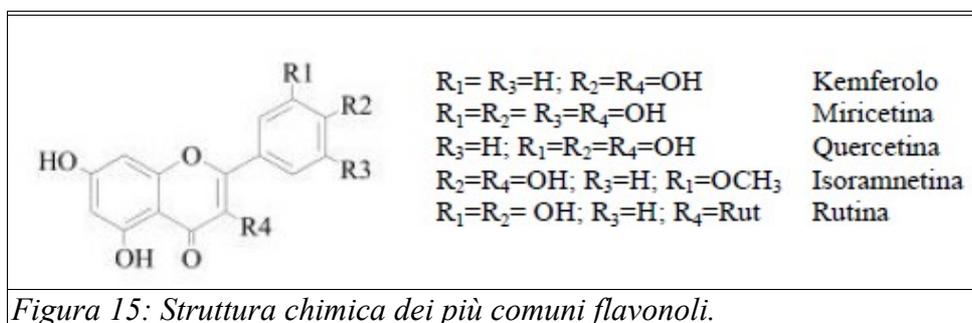
Le antocianidine sono caratterizzate da una carica positiva sull'ossigeno dell'eterociclo ossigenato e dal fatto che tutti gli atomi di carbonio sono insaturi. Sono i responsabili della pigmentazione di molti fiori e frutti che hanno la caratteristica di essere colorati in modo diverso secondo il pH del mezzo in cui si trovano. Tra le antocianidine più comuni si ricordano la cianidina, la delphinidina, la peonidina, la pelargonidina, la petunidina e la malvidina. Le loro formule di struttura si differenziano per il tipo di sostituito legato alla struttura base (Fig.14).



In natura si trovano quasi esclusivamente forme antocianiche, ovvero antocianidine legate con una o più molecole di zucchero (responsabile della loro stabilità e solubilità in acqua; Harborne, 1989). L'idrossilazione dell'anello B tende ad abbassare la stabilità della molecola, al contrario di quanto avviene con la metilazione. Lo zucchero che frequentemente esterifica con gli agliconi è il glucosio, ma si possono trovare anche ramnosio, galattosio e arabinosio. L'esterificazione

può riguardare uno, due o, raramente, tre funzioni alcoliche, generando così antociani mono-, di- o tri-glucoside. Inoltre, i glucosidi possono avere forme ancora più complesse, come quelle acilate, dove la molecola di zucchero viene, a sua volta, esterificata con un acido fenolico (es: acido *p*-cumarico).

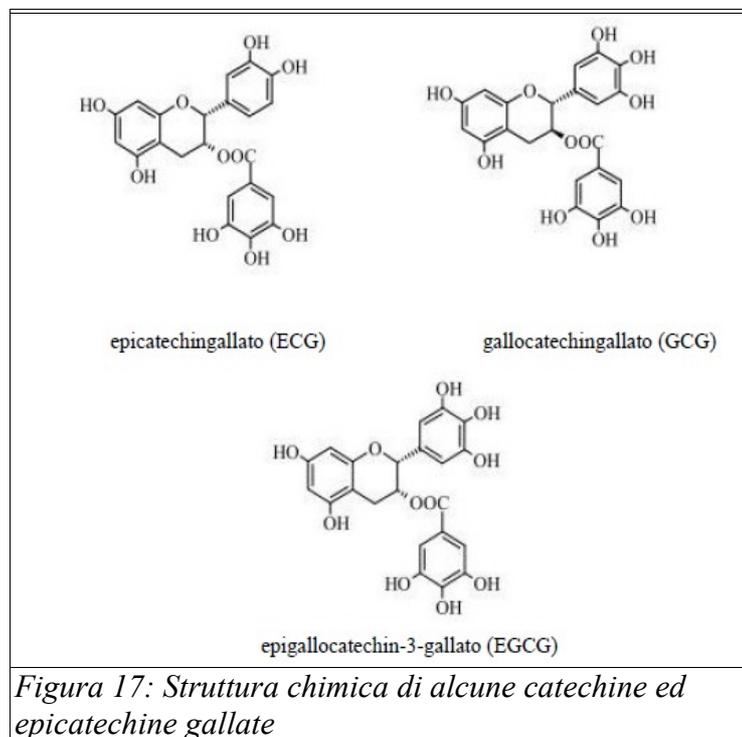
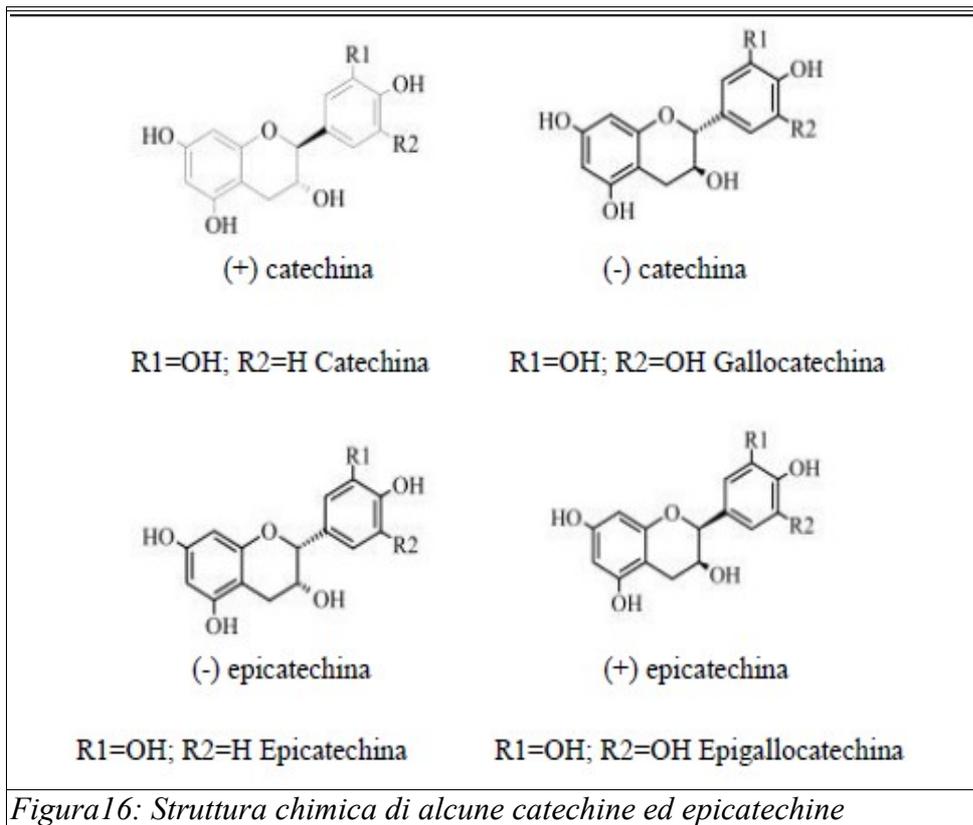
I flavonoli, conosciuti anche come antoxantine, hanno formula C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> e sono caratterizzati da un eterociclo di tipo  $\gamma$ -pirone. In molti casi sono glicosilati. Il legame glicosidico si forma sul gruppo ossidrilico in posizione 3. Le strutture monoglicosilate più diffuse sono, nell'ordine: 3-glucoside, 3-galattoside, 3-ramnoside e 3-glucoronide. Ne sono stati isolati più di 200 agliconi; tra questi, la quercetina, il kemferolo, la miricetina e l'isoramnetina sono i più diffusi. Il kamferolo e la quercetina glicosilati sono i più abbondanti in natura, seguiti da rutina, quercetina 3-rutinoside e kemferolo 3- rutinoside (Fig.15).



I flavani hanno formula C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> con l'eterociclo rappresentato dal pirano. Si distinguono in flavan-3-oli o catechine e flavan-3,4-dioli o leucoantocianidine.

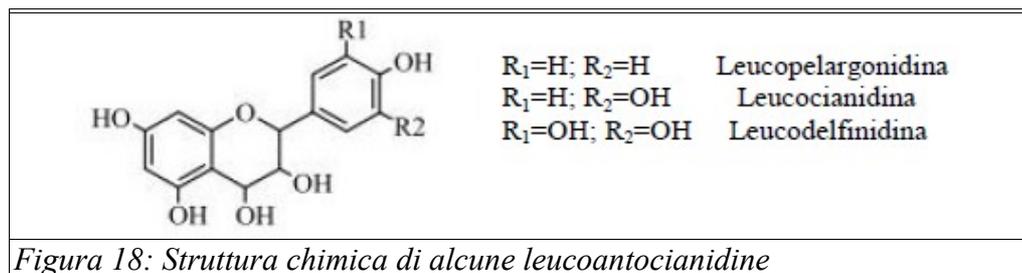
A differenza degli antociani, le catechine non sono legate a molecole glucidiche e non hanno gruppi metossili come sostituenti dell'anello B. I flavan-3-oli costituiscono il gruppo di flavonoidi più diffusi nel mondo vegetale. Poiché gli atomi di carbonio in posizione 2 e 3 sono asimmetrici, presentano 4 forme otticamente attive e 2 forme racemiche dette catechine ed epicatechine (Fig.16).

Le catechine possono combinarsi con molecole di acido gallico in posizione 3, dando origine ai catechin-gallati (Fig. 17).

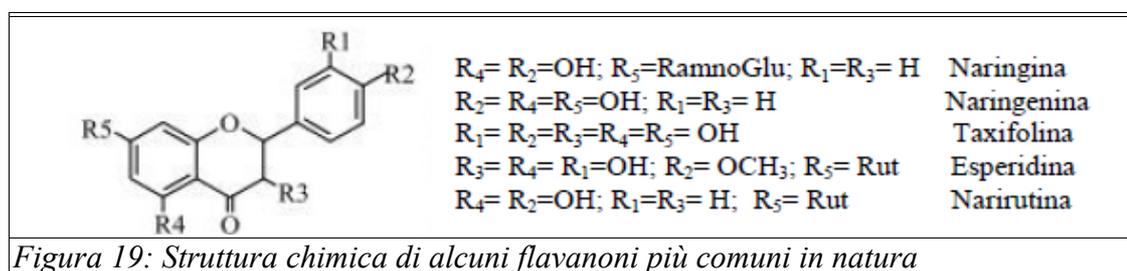


I flavandioli presentano due funzioni idrossiliche agli estremi 3 e 4 dell'eterociclo (Fig.18).

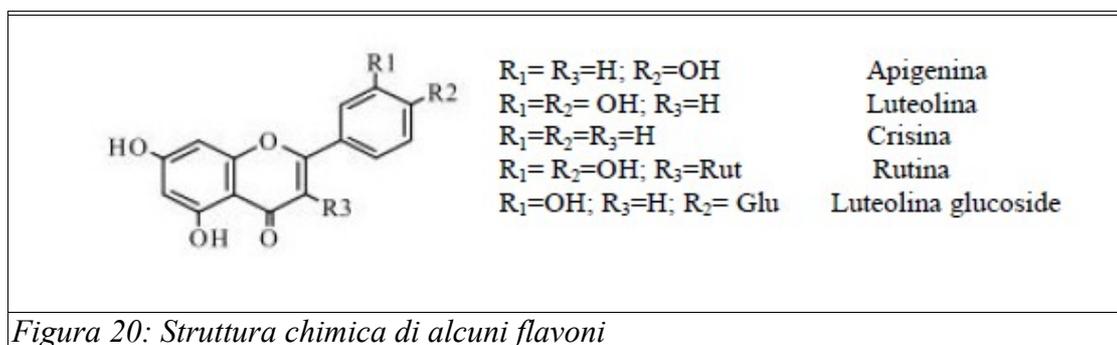
I monomeri ed i polimeri delle leucoantocianidine hanno la caratteristica, che li distingue dalle catechine, di trasformarsi in antocianidine rosse quando vengono scaldate in un mezzo acido, conseguentemente alla perdita d'acqua. La reazione non è però completa, in quanto solo il 20% delle leucoantocianidine presenti nel mezzo è soggetta a questo fenomeno; il restante 80% effettua una rapida condensazione, formando composti giallo-bruni insolubili chiamati flobafeni. Le catechine sottoposte allo stesso trattamento si trasformano totalmente in flobafeni.



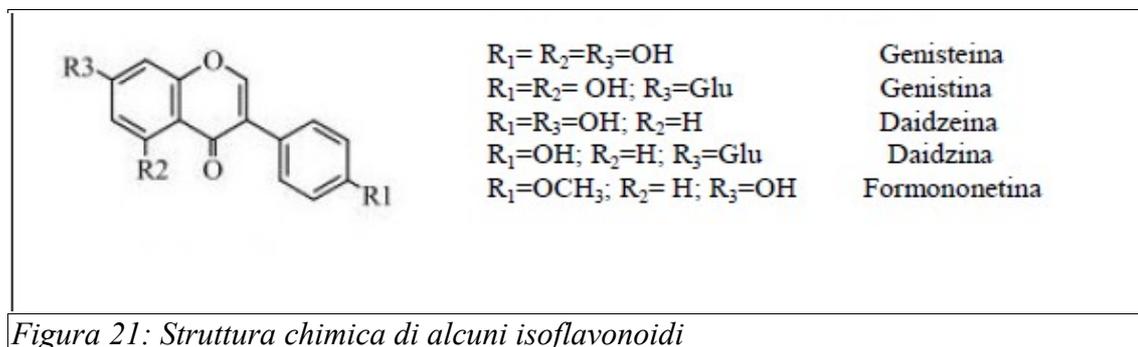
I flavanoni si ritrovano tipicamente negli agrumi, dove sono presenti sotto forma agliconica; negli altri vegetali sono molto meno comuni e prevalgono le forme glicosilate (Fig.19).



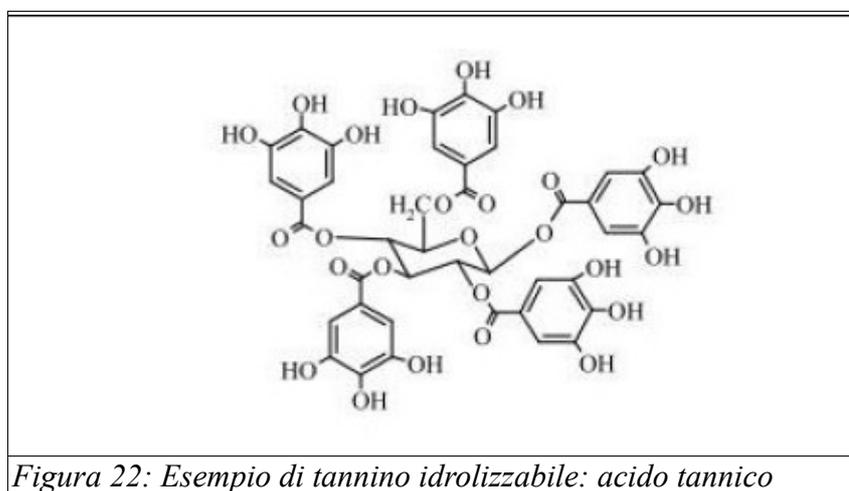
I flavoni costituiscono la classe fenolica meno rappresentata nel regno vegetale. A differenza di altri tipi di flavonoidi, possono formare dei C-glicosidi impegnando le posizioni 6 ed 8 dello scheletro base (Fig.20).



Gli isoflavonoidi sono tipici delle piante leguminose. La loro caratteristica è quella di avere legato l'anello B in posizione 3 e non in posizione 2 come gli altri flavonoidi (Fig.21).



I tannini non rappresentano una vera e propria classe di composti, ma piuttosto un gruppo di composti fenolici, variamente combinati fra loro, caratterizzati da alto peso molecolare (compreso tra 500 e 3000 Da) e da proprietà colloidali (sono colloidali negativi). Tendono a legarsi con alcaloidi, gelatine e altre proteine, dando luogo a precipitati. Si distinguono due tipologie di tannini: idrolizzabili e condensati. I tannini idrolizzabili sono poliesteri che, per idrolisi acida o alcalina, liberano acido gallico ed il suo dimero (acido diidrossifenolico), che per lattonizzazione forma l'acido ellagico (Fig.22).



Tannini condensati o proantocianidine sono oligomeri (fino a dieci unità) o polimeri derivanti dalla condensazione o polimerizzazione ossidativa dei flavan-3-oli e dei 3,4 flavan-dioli, uniti con legami covalenti. Il nome "proantocianidine" deriva dal fatto che tali sostanze, se ossidate in ambiente fortemente acido, si trasformano in antocianidine. Le proantocianidine più diffuse sono

le procianidine e le prodelfinidine (Fig.23). In generale, le proantocianidine si formano come prodotti secondari della sintesi dei flavan-3-oli nei tessuti delle piante. Durante il processo di formazione dei flavan-3-oli è necessaria la presenza di un substrato riducente come il NADPH. Per ciascun tessuto, il livello di NADPH condiziona l'equilibrio fra la sintesi dei diversi tipi di molecole. I tessuti nei quali si ritrova molto NADPH conterranno proantocianidine di tutte le dimensioni. Al contrario, dove la presenza di NADPH è limitata, si formeranno soprattutto oligomeri. Il grado di polimerizzazione dei tannini influenza la loro solubilità in mezzo acquoso: in genere sono solubili fino ad un peso molecolare di 7000 Da (circa 20 unità di flavan-3-oli per polimero).

Le procianidine sono costituite da (+)-catechina, (-)-epicatechina ed i rispettivi esteri gallici; le prodelfinidine invece hanno come unità monomeriche (+) - gallo catechina, (-)-epigallocatechina ed i rispettivi esteri gallici. Le procianidine dimere sono i tannini condensati più diffusi in natura; vengono chiamate B1, B2, B3 e B4 quelle caratterizzate da un legame C4-C8; B5, B6, B7, B8 e B9 quelle caratterizzate da un legame C4-C6, che comunque sono meno diffuse. Esistono, inoltre, delle formule trimere di procianidine, identificate come procianidine C. Le prodelfinidine, contenendo unità monomeriche triidrossilate (gallo catechina, epigallocatechina e derivati gallici), risultano più polari e quindi posseggono un grado di solubilità in acqua maggiore

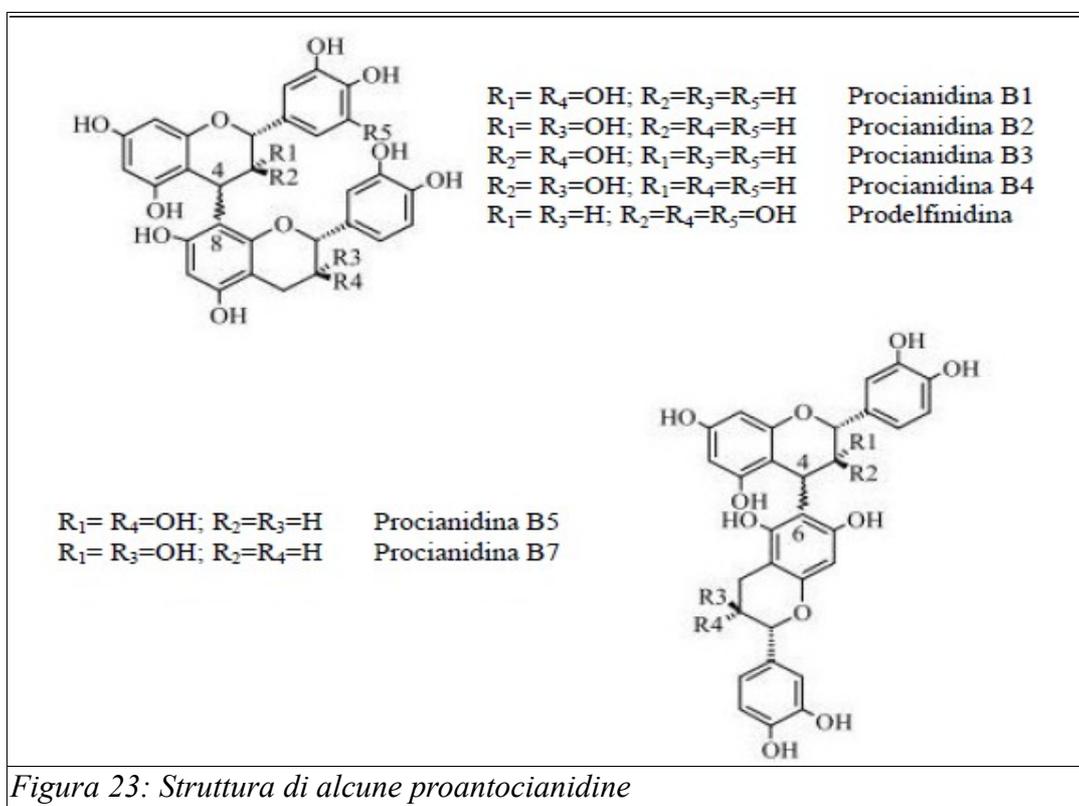


Figura 23: Struttura di alcune proantocianidine

# CAPITOLO II

## L'attività di ricerca

### 2.1 L'organizzazione del lavoro sperimentale

L'attività di ricerca svolta nel corso del dottorato ha riguardato diverse attività e si è articolata in più fasi:

- Ricerca sul genere *Cistus* della Sardegna e raccolta del materiale vegetale.
- Ottenimento degli estratti.
- Caratterizzazione chimica.
- Valutazione dell'attività biologica ed antiossidante degli estratti.
- Analisi dei risultati.

#### **Fase 1. Indagine bibliografica e raccolta del materiale vegetale**

Questa è stata la fase iniziale, necessaria allo svolgimento dell'intera attività di ricerca. Inizialmente si è partiti con un'indagine su dati di etnobotanica esistenti, completata da una parallela indagine bibliografica, per conoscere sia la distribuzione geografica, che gli studi condotti sulle varie specie di Cisto presenti nel bacino del Mediterraneo, per poterle comparare con le specie sarde, sia dal punto di vista della composizione chimica che dell'attività biologica. L'attività è proseguita con la raccolta e la determinazione sistematica delle specie di Cisto, al fine di disporre di una sufficiente quantità di biomassa che è stata successivamente utilizzata nella fase di estrazione. Se nel primo anno di ricerca si è proceduto ad uno screening di tutt'e quattro le specie presenti nell'Isola (con le relative sottospecie), successivamente si è circoscritto lo studio al *Cistus creticus* con le sue tre sottospecie. Infine, in funzione dei risultati ottenuti, la ricerca si è focalizzata solo sul *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet, raccolto in sette diverse stazioni sparse in tutta la Sardegna.

#### **Fase 2. Estrazione dei principi attivi**

Gli estratti ottenuti e studiati ricadono nelle tipologie degli estratti volatili/oli essenziali e dei composti fenolici. Sono state utilizzate tecnologie tradizionali come l'idrodistillazione per ottenere gli oli essenziali e l'estrazione con solventi (con o senza estrattore Soxhlet) per gli estratti più pesanti. Per i composti più volatili si è utilizzata la microestrazione in fase solida (SPME). Gli estratti ottenuti sono poi stati utilizzati nelle fasi di caratterizzazione della

composizione chimica e dell'attività biologica.

### **Fase 3. Caratterizzazione chimica degli estratti**

La caratterizzazione della composizione chimica degli estratti ottenuti è stata realizzata attraverso l'impiego di tecniche gas-cromatografiche (GC/FID e GC/MS) e cromatografia in fase liquida (HPLC/MS).

### **Fase 4. Valutazione e caratterizzazione dell'attività biologica**

Gli estratti ottenuti, sono stati anche oggetto di valutazione dell'attività biologica, sia antibatterica e antifungina, che antiossidante.

### **Fase 5. Analisi dei risultati**

I risultati ottenuti sulle singole matrici vegetali a partire dalla fase di estrazione e per le fasi successive, sono stati continuamente oggetto di analisi ed utilizzati anche come feedback allo scopo di migliorare l'attività di ricerca.

Al termine dell'attività sperimentale e di trattamento dati, i risultati ottenuti ritenuti scientificamente interessanti sono stati utilizzati per la stesura di articoli pubblicati o in via di pubblicazione su riviste scientifiche internazionali di settore.

## **2.2 Studio bibliografico sul genere *Cistus***

Nella medicina tradizionale del Mediterraneo, tutte le diverse specie di *Cistus* sono usate frequentemente, sotto forma di infusi, nel trattamento di diverse patologie dermatologiche, dei reumatismi, della febbre e della diarrea (Attaguille et al., 1995; Bouamama et al., 2006).

L'antico uso etnobotanico di varie specie di *Cistus* dimostra che queste piante sono un ottimo rimedio per diverse infezioni microbiche (Bassolé and Juliani, 2012; De Andres et al., 1999; Üstün et al., 2006; Kupeli and Yesilada, 2007). L'attività antimicrobica è stata dimostrata per l'olio essenziale di *C. salvifolius* (Gertsch, 2011; Güvenç et al., 2005) e per l'estratto ottenuto con solventi organici da *C. creticus* (Güvenç et al., 2005) e da *C. ladanifer* (Ferreira et al., 2012). Anche l'estratto acquoso ottenuto da *C. ladanifer* e *C. populifolius*, e che contiene ellagitannini e flavonoidi, possiede una significativa attività antimicrobica sia verso i batteri Gram-positivi che quelli Gram-negativi (Barrajon-Catalan et al., 2010). Alcuni studi condotti su diverse specie di *Cistus* hanno messo in luce l'attività antibatterica e antifungina del *Cistus salvifolius* e del *Cistus monspeliensis della Tunisia* (Mahmoudi et al. 2016; Rebaya et al., 2016). Bouamama et al. (2006) hanno dimostrato l'attività antimicrobica e antifungina per gli estratti di foglie di *Cistus creticus* L. subsp. *eriocephalus* e *Cistus monspeliensis*; mentre in *C. laurifolius* sono stati riscontrati effetti antiulcerogenici (Yesilada et al., 1997; Üstün et al., 2006), analgesici (Ark et

al., 2004), antiossidanti ed epatoprotettivi (Küpeli et al., 2007) e antidiabetogeni (Orhan et al., 2013).

Alcuni studi hanno suggerito l'idea che i principali componenti degli estratti dalle piante del genere *Cistus* siano i composti polifenolici, in modo particolare i flavonoidi monomerici appartenenti al gruppo dei flavan-3-oli o alla famiglia delle catechine come catechina, gallo catechina, gallo catechina-3-gallato insieme con le procianidine oligomeriche B2 e B3 (Petereit et al., 1991; Danne et al., 1994). Altri studi fitochimici eseguiti sulle foglie di *Cistus* hanno messo in evidenza la presenza di cinque diversi flavonoidi sia in forma di agliconi che glicosilati appartenenti alla famiglia dei flavonoli (Demetzos et al., 1989). Inoltre, nelle specie del genere *Cistus* sono stati trovati anche proantocianidine e diidroflavonoli geneticamente correlati (Petereit et al. 1992), così come acido shikimico, epicatechin-(4→6)-catechina, prodelfinidina dimerica (Danne et al., 1993), e ulteriori polifenoli (Danne et al., 1994; Saracini et al., 2005). Chinou et al. (1994) e Santagati et al. (2008) hanno riferito l'esistenza, in diverse parti della pianta di *Cistus incanus*, di flavanoli monomerici e polimerici, acido gallico, rutina e diterpeni. E' noto da diverso tempo che i polifenoli abbiano effetti positivi sulla salute umana (Chaves et al. 1997; Ramalho et al., 1999; Saracini et al., 2005; Santagati et al., 2008; Barrajon-Catalan et al., 2011; Skorić et al., 2012); così come è stata dimostrata l'attività antiossidante di diversi flavonoidi polidrossilati (Chen et al. 1990; Robak et al., 1988; Sichel et al., 1991) e la loro attività antitumorale, antimicrobica, antivirale e di inibizione enzimatica (Pathak et al., 1991). In alcuni studi è stata descritta la loro capacità di inibire le lipoproteine a bassa densità (LDL) (de Whalley et al., 1990) e la possibile attività protettiva nei confronti delle cardiopatie coronariche e l'ictus (Hertog et al., 1993; Hertog et al., 1995). Diversi studi svolti su differenti specie di *Cistus* hanno dimostrato azione gastroprotettiva per *Cistus creticus* L. subsp. *eriocephalus* (Attaguile et al., 1995) e *Cistus laurifolius* (Yesilada et al., 1997), attività anti-infiammatoria per *Cistus creticus* L. subsp. *eriocephalus* (Petereit et al., 1989; Demetzos et al., 2001), effetti protettivi sulla rottura del DNA e la capacità, dose-dipendente, di scavenging di radicali liberi per *Cistus creticus* L. subsp. *eriocephalus* e *Cistus monspeliensis* (Attaguile et al., 2000), e inoltre, attività citotossica nei confronti di linee cellulari leucemiche umane in vitro per *Cistus creticus* L. subsp. *creticus* (Dimas et al., 1998) e *Cistus monspeliensis* (Dimas et al., 2000).

Attualmente l'olio essenziale di *Cistus* è stato approvato dal Food & Drugs Administration (FDA) come additivo alimentare e come aromatizzante (European Commission, DG Health and Consumer Protection; European Pharmacopoeia 6.0, 2008). Può essere usato come integratore alimentare nella dieta o sotto forma di infuso delle foglie di *Cistus incanus*

("Cistus tea") come antiossidante per la prevenzione di malattie croniche (Riehle et al., 2013) e malattie neurovegetative progressive come l'Alzheimer (Loizzo et al., 2013). Inoltre, l'uso del "Cistus tea" come collutorio antibatterico contribuisce alla prevenzione delle patologie del cavo orale indotte dal biofilm, diminuendo il livello di batteri (Hanning et al., 2009) e riducendo l'iniziale adesione batterica (Hanning et al., 2008).

Nonostante si conosca l'uso etnobotanico delle diverse specie di Cisto presenti in Sardegna (Angioni, 1989; Bruni A., et al., 1997; Ballero M., et al., 2001; Atzei, 2003; Atzei et al., 2004), esistono pochi studi circa la natura dei principi attivi ed in particolare del contenuto fenolico degli estratti di queste piante. Precedentemente è stato pubblicato solo uno studio (Paolini et al., 2009) sulla composizione chimica del *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto nel Nord Sardegna. Ligios et al. nel 2004 hanno studiato una possibile relazione tra il Cisto ed alcuni disordini neurologici riscontrati in ovini alimentati con questa pianta, presente in grande quantità nei pascoli della Sardegna. La resistenza delle piante di Cisto a varie condizioni avverse di crescita, ha suggerito il suo potenziale utilizzo nella phytoremediation, in particolare nei terreni contaminati delle aree minerarie del Sulcis-Inglesiente (Jiménez et al., 2011).

### **2.3 Raccolta del materiale vegetale**

I campioni utilizzati per la ricerca sono stati raccolti in Sardegna in differenti zone, durante i mesi di maggio e giugno mentre le piante si trovavano in fase di fioritura.. La biomassa è stata raccolta in modo random cercando di rispettare l'esposizione ai 4 punti cardinali e raccogliendo sia foglie basali e apicali che cime fiorite. Dopo la raccolta, durante il trasporto, i campioni sono stati conservati in un contenitore fresco prestando attenzione a non comprimerli, in modo da evitare la perdita d'essenza e dei prodotti più volatili in particolare. In laboratorio il materiale vegetale è stato pulito dai materiali estranei eventualmente presenti e sono state eliminate le parti legnose, cercando di rendere i campioni uniformi per quanto possibile.

Nel primo anno di ricerca (2014), le parti aeree di *C. salvifolius* e *C. albidus*, sono state raccolte da piante cresciute sul Monte Ortobene a Nuoro (Latitudine 40°19'19.8"N Longitudine 9°22'16.6"E, molto vicino al Parco sulla cima del Monte), mentre la biomassa di *C. monspeliensis* è stata raccolta sul Monte Albo, Oliena (Latitudine 40°30'7"N Longitudine 9°35'24"E, ai piedi del Monte).

*C. creticus* subsp. *creticus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* sono stati raccolti a Calagonone (Nuoro) nella parte Centro-Orientale della Sardegna (Latitudine 40°16'50"N Longitudine

9°37'47"E, lungo la strada che conduce al centro abitato), mentre il materiale vegetale di *C. creticus* subsp. *corsicus* è stato raccolto in una stazione della Sardegna Nord-Occidentale nei pressi del Lago di Baratz in provincia di Sassari (Latitudine 40°40'51.24"N Longitudine 8°13'32.88"E).

Per quel che riguarda *C. creticus* subsp. *corsicus*, bisogna ricordare che la stazione del Lago di Baratz è l'unica in Sardegna dove è possibile reperire questa sottospecie. Se si aggiunge il fatto che il cisteto è costituito da piccoli e radi arbusti, si comprende la necessità di raccogliere i campioni con attenzione per evitare di danneggiare il sito. Stesso problema riguarda *C. creticus* subsp. *creticus* che è presente unicamente nella stazione di Calagonone, relativamente ampia e con le piante che vegetano molto adiacenti al bordo della strada.

Nel 2015, sono stati raccolti campioni di materiale vegetale della specie *C. creticus*: le sottospecie *C. creticus* subsp. *creticus* e *C. creticus* subsp. *corsicus*, come l'anno precedente, sono state raccolte nelle stazioni di Calagonone e del Lago di Baratz, rispettivamente. *C. creticus* subsp. *eriocephalus* è stato raccolto nella Sardegna Nord-Occidentale, nelle campagne vicino a Bonnanaro (Sassari) (Latitudine 40°31'52.0"N Longitudine 8°46'32.1"E).

Infine, nel 2016 la ricerca si è focalizzata esclusivamente sulla sottospecie *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. Per questo sono state individuate sette stazioni di raccolta sparse su tutto il territorio isolano (Fig. 24):

**1) Calagonone costa Centro-Est (NU)**

(Latitudine 40°16'50"N Longitudine 9°37'47"E)

**2) Monte Nieddu Padru-Sorgente Sos Pantamos (OT)**

Nord-Est

(Latitudine 40°45'18,3"N Longitudine 9°32'1,4"E)

**3) Costa Paradiso costa Nord (SS)**

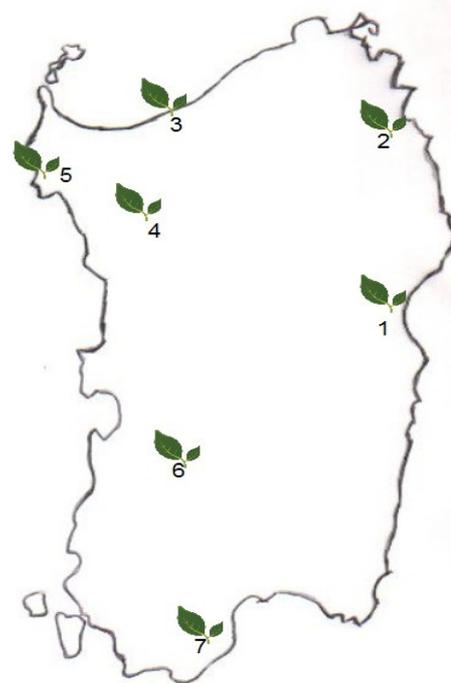
(Latitudine 41°3'30,6"N Longitudine 8°57'5,8"E)

**4) Bonnanaro nella Sardegna Nord-Ovest (SS)**

(Latitudine 40°31'52"N Longitudine 8°46'32"E).

**5) Monte Doglia-Porto Conte, Alghero (SS) costa Nord Ovest**

(Latitudine 40°36'54"N Longitudine 8°14'9,5"E)



*Figura 24: Mappa del campionamento*

## 6) Monte Arci (OR) Centro-Ovest

(Latitudine 39°46'24,9"N Longitudine 8°44'28,7"E)

## 7) Pixinamanna, Pula (CA) Sud

(Latitudine 38°58'5,8"N Longitudine 8°55'7,2"E)

Tutte le specie sono state identificate dal Prof. A.D. Atzei e un campione certificato di ciascuna specie e relative sottospecie, è stato depositato presso l'Herbarium SASSA del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università di Sassari (numero collettivo: *C. creticus* subsp *eriocephalus* n°132; *C. albidus* n°133; *C. creticus* subsp. *corsicus* n°134; *C. salvifolius* n°134 bis, *C. monspeliensis* n°135; *C. creticus* subsp. *creticus* n°135 bis).

## 2.4 Estrazione dei principi attivi

### 2.4.1 Estrazione degli oli essenziali

L'estrazione degli oli essenziali è stata eseguita su tutti i campioni di Cisto raccolti nei tre anni di ricerca.

L'estrazione, è stata eseguita utilizzando un'apparecchiatura tipo Clavenger ed un pallone da due litri in cui sono stati introdotti un litro d'acqua e il materiale vegetale in studio (Fig.25). Il processo di idrodistillazione è durato quattro ore. Nel contenitore graduato di raccolta degli oli, non è stato posto nessun solvente in modo da poter ottenere il prodotto puro. La resa in olio essenziale è stata calcolata in mg di olio per 100g di massa vegetale (Tabelle 1-2).

Gli oli sono stati conservati in vials sigillati, a -20°C, pronti per le analisi chimiche.



Figura 25: Apparecchiatura tipo Clavenger

	<i>C. monspeliensis</i>	<i>C. salvifolius</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> L.
Fresh plant (2014)	0,38	1,36	6,59	23,66	34,62	162
Dry plant	1,42	5,92	26,38	94,6	133,15	648
Fresh plant (2015)				11		34
Dry plant				81,94		169,6
Robles et al. 2000	21					
Anghelopulou et al. 2002	450					
Loizzo et al. 2013	70	70			120	90
Robles et al. 1998			130			
Maggi et al. 2016					30	
Demetzos et al. 2002						1600
Paolini et al. 2009				300		

Tabella 1: Rese (mg/100g) oli essenziali delle specie di cisto raccolte nel 2014 e nel 2015 confrontate con i dati di letteratura. Da notare l'assenza di olio essenziale in *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto nel 2015 nella stazione di Bonnanaro, dato in accordo con i dati di Paolini et al, 2009.

	<b>Pixinamann a</b>	<b>Monte Doglia</b>	<b>Cala Gonone</b>	<b>Costa Paradiso</b>	<b>Sos Pantamos</b>	<b>Monte Arci</b>
Fresh plant (2016)	5.06	37.60	12.00	0.50	1.28	128.70
Dry plant	25.32	188.40	64.00	2.85	6.38	643.90

Tabella 2: Rese (mg/100g) oli essenziali di *C. creticus* susp. *eriocephalus* raccolto nel 2016 in diverse stazioni sparse nel territorio sardo

#### 2.4.2 Estrazione dei composti volatili

La caratterizzazione della frazione volatile è stata eseguita sui campioni di *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *eriocephalus* e *C. creticus* subsp. *corsicus* raccolti nella primavera del 2015, presso il laboratorio CPN dell' Università de Corse "Pasquale Paoli". E' stata utilizzata la microestrazione in fase solida (SPME – Solid Phase MicroExtraction), tecnica che, a differenza di tutte le altre tecniche estrattive, non necessita di

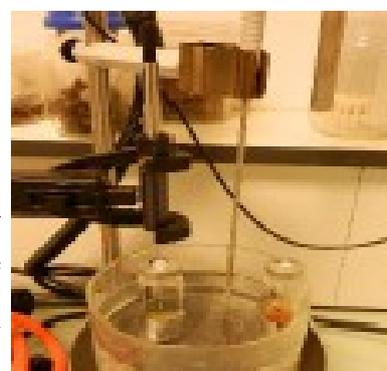


Figura 26: SPME – Solid Phase MicroExtraction

solventi e può essere impiegata nell'analisi delle matrici più diverse senza variazioni nella procedura d'esecuzione. Inoltre, la strumentazione è di facile utilizzo, completamente automatizzabile e comporta costi analitici molto bassi. Attraverso la microestrazione in fase solida vengono effettuate contemporaneamente tre diverse fasi analitiche, l'estrazione dalla matrice in esame e relativa preconcentrazione ed il desorbimento e, per questo motivo, possono essere raggiunti limiti di rilevabilità estremamente bassi, fino ad arrivare a valori di ppt (ng/L), con un'ottima linearità e una precisione confrontabile con altre tecniche analitiche. La SPME è di solito accoppiata con la gascromatografia (come nel nostro caso) ma può essere utilizzata anche con la cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC).

Per la preparazione dei campioni sono stati introdotti 4g di massa vegetale in un contenitore cilindrico di 10 mL, chiuso ermeticamente e posto a bagnomaria a 90°C per 90 min per liberare i composti volatili nello spazio di testa. A questo punto è stata inserita la siringa, preventivamente condizionata per 5-10 min, e lasciata in estrazione per 30 min a 90°C, pronta per essere iniettata in GC (Fig.26).

#### Condizioni operative

Modalità di estrazione	Spazio di testa
Natura della fibra	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm, 2 cm)
Volume e quantità del campione (in un volume di 10 mL)	4g
Tempo di equilibrio (mn)	90 min
Temperatura di equilibrio (°C)	90 °C
Tempo di estrazione (mn)	30 min
Temperatura di estrazione (°C)	90 °C
Condizioni di desorbimento	250 °C per 5 min

### **2.4.3 Estrazione della frazione polifenolica**

#### **2.4.3.1 Estrazione dei campioni raccolti nel 2014**

La separazione della componente fenolica della pianta è stata ottenuta tramite estrazione a freddo con metanolo acidificato con HCl (37%) allo 0,1%.

100g di biomassa fresca, grossolanamente sminuzzata, è stata sottoposta a macerazione con 300 mL di CH<sub>3</sub>OH acidificato all'0,1%, a temperatura ambiente. Poiché il solvente si satura molto velocemente, è stato aggiunto in piccole porzioni così da ottenere la massima resa estrattiva. Il tutto è stato posto in una piastra magnetica a freddo e fissato sotto cappa a 400 rpm (miscelazione continua), *overnight*, e infine filtrato (Fig. 27). Il processo è stato ripetuto altre due volte nelle stesse condizioni



Figura 27: Macerazione a freddo con metanolo acidificato



Figura 28: Ripartizione con solventi a diversa polarità

operative. Al termine, i filtrati riuniti sono stati portati a secco in Rotavapor per allontanare il solvente.

Al fine di semplificarne la composizione gli estratti grezzi sono stati sottoposti a ripartizione, utilizzando solventi a differente polarità (Fig.28).

Sono stati quindi disciolti in 250 mL di H<sub>2</sub>O e 250 mL (x 3) di Acetato di Etile. In questo modo abbiamo ottenuto due frazioni una solubile in acqua ed una in acetato di etile. La frazione disciolta in acqua è stata sottoposta ad una ulteriore estrazione usando 250 mL di n-BuOH (x 3). Le frazioni sono state portate a secchezza tramite evaporatore.

In questo modo abbiamo ottenuto 3 frazioni. In Tabella 3 sono riportate in grammi sia la quantità di estratto grezzo ottenuto, sia la resa, sempre in grammi delle tre frazioni .

	<i>C. monspeliensis</i>	<i>C. salvifolius</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> L.
Raw extract	25,87	21,17	15,21	21,14	25,32	25,93
H <sub>2</sub> O	9,52	7,22	7,41	8,93	9,63	11,99
n-BuOH	3,94	4,01	2,43	2,14	1	2,75
Ac-Et	2,69	2,42	1,9	1,77	2,32	2,26
Precipitato						

Tabella 3: Rese in g/100 degli estratti grezzi e delle ripartizioni in acqua, acetato di etile e n-butanolo delle specie di *Cistus* prese in esame

I campioni sono stati ridisciolti in MeOH (4 mL) per le frazioni ottenute in acetato di etile e *n*-butanolo, e in H<sub>2</sub>O (7 mL) la frazione acquosa e utilizzati per l'analisi HPLC/MS filtrando i campioni con filtro da 0,45µ.

### 2.4.3.2 Estrazione dei campioni raccolti nel 2015

I campioni di *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *eriocephalus* e *C. creticus* subsp. *corsicus* raccolti nella primavera del 2015, sono stati estratti sia con la tecnica della macerazione a

freddo sia utilizzando un'apparecchiatura Soxhlet.



Figura 30: Apparecchiatura Soxhlet

#### Macerazione a freddo

30 g di materiale vegetale finemente sminuzzato di ogni campione è stato sottoposto a macerazione a freddo con metanolo (250mL) e messo in agitatore per 24h (Fig. 29). Infine, dopo filtrazione, i campioni sono stati portati a secco in Rotavapor.

Figura 29: Macerazione a



#### Estrazione in Soxhlet

L'estrazione è stata eseguita utilizzando un'apparecchiatura Soxhlet (Fig.30). Il campione inserito nel filtro a ditale è stato estratto con

esano, successivamente con acetato di etile ed infine con metanolo. Gli estratti recuperati sono stati portati a secco in Rotavapor.

Nella Tabella 4 sono riportate le rese delle diverse estrazioni.

	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> L.
Me-OH a freddo	18,3	20,7	14,7
	Estrazioni in Soxhlet		
Esano	23,6	24,5	24
Ac-Et	23,18	26,3	28,4
Me-OH	24,6	28,18	29,5

Tabella 4: Rese in g/100 dell'estrazione in Me-OH a freddo e dell'estrazione in Soxhlet delle specie di *Cistus* prese in esame

## **2.5 Caratterizzazione chimica degli estratti**

### **2.5.1 Caratterizzazione degli oli essenziali**

#### **2.5.1.1 Analisi gas cromatografica degli oli essenziali Cistus 2014**

Per l'identificazione e quantificazione dei costituenti l'olio essenziale dei vari campioni di *Cistus* è stato utilizzato un Gas Cromatografo Hewlett Packard Modello 5890A dotato di un detector a ionizzazione di fiamma (FID), interfacciato con una *work station* fornita di un programma di gestione per gascromatografia con autocampionatore HP 7673 impostato in modo da iniettare ogni volta 0,2 µL d'olio essenziale e iniettore split/splitless. La separazione è stata realizzata con una colonna capillare AT-5 di gel di silice fusa lunga 60m con diametro interno 0,25 µm (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, US).

#### Condizioni operative

detector ed iniettore alla stessa temperatura di 280°C;

temperatura iniziale del forno 50°C con un incremento termico di 3°C min<sup>-1</sup> sino a raggiungere i 135 °C, in queste condizioni per 1 minuto, segue un incremento termico di 5°C min<sup>-1</sup> sino a raggiungere la temperatura di 225°C e si rimane in queste condizioni per 5 minuti, sempre con lo stesso incremento termico si raggiungono i 260 °C e si rimane in queste condizioni per 10 minuti in modo da permettere alla colonna di pulirsi da tutti gli eventuali residui;

carrier utilizzato: elio ppm ed il suo flusso mantenuto a 1ml min<sup>-1</sup>

Gli oli sono stati analizzati senza diluizione e per ogni campione sono state eseguite 3 iniezioni. Diverse misure delle aree dei picchi sono state ottenute con una HP workstation con una soglia fissata a 0 e l'ampiezza del picco a 0,02. La quantificazione di ciascun composto è stata espressa come percentuale del peso assoluto, utilizzando uno standard interno e fattori di risposta (Rfs). Facendo riferimento al 2,6 dimetilfenolo come standard interno, sono stati calcolati i fattori di risposta per composti chiave e quindi assegnati ad altri composti sulla base dei gruppi funzionali e/o per analogia di struttura. Per evitare eventuali interferenze dovute a potenziali tracce di impurezze le diverse soluzioni di Rfs sono state preparate solo con quattro o cinque composti (più il 2,6 dimetilfenolo).

#### **2.5.1.2 Analisi Gas Massa degli oli essenziali Cistus 2014**

Le analisi GC/MS sono state effettuate con un Agilent Technologies model 7820A interfacciato con un rivelatore MS 5977E MSD (Agilent), in condizioni analoghe a quelle già

riportate. La colonna è stata connessa alla sorgente di ioni dello spettrometro di massa; gli spettri di massa sono stati acquisiti in un range di 35-350 (tempo di scansione: 1s) impostando un range di massa di 10 - 900 m/z.

### **2.5.1.3 Identificazione dei costituenti Cistus 2014**

I costituenti degli oli essenziali sono stati identificati dai loro indici di ritenzione, per confronto dei loro spettri di massa con quelli di libreria (NIST Library Mass spectra) e/o con l'interpretazione dei frammenti EI delle molecole. Tutti i dati ottenuti sono stati inoltre confrontati con dati di letteratura specifica.

### **2.5.1.4 Analisi gas cromatografica degli oli essenziali Cistus 2015**

Gli oli essenziali dei campioni di *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *eriocephalus* e *C. creticus* subsp. *corsicus* raccolti nella primavera del 2015, sono stati analizzati presso il laboratorio CPN dell' Université de Corse "Pasquale Paoli". Per le analisi è stato realizzato un cromatografo Perkin Elmer Clarus 600, dotato di due rilevatori a ionizzazione di fiamma (FID), di un iniettore split e di due colonne (60m x 0,25mm x 0,25 µm), rispettivamente polare (Rtx-Wax, polietilene glicole) e apolare (Rtx-1, polidimetil-silossano). L'iniettore è stato impostato in modo da iniettare ogni volta 0,1 µL d'olio essenziale, lo split utilizzato è stato 1/50.

#### Condizioni operative

temperatura detector 280°C e temperatura iniettore 250°C

temperatura iniziale 60 °C con un incremento termico di 2°C/min sino a raggiungere i 230°C e si rimane in queste condizioni per 45 mn;

carrier utilizzato: idrogeno e il flusso mantenuto a 1ml min<sup>-1</sup> con una pressione in testa alla colonna di 25 psi.

Gli oli sono stati analizzati senza diluizione e per ogni campione sono state eseguite 3 iniezioni.

Per ciascun composto gli indici di ritenzione (Ir) polari ed apolari sono stati calcolati a partire dai tempi di ritenzione di una serie di soluzioni standard di alcheni compresi tra C5 a C30.

### **2.5.1.5 Analisi Gas Massa degli oli essenziali e frazione volatile Cistus 2015**

Le analisi GC/MS sono state effettuate con un Perkin Elmer Clarus SQ 8 C, dotato di due colonne (60m x 0,25mm x 0,25 µm) polare (Rtx-Wax) e apolare (Rtx-1), interfacciato con un rilevatore di massa Perkin-Elmer Turbo mass detector (quadrupolo). Gli spettri di massa sono

stati acquisiti in un range di 35-350 uma; tempo di scansione: 1s; energia di ionizzazione: 70 eV . Le condizioni cromatografiche sono le stesse utilizzate per l'analisi gascromatografica.

#### **2.5.1.6 Identificazione dei costituenti Cistus 2015**

La metodologia usata per l'identificazione dei singoli componenti si è basata sulla comparazione degli indici di ritenzione calcolati su colonna polare ed apolare con quelli della libreria "Aromes", elaborata nel laboratorio CPN dell'Università di Corte, e/o confrontandoli con dati delle libreria commerciali (Joulain and König, 1998, NIST WebBook, 2005, Adams, 2001).

La libreria "Aromes" è stata elaborata a partire da spettri di massa registrati nelle stesse condizioni operative di quelle utilizzate per l'analisi di miscele complesse, assicurando così una maggiore affidabilità nell'identificazione. Attualmente la libreria è costituita dagli indici di ritenzione su due colonne di diversa polarità e gli spettri di massa di più di 700 composti volatili di cui più di 500 sono molecole terpeniche.

### **2.5.2 Caratterizzazione della frazione polifenolica**

Per la caratterizzazione dei composti fenolici è stata utilizzata la cromatografia in fase liquida accoppiata alla spettrometria di massa. Per le specie di Cisto raccolte nel 2014, l'analisi è stata condotta presso il Laboratorio dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del C.N.R. di Sassari., utilizzando un HPLC-DAD-ESI-MS. I campioni raccolti nel 2015 sono stati estratti e caratterizzati nel Laboratorio CPN dell'Università di Corte utilizzando un apparecchio CL-UHP-SM/SM.

#### **2.5.2.1 Analisi HPLC-DAD-ESI-MS**

I diversi estratti sono stati analizzati usando un sistema Agilent LC 1100 series (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) controllato da un Chemiostation software e interfacciato con spettrometro di massa Agilent G1946 (MSD 1100) dotato di sorgente di ionizzazione ESI. Il controllo dello strumento e l'elaborazione dei dati sono stati effettuati tramite la Agilent ChemStation HP A, 09.01 che in ambiente Windows gestisce il sistema. Il rivelatore DAD è stato impostato per la lettura a doppia lunghezza d'onda,  $\lambda = 280 \text{ nm} - 320 \text{ nm}$ .

### *Determinazione degli antociani*

300  $\mu$ L delle frazioni metanoliche sono stati trasferiti in vials per autocampionatore, ed acidificati con 10  $\mu$ L di acido trifluoroacetico concentrato, agitati, filtrati con filtro (per siringa) 0,45 $\mu$  e destinati all'analisi LC/MS. Per condurre l'analisi LC/MS Sono stati utilizzati due sistemi di solvente:

Eluente **A**: metanolo HPLC *grade*

Eluente **B**: soluzione acquosa di acido acetico 0,2%/acido trifluoroacetico 0,2% (preparata diluendo 1 mL di AF e 1 mL di TFA in 500 mL di acqua MilliQ).

Il gradiente di separazione degli analiti in miscela è mostrato nella Tabella 5 ed è stata utilizzata una colonna Zorbax Eclipse XDB 150 x 4,6 mm 5  $\mu$ m con una precolonna C8 3  $\mu$ m, alla Temperatura di 33°C. Il volume d'iniezione è stato 50  $\mu$ L.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Eluente A (%)</b>	<b>Eluente B (%)</b>	<b>Flusso (mL/min)</b>
0	10	90	0,3
20	20	80	0,3
38	32	68	0,3
45	45	55	0,3
48	50	50	0,3
53	90	10	0,3

*Tabella 5: Gradiente di eluizione Antociani*

**DAD.** Lettura a doppia lunghezza d'onda;  $\lambda$  = 280 nm - 320 nm

**MSD.** Condizioni di ottimizzazione ESI; voltaggio di frammentazione CID di 85 V, capillare a 3200 V, "drying gas" N<sub>2</sub> a 350°C a un flusso di 10 L/min, con acquisizione in modalità positiva SCAN nel range 270-780 m/z.

In figura 31 riportiamo un esempio di lettura dello spettro UV dei flavonoidi e degli antociani.

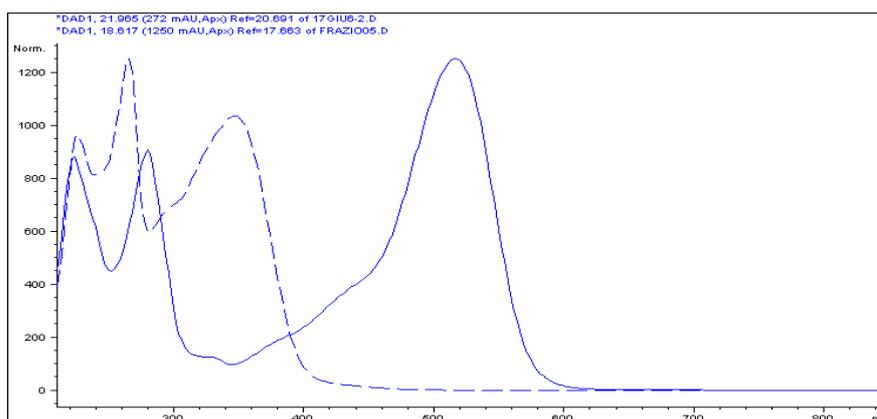


Figura 31: Spettro UV dei (A) flavonoidi e (B) degli antociani

### Determinazione Flavonoidi

Al fine di poter determinare i flavonoidi presenti ulteriori 300  $\mu$ L di estratto metanolico delle frazioni derivanti dalla colonna LH20 sono stati destinati all'analisi LC/MS utilizzando il seguente sistema di solventi:

Eluente **A**: acetonitrile HPLC grade

Eluente **B**: soluzione acquosa di acido trifluoroacetico 0,01% (preparata diluendo 50  $\mu$ L  $\mu$ l di TFA in 500 ml di acqua MilliQ).

Il gradiente di separazione degli analiti in miscela è mostrato in Tabella 6. La colonna utilizzata è una Phenomenex Luna C18(2) 250 x 2,1 mm 5  $\mu$ m con una precolonna C18 3  $\mu$ m, alla Temp, di 33°C. Il volume di iniezione è 25  $\mu$ L.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Flusso (mL/min)
0	10	90	0,5
20	30	70	0,5
35	43	57	0,5
40	50	50	0,5
60	90	10	0,5

Tabella 6: Gradiente di eluizione Flavonoidi

**DAD.** Lettura a doppia lunghezza d'onda;  $\lambda$  = 280 nm - 320 nm

**MSD.** Condizioni di ottimizzazione ESI; voltaggio di frammentazione CID di 120 V, capillare a 3400 V, "drying gas" N<sub>2</sub> a 350°C a un flusso di 10  $\mu$ L/min.

Le condizioni operative sono state ottimizzate in modo da ottenere la massima sensibilità. Durante gli esperimenti gli spettri di massa sono stati acquisiti nella modalità di ionizzazione positiva  $[M+H]^+$  e i parametri dello spettrometro sono stati ottimizzati modulando sullo ione  $[M+H]^+$  nel range 200- 900  $m/z$ .

L'identificazione dei composti si è basata sul confronto tra i loro tempi di ritenzione con quelli di standard puri e/o dal confronto degli spettri di massa con i dati di letteratura o sull'interpretazione dei frammenti EI delle molecole.

### 2.5.2.2 Analisi CL-UHP-SM/SM

Il Laboratorio CPN dispone di uno strumento CL UHP Flexar (Perkin Elmer, Fx10) dotato di una colonna a fase inversa Luna (Phenomenex, 10 x 4,60 mm, con particelle di 3  $\mu\text{m}$ ). La fase stazionaria è composta da micro particelle di silice legate a catene idrocarburiche ( $-C_{18}H_{37}$ ). Come fase mobile è stata utilizzata una metodica di eluizione standardizzata con un gradiente acqua/actonitrile (con 0,1% di acido formico) che si compone in tre fasi: 10% ACN (10 min), un gradiente lineare fino a 100% ACN (10 min), infine un lavaggio con 100% ACN per 5 minuti. Il flusso è 0,5mL/min.

La CL UHP è interfacciata ad uno spettrometro di massa triplo quadripolo 3200 QTRAP (AB Sciex). Le analisi sono state effettuate con una sorgente elettrospray ESI operante in modalità sia positive che negativa.

#### Condizioni operative

temperatura	550 °C
curtain gas (CUR)	25 psi
gas di collisione (CAD)	medium
gas di nebulizzazione (GS1)	31 psi
gas ausiliario (GS2)	65 psi
voltaggio ion spray (IS)	+/- 5000 V
declustering potential (DP)	+/- 80 eV
potenziale in entrata (EP)	+/- 10 eV
energia di collisione (CE)	-35 eV
collision energy spread (CES)	$\pm 15$ eV

L'acquisizione e l'analisi dei dati è stata effettuata tramite un software Analyst versione 1.5.1 AB Sciex (Toronto, Canada). L'identificazione dei composti è stata realizzata utilizzando la metodologia

MRM-EPI. Gli spettri di massa ottenuti sono stati confrontati con quelli contenuti nella libreria informatizzata del laboratorio(350 composti standard).

## **2.6 Caratterizzazione attività biologica**

In collaborazione con la Dott. Juliano del Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università degli Studi di Sassari sono stati eseguiti i test di attività antibatterica e antifungina su *C. salvifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. albidus* L., *C. creticus* L. subsp. *creticus*, *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* e *C. creticus* L. subsp. *corsicus* raccolti nella primavera 2014, estratti in metanolo acidificato e ripartiti in butanolo, acetato di etile e acqua.

### **2.6.1 Microorganismi e terreni di coltura**

L'attività degli estratti è stata testata verso i seguenti microrganismi: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231), (Oxoid-Thermofisher Scientific, Rodano, Italia), e tre ceppi di *Candida* spp. (rispettivamente isolati da strisci vaginali, rettali e faringei, gentilmente concessi dal Dr. M. Tidore, Laboratorio di Analisi Cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale Policlinico di Sassari.

Come terreni di coltura sono stati utilizzati Mueller Hinton Agar (MHA), Mueller Hinton Broth (MHB), Sabouraud Liquid Medium (SLM), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), (Oxoid-Thermofisher Scientific Rodano, Italia). I terreni colturali e le altre soluzioni sono stati preparati con acqua MilliQ.

Prima di ogni test i batteri sono stati coltivati per una notte a 37°C in MBH e i funghi in SLM, sempre a 37°C.

### **2.6.2 Diluizioni degli estratti**

Le diluizioni delle ripartizioni in butanolo e acetato di etile sono state preparate in dimetil solfossido (DMSO) per ottenere una concentrazione di 100 mg/mL (10% w/v) mentre la ripartizione acquosa è stata usata tal quale.

### **2.6.3 Attività antimicrobica**

L'attività antimicrobica degli estratti di Cisto è stata determinata come la Minima

Concentrazione Inibitoria (MIC) mediante il metodo della macrodiluzione in agar (McGinnis and Rinaldi, 1986).

Per testare gli estratti sono state utilizzate diluizioni seriali al raddoppio distribuite in piastre Petri da 50mm preparate in doppio con MHA o SDA (per i batteri e le *Candida* rispettivamente) per un volume totale di 10mL. I campioni sono stati testati tre volte. Come controllo sono state preparate piastre contenenti solo SDA, MHA, SDA+DMSO e MHA+DMSO. Le piastre sono state inoculate in superficie con 2  $\mu$ L con una sospensione contenente circa  $1 \times 10^4$  microrganismi e incubate aerobicamente a 35°C per 24 ore. Dopo l'incubazione le piastre sono state osservate per rilevare l'assenza di crescita batterica o fungina e quindi l'azione antimicrobica dei campioni e la MIC è stata determinata come la più bassa concentrazione di estratto che inibisce la crescita visibile dei microrganismi. Alle concentrazioni testate, il DMSO non ha avuto effetti inibitori sulla crescita microbica.

# CAPITOLO III

## Risultati e discussione

### 3.1 Oli essenziali

#### 3.1.1 Raccolta 2014

L'analisi e la caratterizzazione degli oli estratti di *C. salvifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. albidus* L., *C. creticus* L. subsp. *creticus*, *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* e *C. creticus* L. subsp. *corsicus* sono stati effettuati su piante raccolte nella primavera del 2014. I risultati riguardanti la caratterizzazione degli oli essenziali sono stati oggetto di una recente pubblicazione (Mastino et al., 2016).

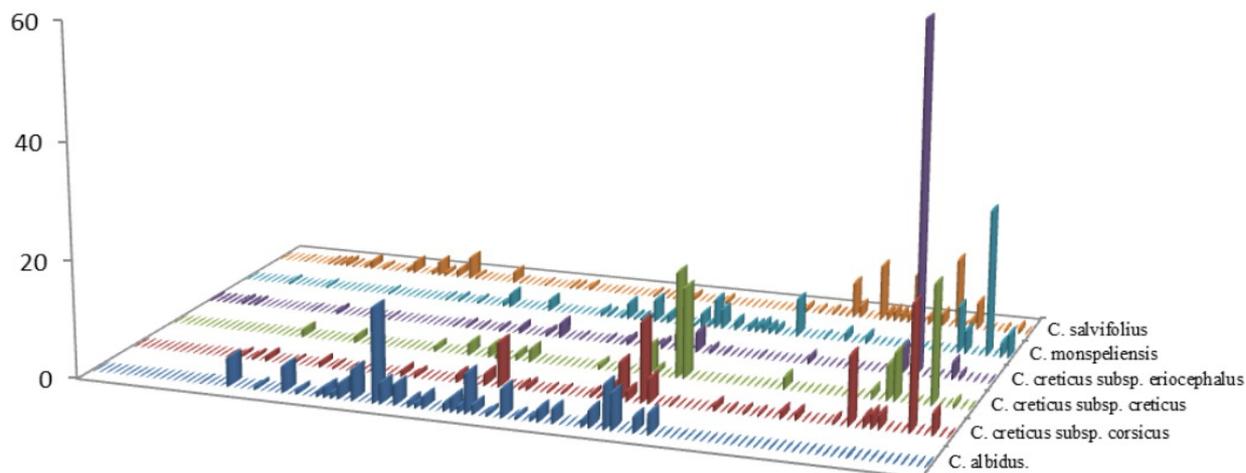


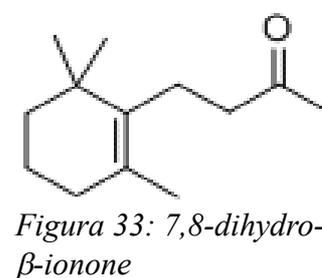
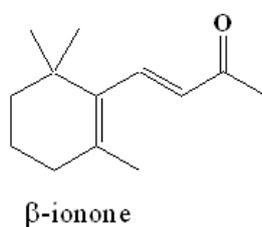
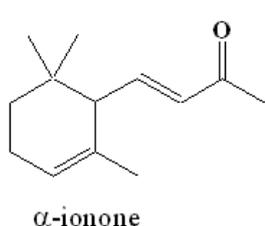
Figura 32: Confronto della composizione chimica degli oli essenziali delle specie e sottospecie di *Cistus* raccolte nel 2014

La composizione chimica degli oli essenziali determinata per via gascromatografica (GC-FID e GC-MS) ha permesso l'identificazione, per ogni specie, di numerosi composti, con percentuali

che vanno da l'81.27% ad un massimo del 99.43% della composizione totale.

I risultati di questo studio sono riportati nella tabella 8 dove i composti identificati sono elencati in ordine di eluizione (cfr. parte sperimentale paragrafo 2.5.1.1) e divisi in classi in base alla loro struttura chimica; i campioni presentano sei profili estremamente diversi tra loro e caratteristici di ciascuna specie e sottospecie (Fig 32).

Dall'analisi della composizione dell'olio essenziale di *C. salvifolius* è stato possibile identificare 53 composti che rappresentano l'81.27% del totale. Quest'olio è caratterizzato dalla presenza di una buona concentrazione di norisoprenoidi (10.44%) appartenenti alla famiglia degli iononi, assenti negli altri oli esaminati, e di cui il 7,8-dihydro- $\beta$ -ionone (3.89%) è il maggiore costituente (Fig. 33).



Tra i diterpeni il principale è il manoyl oxide (11.98%), che è anche il composto presente in maggiore quantità in questo olio, e il cistodiol un diterpene con scheletro clerodano. Analogamente, i diterpeni sono la frazione principale dei metaboliti identificati in popolazioni di *C. salvifolius* provenienti dalla Tunisia e dalla Sicilia (Loizzo et al. 2013) e da popolazioni provenienti da Creta caratterizzate da *cis*-ferruginol, manoyl oxide e 13-epi manoyl oxide (Demetzos et al. 2002a). Ben rappresentati anche i diterpeni idrocarburici con il geranyl-p-cymene (9.61%) ed il cembrene A(3E) (8.55%). Infine, sono presenti diversi sesquiterpeni, sia idrocarburici sia ossigenati, anche se in bassa concentrazione. Mentre l'olio ottenuto da piante provenienti dalle Isole Eolie (Sicilia) contiene un'alta percentuale di questa famiglia di composti: sesquiterpeni idrocarburici 12.5%, ossigenati 31.5%; tra i primi il principale è il germacrene D (9.1%) che è anche il maggior componente di questo olio (Loizzo et al. 2013).

Tra le specie sarde, nell'olio essenziale estratto da *C. monspeliensis* sono stati identificati 40 composti che rappresentano il 92.15% del totale. L'analisi GC-MS ha evidenziato in questo olio l'abbondanza di idrocarburi lineari che costituiscono la frazione più importante dell'olio (41.36%) che ha come maggiore costituente l'heneicosane (25.20%). Sono presenti in buona quantità anche i sesquiterpeni (14.53%), mentre la frazione diterpenica è presente in quantità molto bassa e l'unico composto di questa famiglia trovato in quantità significativa è stato il

phytol (4%). Dal confronto con oli isolati da *C. monspeliensis* provenienti da altre regioni (Angelopoulou et al. 2002; Anghelopoulou et al. 2001; Jemia et al. 2013), risulta che l'olio essenziale di origine sarda presenta aspetti qualitativi e quantitativi molto particolari.

Nel *C. albidus* sardo i sesquiterpeni costituiscono la frazione più abbondante dell'olio (42%) tra cui predominano in particolare  $\beta$ -caryophyllene (4.54%),  $\beta$ -bourbonene (4.88%) e  $\alpha$ -curcumene (16%). Sono stati identificati anche diversi sesquiterpeni ossigenati; tra questi *cis*-cadin-4-en-7-ol (7.43%) e  $\tau$ -cadinol (6.22%) sono i più abbondanti. Sono assenti i diterpeni della famiglia dei labdani, presenti invece in tutti gli altri oli studiati (Figura 34). L'alto contenuto in sesquiterpeni è coerente con precedenti dati di letteratura che confermano la presenza in grande quantità di questa classe di composti, sia nei tessuti sia negli oli di *C. albidus* proveniente dal Nord-ovest della Spagna, dalla Francia e dall'Italia. Il principale composto identificato in *C. albidus* raccolto in Spagna è lo zingiberene (14.8%) (Pala-Paul et al. 2005), così come l'olio di *C. albidus* ottenuto da piante spontanee della Provenza (Francia), è caratterizzato da un alto contenuto di sesquiterpeni e in particolare di  $\alpha$ -zingiberene (12.8%) (Paolini et al., 2008; Maccioni et al., 2007).

*C. albidus* è l'unica specie del genere *Cistus* caratterizzato dalla presenza di  $\alpha$ -zingiberene, per questo motivo può essere considerato identificativo per questa specie (Robles & Garzino 1998).

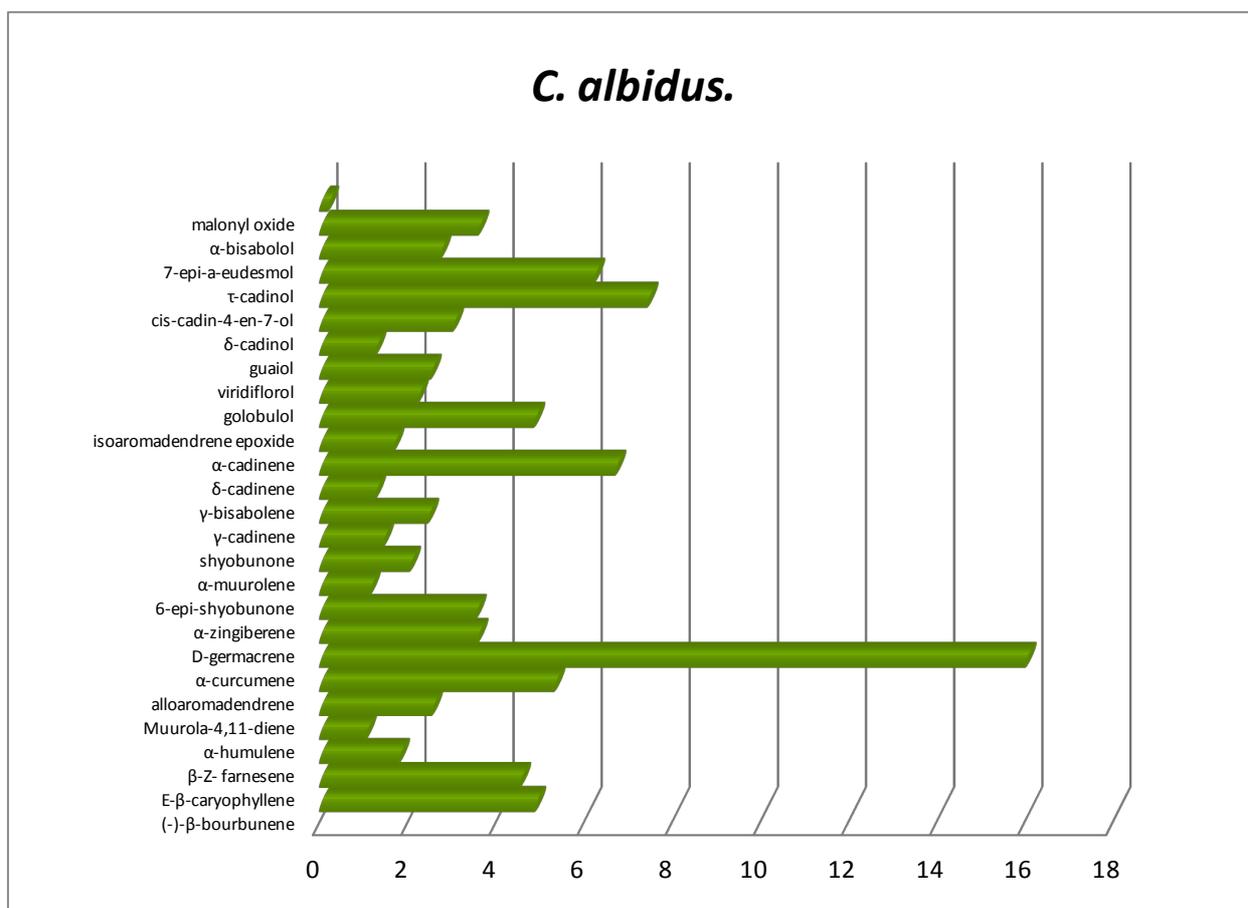


Figura 34: Maggiori costituenti dell'olio di *Cistus albidus*

L'analisi dell'olio essenziale di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto in Sardegna ha permesso di identificare 37 composti che costituiscono il 94.15% del totale. La caratteristica principale di quest' olio è la presenza di una considerevole quantità di diterpeni della famiglia dei labdani come il manoyl oxide (64%) e il suo isomero (4.4%) che rappresentano la frazione maggiore della composizione dell'olio, come si può vedere dalla figura 35. I diterpeni ossigenati del gruppo dei labdani sono considerati dei markers tassonomici e sono stati trovati in grande quantità anche in *Cistus creticus* subsp. *corsicus* (Paolini et al., 2009).

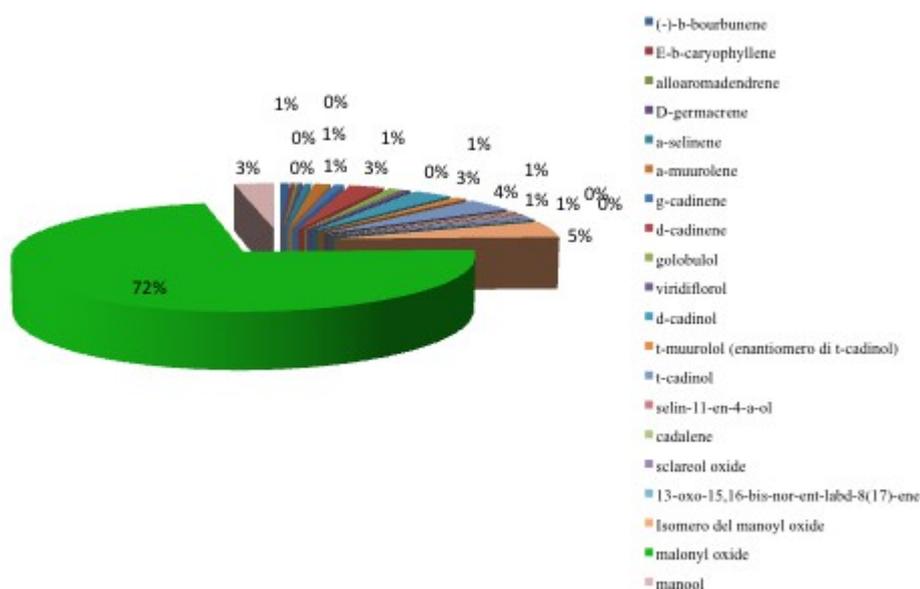
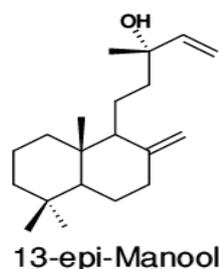
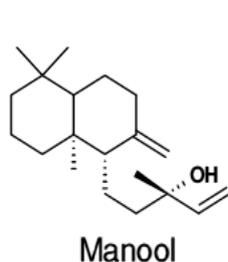


Figura 35: Composizione percentuale dell'olio essenziale di *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto nella stazione di Cala Gonone

Un'alta concentrazione di manoyl oxide (9.9%) e 13-epi manoyl oxide (3.4%) è stata rilevata anche nell'estratto di foglie di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* proveniente da Creta (Grecia) (Demetzos et al. 1997); mentre Maggi et al. (2016) hanno trovato questi composti solo in piccola quantità (1.4%).

In *C. creticus* subsp. *creticus* sono stati identificati 20 composti che costituiscono il 99.26% della composizione totale dell'olio. I diterpeni della famiglia dei labdani costituiscono una significativa frazione (38.70%) dei metaboliti identificati, con una grande concentrazione di manool (20.26%) e manoyl oxide (17%).



I sesquiterpeni ossigenati sono presenti in una percentuale del 49%, tra cui predominano selina-3,11-dien-6- $\alpha$ -ol (18%) e cis-cadin-4-en-7-ol (15.55%), mentre i sesquiterpeni idrocarburici sono presenti in bassa concentrazione. I monoterpeni, idrocarburici e ossigenati, non sono presenti, mentre diversi di questi composti sono stati trovati, anche se in piccole quantità, nel *C. creticus* subsp. *creticus* di originario di Creta (Demetzos et al. 1997; Demetzos et al. 1999). In questi lavori è stata anche evidenziata la presenza di diversi sesquiterpeni (ossigenati e non) e diterpeni della famiglia dei labdani, in particolare manoyl oxide and 13-epi-manoyl oxide.

*C. creticus* subsp. *corsicus* (37 composti, 94.6% del totale) è l'unica specie endemica Sardo-Corsa; l'olio essenziale presenta un profilo chimico molto simile a quello di *C. creticus* subsp. *creticus*, è composto principalmente da diterpeni (44.25%) tra cui predominano manool (21%) and 13-oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-8(17)-ene (11.66%). Tra i sesquiterpeni  $\tau$ -cadinol (13.63%) è il più abbondante.

RI	Composti	<i>C. albidus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	<i>C. monspeliensis</i>	<i>C. salvifolius</i>
1481	$\alpha$ -curcumene	16,01				0,72	
1640	$\tau$ -cadinol	6,22	13,63		3,47	3,37	
1644	selina-3,11-dien-6-a-ol		4,23	18,04			
1660	selin-11-en-4-a-ol			15,55	0,69	1,55	
1846	sclareol oxide ( <i>cis</i> -A/B)		0,40	2,07	1,10		6,07
1965	geranyl- <i>p</i> -cymene						9,61
1972	cembrene A(3 <i>E</i> )						8,55
1983	13-oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-8(17)-ene		11,66	1,46	0,36		
1998	manoyl oxide	0,18	2,47	8,17	64,00		11,98
2021	3-methyl eicosane					8,11	4,67
2057	manool		21,07	20,26	2,82		
2100	heneicosane					25,20	0,38

Tabella 7: Confronto tra i composti presenti in maggiori quantità nelle specie di *Cistus* studiate

Da un confronto con l'olio essenziale di *C. creticus* subsp. *corsicus* raccolto in Corsica, risulta che gli oli hanno una composizione molto simile, anche se differente nella concentrazione dei costituenti quantità principali (Paolini et. al., 2009).

Nella Tabella 7 sono messi a confronto i maggiori composti presenti nelle diverse specie di *Cistus* analizzate.

Al fine di sintetizzare la composizione chimica dei dati, è stata applicata la PCA (analisi dei componenti principali) per esaminare la distribuzione relativa dei campioni in accordo con la loro produzione dei diversi composti.

Dall'analisi dei profili degli O.E. dei sei campioni analizzati (Figura 36), lo score plot (a) mostra un cluster formato dalle tre sottospecie di *C. creticus*. con *C. salvifolius* che rimane molto vicino a questo cluster, fatto che troverebbe spiegazione da quanto riportato da Vogt et al. (1978). In questo studio gli autori suggeriscono una possibile origine ibrida del *C. creticus* subsp. *eriocephalus* dal *C. salvifolius*. Nel loading plot (b) la distribuzione dei componenti degli O.E. è in accordo con quella dello score plot.

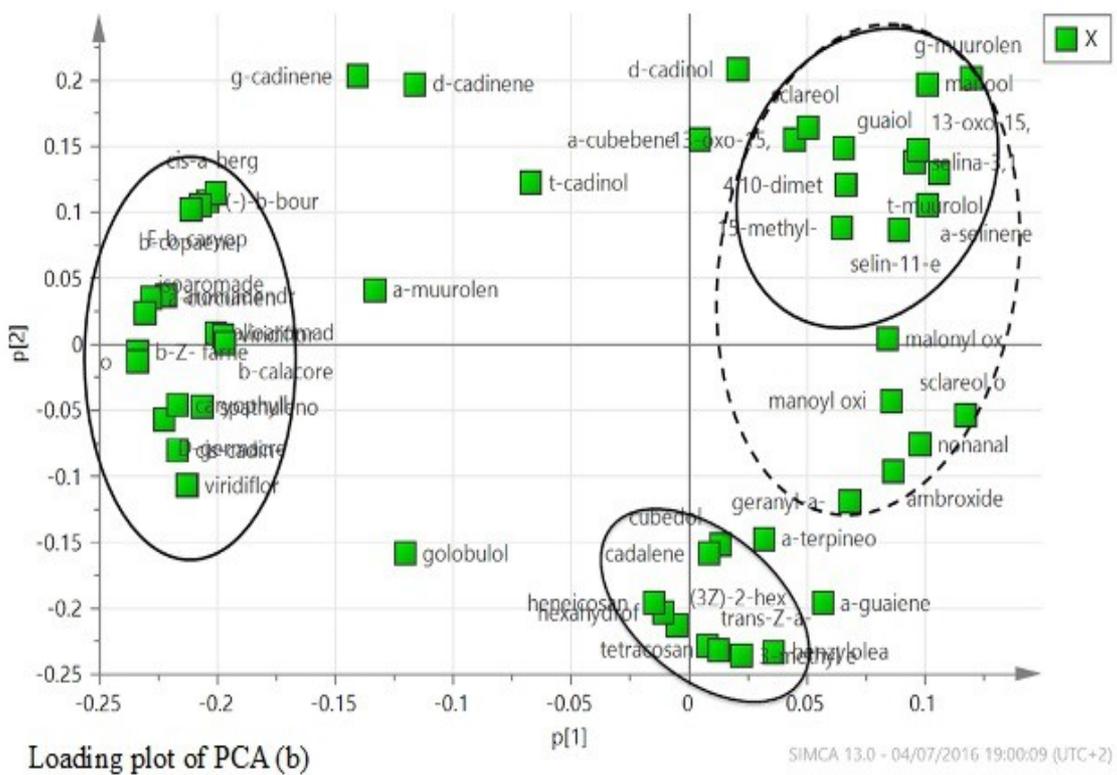
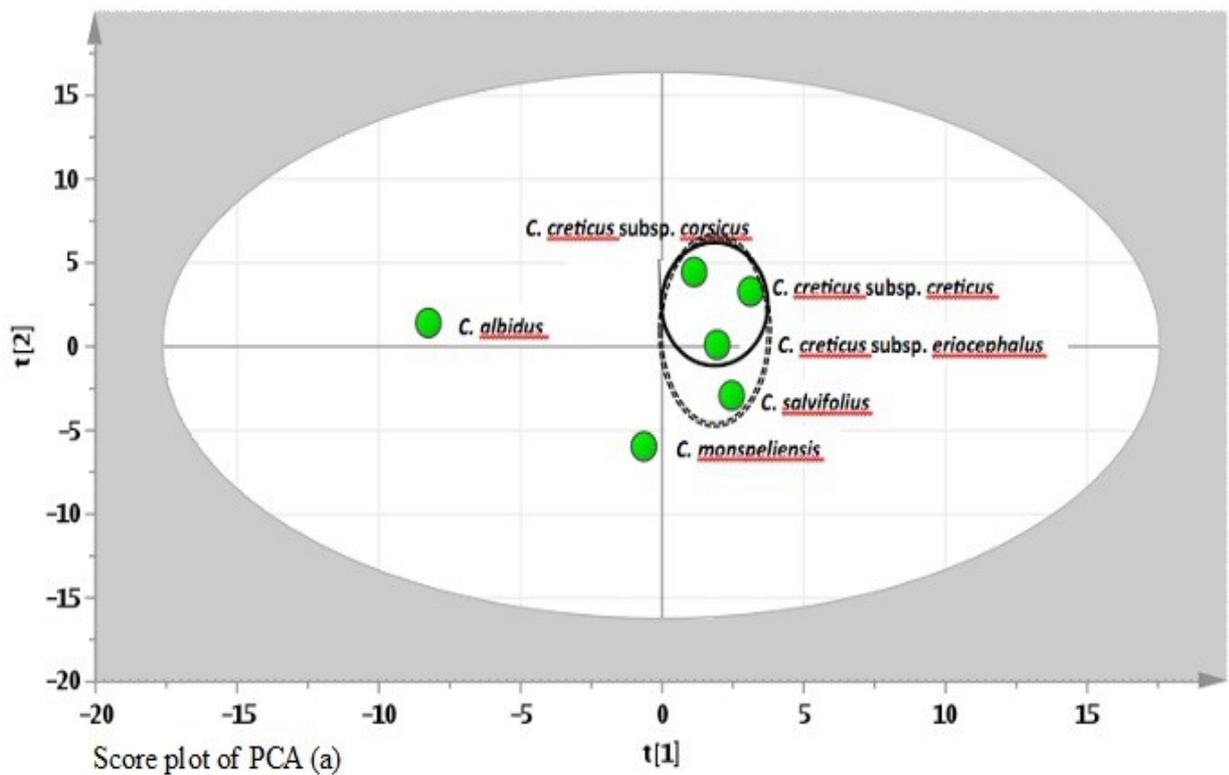


Figura 36: Analisi PCA e loading plot degli oli essenziali delle specie di *Cistus* raccolte nel 2014

Components	<i>C. albidus</i>	<i>C. c. corsicus</i>	<i>C. c. creticus</i>	<i>C. c. eriocephalus</i>	<i>C. monspeliensis</i>	<i>C. salvifolius</i>	ID <sup>a</sup>	References
<b>LINEAR</b>								
<b>HYDROCARBONS</b>								
3-methyl eicosane					8.11	4.67	RI, MS	
heneicosane					25.20	0.38	Std	
tetracosane					2.42	0.99	Std	
heptacosane					4.07		Std	
<b>NO TERPENIC</b>								
<b>CARBONYL COMPOUNDS</b>								
nonanal				0.12		0.13	Std	
5,9-dimethyl-5,8-decadien-2-one						0.70	RI, MS	
undecanal					0.35		Std	
2,6,6-trimethyl 1-cyclohexene-1-acetaldehyde						0.24	RI, MS	
6-methyl-5-(1-methylethylidene)-6,8-nonadien-2-one						1.41	RI, MS	
4-(4-methyl phenyl)-pentanal						1.98	RI, MS	
dodecanal					0.32		Std	
hexahydrofarnesyl acetone					6.55	0.51	RI, MS	
[(+/-)-phytone]							MS	
<i>cis,cis,cis</i> -7,10,13-hexadecatrienal		0.39					RI, MS	
15-methyl-( <i>Z</i> )-11-hexadecenal		0.51				0.26	RI, MS	
<b>FATTY ACIDS</b>								
lauric acid					0.81		Std	
miristic acid					1.09		Std	
palmitic acid					1.45		Std	
<b>ALIPHATIC ESTERS</b>								
methoxyacetic acid-2-ethylcyclohexyl ester						0.48	RI, MS	
<b>AROMATIC ESTERS</b>								
(3 <i>Z</i> )-2-hexenyl benzoate					2.80	0.45	RI, MS	<a href="#">Hazzit, Baaliouamer, et al., 2006</a>
(2 <i>E</i> )-2-hexenyl benzoate					0.38		RI, MS	<a href="#">Campeol, Flamini, et al., 2001</a>
benzyl benzoate					0.95		Std	<a href="#">Su, Ho, et al., 2006</a>
benzyl oleate					0.32	0.27	Std	
<b>MONOTERPENE</b>								
<b>HYDROCARBONS</b>								
$\alpha$ -pinene				0.36			Std	
camphene				0.16			Std	
$\beta$ -pinene				0.21			Std	
limonene				0.12			Std	
<b>OXIGENATED</b>								
<b>MONOTERPENES</b>								
borneol				0.49			Std	
terpinen-4-ol				0.26			Std	
$\alpha$ -terpineol				0.42	0.40		Std	
ascaridole						0.29	RI, MS	<a href="#">Lucero, Estell, et al., 2003</a>
10-(acetyl methyl)-3-carene						0.79	RI, MS	<a href="#">Al-Qudah, 2013</a>
<b>SESQUITERPENE</b>								
<b>HYDROCARBONS</b>								
$\alpha$ -cubebene	0.1	0.49		0.17			Std	
$\alpha$ -copaene						0.45	Std	
(-)- $\beta$ -bourbonene	4.88	0.93	1.38	0.64			Std	

cis- $\alpha$ -bergamotene	0.61	0.33					RI, MS
<i>E</i> - $\beta$ -caryophyllene	4.54	0.92	1.18	0.22			Std
$\beta$ -copaene	0.77	0.32					RI, MS
$\alpha$ -guaiene					0.27	0.47	RI, MS
aromadendrene	0.98					0.09	Std
$\beta$ - <i>Z</i> - farnesene	1.79				0.46		Std
$\alpha$ -humulene	1.04						Std
$\beta$ - <i>E</i> -farnesene					0.43		Std
muurolo-4,11-diene	2.54						RI, MS
<i>cis</i> -muurolo-4(14)5-diene						0.17	RI, MS
alloaromadendrene	5.32			0.22		1.97	Std
$\alpha$ -curcumene (= ar curcumene)	16.01				0.72		Std
D-germacrene	3.57	0.64		0.27	2.33		Std
$\alpha$ -zingiberene	3.53						RI, MS
$\alpha$ -selinene			2.09	0.50			RI, MS
viridiflorene	0.90					0.36	RI, MS
$\gamma$ -muurolene		0.97	0.96	0.46			RI, MS
$\alpha$ -muurolene	2.04	1.39	1.80	1.15	1.92	0.38	RI, MS
$\gamma$ -patchoulene			0.77				RI, MS
$\beta$ -himachalene						0.66	RI, MS
$\gamma$ -cadinene	2.45	1.98	1.17	0.71			RI, MS
$\gamma$ -bisabolene	1.25						RI, MS
$\delta$ -cadinene	6.70	7.67	2.18	2.51		0.12	RI, MS
cada-1,4-diene		1.02		0.85			RI, MS
$\alpha$ -cadinene	1.67						RI, MS
$\beta$ -calacorene	0.71	0.47		0.26	0.50		RI, MS
cadalene		0.33		0.28	1.07		RI, MS
<b>OXYGENATED SESQUITERPENES</b>							
6-epi-shyobunone	1.13						RI, MS
shyobunone	1.43						RI, MS
<i>cis</i> -( <i>Z</i> )- $\alpha$ -bisabolene epoxide		0.80					RI, MS
isoaromadendrene epoxide	4.86				0.53		RI, MS
spathulenol	0.65	0.31		0.36	0.42	0.18	RI, MS
<i>trans</i> -( <i>Z</i> )- $\alpha$ -bisabolene epoxide					0.41	0.14	RI, MS
caryophyllene oxide	0.80	0.40		0.24	0.53	0.21	Std
globulol	2.22		0.86	0.95	3.80	0.13	Std
viridiflorol	2.51			0.43	1.56	0.74	Std
aromadendrene oxide-(2)		0.58					Std
cubedol		0.30		0.28	0.88		RI,

Weyerstahl, Marschall,  
et al., 1999

Hamm, Bleton, et al.,  
2005

guaiol	1.26	2.49	8.80		0.36		MS	
$\delta$ -cadinol	3.02	6.47	4.86	2.82	2.23	0.64	RI, MS	
$\tau$ -muurolol		1.81	0.93	0.92	0.68		RI, MS	
<i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol	7.43				5.03		RI, MS	<a href="#">Su, Ho, et al., 2006</a>
$\tau$ -cadinol	6.22	13.63		3.47	3.37		RI, MS	
selina-3,11-dien-6- $\alpha$ -ol		4.23	18.04				RI, MS	
selin-11-en-4- $\alpha$ -ol			15.55	0.69	1.55		RI, MS	
7- <i>epi</i> - $\alpha$ -eudesmol	2.73						RI, MS	
$\alpha$ -bisabolol	3.59				1.07		Std	
ambroxide				0.23		0.75	Std	
alloaromadendrole						0.57	RI, MS	
<b>NORISOPRENOIDS</b>								
$\beta$ -cyclocitral						0.31	Std	
dehydro-ar-ionene						0.50	RI, MS	
( <i>E</i> )- $\beta$ -damascenone						0.13	Std	
dihydro- $\alpha$ -ionone						0.75	RI, MS	
$\beta$ -iso-ionone						2.47	RI, MS	
$\alpha$ -ionene						0.73	RI, MS	
$\alpha$ -ionone						1.32	Std	
7,8-dihydro- $\beta$ -ionone						3.89	RI, MS	
<i>trans</i> - $\beta$ -ionone						0.27	Std	
<b>DITERPENE</b>								
<b>HYDROCARBONS</b>								
geranyl- $\alpha$ -terpinene						2.13	RI, MS	<a href="#">Paolini et al., 2008</a>
geranyl-p-cymene						9.61	RI, MS	<a href="#">Paolini et al., 2008</a>
cembrene A (3 <i>Z</i> )						1.42	RI, MS	<a href="#">Rahimi-Nasrabadi, Gholivand, et al., 2009</a>
cembrene A (3 <i>E</i> )						8.55	RI, MS	<a href="#">Rahimi-Nasrabadi, Gholivand, et al., 2009</a>
kaur-16-ene						1.30	RI, MS	<a href="#">Demetzos et al., 2002</a>
<b>OXYGENATED</b>								
<b>DITERPENES</b>								
phytol					4.01		Std	
<b>LABDANE TYPE</b>								
<b>DITERPENES</b>								
manoyl oxide	0.18	2.47	8.17	64.00		11.98	RI, MS	<a href="#">Demetzos et al., 2002</a>
manoyl oxide isomer				4.40		2.10	RI, MS	<a href="#">Demetzos et al., 2002</a>
13- <i>epi</i> -manoyl oxide		2.46					RI, MS	<a href="#">Demetzos et al., 2002</a>
dihydromanoyl oxide				0.77			RI, MS	
<b>LABDANES</b>								
sclareol oxide ( <i>trans</i> -A/B)		1.06					RI, MS	<a href="#">Wulfson et al., 1966</a>
sclareol oxide ( <i>cis</i> -A/B)		0.40	2.07	1.10		6.07	RI, MS	<a href="#">Wulfson et al., 1966; Hutschenreuther et al.,</a>

							2010
labdane unidentified (MW 281)	1.24						
labdane unidentified (MW 281)	1.21			1.24	1.50		
labdane unidentified (MW 281)					1.77	RI, MS	
Sclareol oxide ( <i>cis</i> B/C)					1.47	RI, MS	<u>Hutschenreuther et al., 2010</u>
13-oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-8(17)-ene	11.66	1.46	0.36			RI, MS	
13-oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-7(8)-ene	1.78	5.95				RI, MS	
manool	21.07	20.26	2.82			RI, MS	
sclareol	3.70	0.78				Std	
<b>OTHERS</b>							
1,1-dimethyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-cyclopropane	0.49						
hexadecanol					1.56	Std	
cistodiol						1.42	RIM S
<b>Total identified</b>	<b>99.43</b>	<b>97.6</b>	<b>99.26</b>	<b>94.15</b>	<b>92.15</b>	<b>81.27</b>	
Linear Hydrocarbons					39,8	6,4	
No terpenic carbonyl compounds		0,9		0,12	7,22	5,23	
Monoterpene hydrocarbons				0,85			
Oxygenated monoterpenes				1,17	0,4	1,08	
Sesquiterpene hydrocarbons	61,4	17,46	11,53	8,24	7,7	4,67	
Oxygenated sesquiterpenes	37,85	31,02	49,04	10,39	22,42	3,36	
Norisoprenoids						10,37	
Diterpene hydrocarbons						23,01	
Oxygenated diterpenes	0,18	47,05	38,69	73,45	5,25	24,89	

*Tabella 8: Composizione chimica degli oli essenziali delle specie di Cistus della Sardegna raccolte nel 2014 a: **ID** Metodi di identificazione: **MS**, dal confronto con lo spettro di massa con quelli librerie Adams, Nist 11 e interpretazione dei frammenti degli spettri di massa. **RI**, dal confronto dell'indice di ritenzione con quelli riportati in letteratura. **Std**, dal confronto con il tempo di ritenzione e lo spettro di massa di standard autentici a nostra disposizione.*

### 3.1.2 Raccolta 2015 *C. creticus* ssp

L'attività di ricerca è proseguita con lo studio delle tre sottospecie di *Cistus creticus*: *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolte nel 2015.

Il primo dato degno di nota è la totale assenza di olio essenziale rilevata in *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, raccolto in una stazione diversa rispetto all'anno precedente (Bonnanaro invece che Cala Gonone). Questo dato è in accordo con quanto riferito da Paolini et al. (2009) in uno studio su campioni di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolti in diverse stazioni della Corsica e del Nord-Sardegna. Secondo gli autori l'assenza di olio essenziale troverebbe risposta nelle caratteristiche botaniche di questa sottospecie in cui non sono presenti tricomi ghiandolari.

L'analisi gascromatografica è stata eseguita presso il laboratorio CPN dell'Università di Corte e ha permesso l'identificazione di 59 composti in *C. creticus* subsp. *corsicus* e 85 in *C. creticus* subsp. *creticus* che rappresentano rispettivamente il 76.68% e il 79.16% del totale dei composti presenti. Questi ultimi sono stati identificati dal confronto dei loro indici di ritenzione calcolati su colonna polare ed apolare con quelli della libreria "Aromes", elaborata nel laboratorio CPN dell'Università di Corte, e/o confrontandoli con dati delle libreria commerciali (Joulain and König, 1998, NIST WebBook, 2005, Adams, 2001) (cfr. paragrafo 2.5.1.4 e seguenti).

I risultati sono riportati nella tabella 10 dove i composti identificati sono elencati divisi in classi in base alla loro struttura chimica.

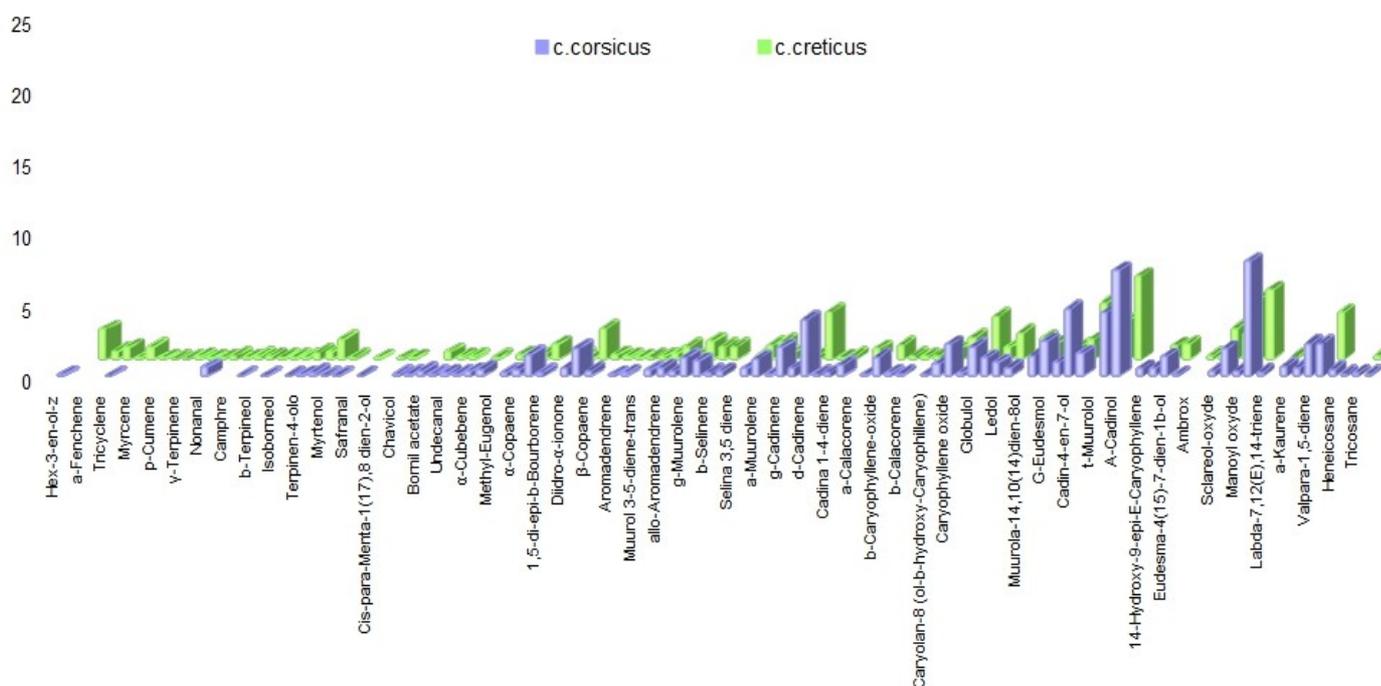


Figura 37: Confronto della composizione chimica degli oli essenziali di *C. creticus* subsp. *creticus* e *C. creticus* subsp. *corsicus* raccolti nel 2015.

Gli oli di entrambi i campioni presentano composizione chimica simile anche se sono presenti alcune differenze quantitative e sono caratterizzati principalmente da sesquiterpeni (Figura 37). Tra i sesquiterpeni ossigenati sono stati identificati  $\alpha$ -cadinol (7.48% in *C. creticus* subsp. *corsicus* e 5.91% in *C. creticus* subsp. *creticus*), cadin-4-en-7-ol (4.72% e 1.41% rispettivamente),  $\beta$ -eudesmol (4.47% e 2.76%) e globulol (2.07% e 3.06%).

Tra i sesquiterpeni idrocarburici predominano  $\delta$ -cadinene (3.38%) in *C. creticus* subsp. *creticus* e  $\delta$ -cadinene (3.99%) e  $\gamma$ -cadinene (2%) in *C. creticus* subsp. *corsicus*. Un'altra grande frazione degli oli è costituita dai diterpeni ossigenati della famiglia dei labdani che, come in precedenza accennato, sono considerati markers tassonomici: 14.05% in *C. creticus* subsp. *corsicus* e 16.77% in *C. creticus* subsp. *creticus* tra cui predominano il 13-epi-manoyl oxide (8.08% e 4.93% rispettivamente) e il labda-7,14-diene-13-ol (2.29% e 3.3% rispettivamente). Inoltre, in *C. creticus* subsp. *creticus* sono presenti in quantità interessante anche il manoyl oxide (4.3%) e lo sclareol-oxide (2.19%).

Nella tabella 9 e nelle figure 38 e 39 sono stati messi a confronto i composti, ordinati per tipologia, identificati nei campioni raccolti in due anni differenti. Possiamo notare che in tutti gli oli sono rappresentate in grande quantità le famiglie dei diterpeni ossigenati e dei sesquiterpeni, sia idrocarburici che ossigenati e più in generale che i composti ossigenati sono predominati nella composizione totale degli oli.

Composti	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> 2014	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> 2015	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> 2014	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> 2015
Linear Hydrocarbons		0,9		0,13
No terpenic carbonyl compounds	0,9	1,75		0,65
Monoterpene hydrocarbons				5,21
Oxygenated monoterpenes		0,82		3,93
Sesquiterpene hydrocarbons	17,46	19,63	11,53	20,12
Oxygenated sesquiterpenes	31,02	35,17	49,04	31,2
Norisoprenoids		0,6		0,16
Diterpene hydrocarbons		2,99		
Oxygenated diterpenes	47,05	14,05	38,69	16,77

Tabella 9: Confronto tra composti suddivisi per tipologia presenti in *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *creticus* raccolti in due anni differenti

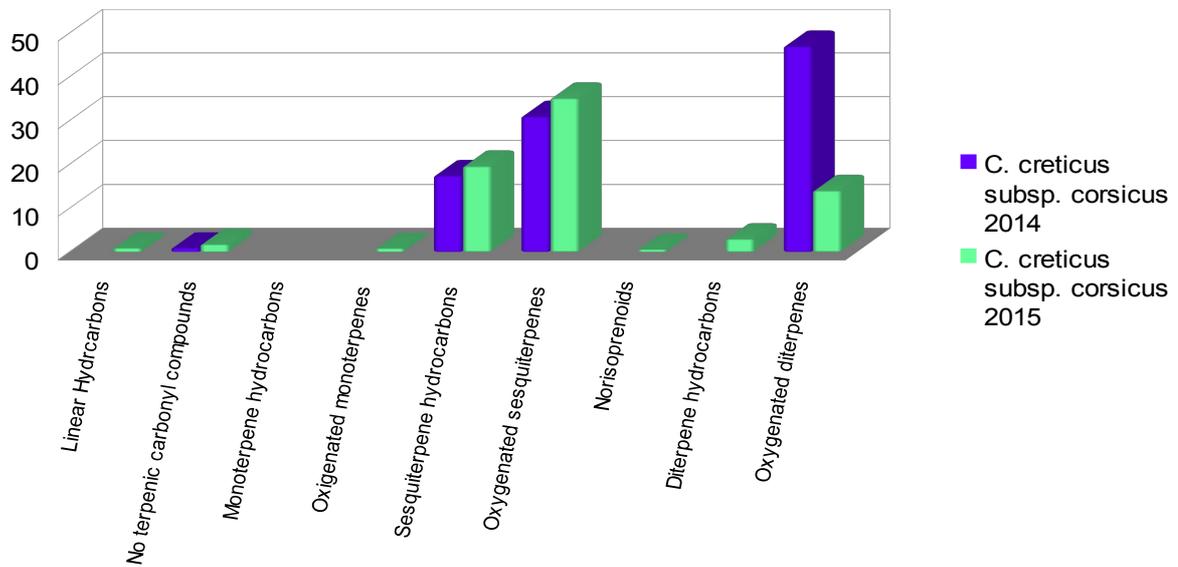


Figura 38: Confronto tra i composti suddivisi per tipologia presenti in *C. creticus subsp. corsicus* e *C. raccolti* in due anni differenti.

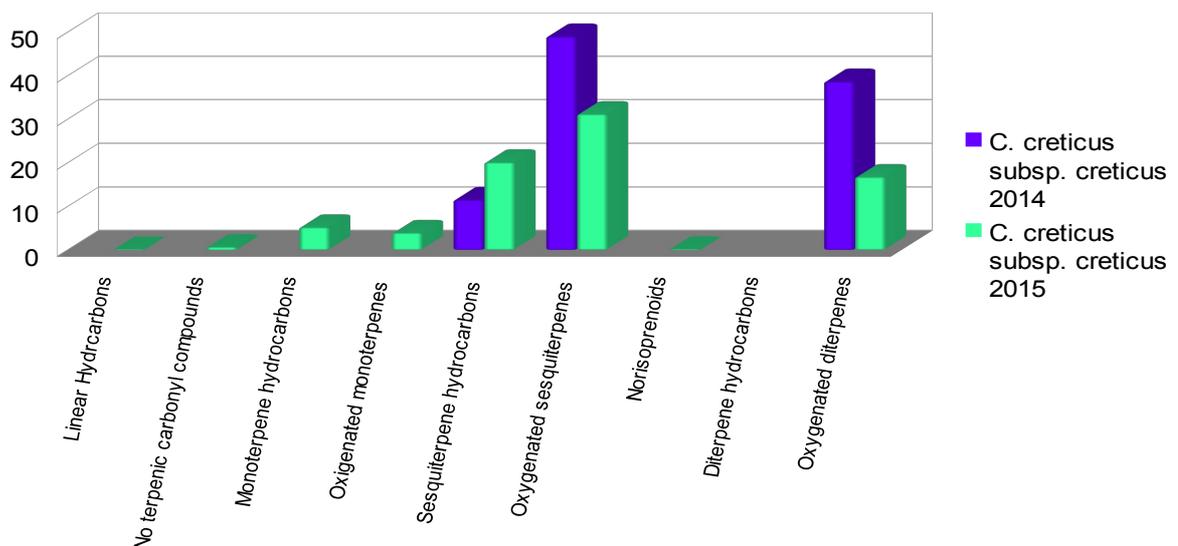


Illustrazione 39: Confronto tra i composti suddivisi per tipologia presenti in *C. creticus subsp. creticus* raccolti in due anni differenti

ents	I <sup>a</sup>	Ia <sup>b</sup>	Ip <sup>c</sup>	<i>C.c.corsicus</i>	<i>C.c.creticus</i>	ID <sup>d</sup>	References
<b>LINEAR</b>							
<b>HYDROCARBONS</b>							
Tricyclene	927	951	1023	0.05	0.13	1, MS	
Heneicosane		2098	2099	0.48		1, MS	
Tricosane	2301	2297	2294	0.21		1, MS	
Pentacosane	2498	2501	2494	0.16		1, MS	
<b>NO TERPENIC</b>							
<b>CARBONYLIC</b>							
<b>COMPOUNDS</b>							
Hex-3-en-ol-z	851	833	1377	0.09		1, MS	
Nonanal	1076	1082	1388	0.62	0.27	1, MS	
Decanal	1180	1184	1489	0.05		1, MS	
(E)-2-Decenal	1640	1255	1654	0.15		1, MS	
Undecan-2-one	1273	1273	1596	0.14	0.2	1, MS	
Undecanal	1290	1287	1626	0.2	0.18	1, MS	
7-Acetyl-2,2,6-Trimethylbicyclo(4,2,0)Octane		1361		0.5		1, MS	
<b>ESTERS</b>							
Bornil acetate	1270	1270	1508	0.39	0.51	1, MS	<a href="#">McLafferty and Stauffer (1994)</a>
Lyratyle-propionate		1348		0.17		1, MS	
Z-3-Hexenyl benzoate	1545	1545	2087	0.21	0.25	1, MS	
<b>MONOTERPENE</b>							
<b>HYDROCARBONS</b>							
$\alpha$ -Pinene	936	932	1024		2.16	1, MS	
$\alpha$ -Fenchene	941	943			0.6	1, MS	
Camphene	950	945	1066		0.86	1, MS	
$\beta$ -Pinene	978	972	1112		0.89	1, MS	
Myrcene	987	982	1159		0.12	1, MS	
Terpinene	1013	1010			0.06	1, MS	
<i>p</i> -Cumene	1015	1013			0.06	1, MS	
Limonene	1025	1022	1200		0.23	1, MS	
$\gamma$ -Terpinene	1051	1049			0.12	1, MS	
Terpinolene	1082	1080			0.11	1, MS	
<b>OXIGENATED</b>							
<b>MONOTERPENES</b>							
Linanol	1086	1084	1540		0.11	1, MS	
Camphre	1123	1122	1508		0.24	1, MS	
Trans-Pinocarveol	1126	1124	1646	0.05	0.2	1, MS	
$\beta$ -Terpineol	1137	1134			0.16	1, MS	<a href="#">McLafferty and Stauffer (1994)</a>
Pinocarpone	1137	1140	1559	0.05	0.16	1, MS	
Isoborneol	1142	1142			0.13	1, MS	
Borneol	1150	1146	1694	0.06	0.49	1, MS	
Terpinen-4-ol	1164	1162	1602	0.1	0.5	1, MS	
$\alpha$ -Terpineol	1176	1173	1686	0.29	1.44	1, MS	
Myrtenol	1178	1180	1787	0.05	0.17	1, MS	<a href="#">König et al. (2001)</a>
Safranal	1182	1176			0.09	1, MS	
$\beta$ -Cyclocitral	1195	1198	1610	0.08		1, MS	<a href="#">König et al. (2001)</a>
Cis-para-Menta-1(17),8 dien-2-ol	1217	1198			0.12	1, MS	
Carveol-Dihydro-neo-iso		1214			0.12	1, MS	
Chavicol	1219	1226		0.14		1, MS	
<b>SESQUITERPENE</b>							
<b>HYDROCARBONS</b>							
$\alpha$ -Cubebene	1355	1355	1452	0.31	0.14	1, MS	
$\alpha$ -Ylangene	1376	1371	1489	0.25	0.19	1, MS	
$\alpha$ -Copaene	1379	1375	1480	0.49	0.45	1, MS	
$\beta$ -Bourbonene	1386	1383	1516	1.54	1.07	1, MS	
1,5-di-epi-b-Bourborene	1390	1386	1516	0.25		1, MS	
$\beta$ -Elemene	1392	1387			0.24	1, MS	
$\beta$ -Caryophyllene	1421	1417	1592	1.98	2.17	1, MS	
$\beta$ -Copaene	1430	1426	1586	0.39	0.33	1, MS	
$\alpha$ -Guaiene	1443	1435			0.21	1, MS	
Aromadendrene	1443	1437	1510	0.11	0.12	1, MS	
Iso Germacrene D	1445	1440	1668	0.22	0.17	1, MS	
Muurool 3-5-diene-trans	1455	1449	1662		0.18	1, MS	

$\alpha$ -Humulene	1455	1449	1662	0.4	0.41	1, MS	
allo-Aromadendrene	1462	1457	1635	0.59	0.88	1, MS	
7BH,10BH-Cadina-1(6),4-Diene	1460	1467	1773	0.35	0.33	1, MS	
$\gamma$ -Muurolene	1474	1470	1682	1.33	1.26	1, MS	
Germacrene-D	1479	1475	1701	1.08	0.89	1, MS	
$\beta$ -Selinene	1486	1485	1708	0.26	0.9	1, MS	
Selina 3,5 diene	1490	1486	1847		0.24	1, MS	
Ledene	1492	1491	1682	0.52	0.99	1, MS	
$\alpha$ -Muurolene	1496	1493		1.22	1.2	1, MS	
$\alpha$ -Farnesene	1498	1496	1742	0.14	0.52	1, MS	
$\gamma$ -Cadinene	1507	1506	1752	2.02	1.87	1, MS	
<i>cis</i> -Calamenene	1517	1509	1820	0.55	0.39	1, MS	
$\delta$ -Cadinene	1520	1516	1752	3.99	3.38	1, MS	
Zonarene	1521	1518		0.16	0.12	1, MS	
Cadina 1-4-diene	1523	1524	1773	0.26	0.26	1, MS	
$\alpha$ -Cadinene	1534	1528	1896	0.79		1, MS	
$\alpha$ -Calacorene	1527	1528	1903		0.76	1, MS	
$\beta$ -Calacorene	1541	1547	1945	0.17	0.18	1, MS	
Germacrene B	1552	1551	1818		0.27	1, MS	
Caryolan-8 (ol-b-hydroxy-Caryophyllene)		1558	2047	0.16		1, MS	
<b>OXYGENATED SESQUITERPENES</b>							
Elemol	1541	1534	2071	0.1		1, MS	
$\beta$ -Caryophyllene-oxide	1546	1538	1822	1.34	1	1, MS	
Spathulenol	1572	1564	2105	0.84	0.83	1, MS	
Caryophyllene oxide	1578	1570	1982	2.23	1.55	1, MS	
Salvia 4(14)-en-1-one	1592	1578	1992	0.2	0.17	1, MS	<a href="#">König et al. (2001)</a>
Globulol	1589	1581	2052	2.07	3.06	1, MS	
Oplopenone B	1595	1590	2017	1.26	0.83	1, MS	
Ledol	1600	1593	2035	0.94	1.89	1, MS	
1-10-di-epi-Cubenol	1615	1602	2043	0.61	0.28	1, MS	
Muurola-14,10(14)dien-8ol		1613			1.47	1, MS	
Epi-Cubenol	1623	1616	1876	1.45	1.19	1, MS	
$\gamma$ -Eudesmol	1618	1619	2133	2.45	1.63	1, MS	
Caryophylla-4-(14),8(15)dien-5-a-ol	1622	1622	2277	0.96	0.93	1, MS	
Cadin-4-en-7-ol		1629	2069	4.72	1.41	1, MS	
$\tau$ -Cadinol	1633	1631	2171	1.57	4.02	1, MS	
$\tau$ -Muurolol	1633	1631	2171			1, MS	
$\beta$ -Eudesmol	1641	1637	2212	4.49	2.76	1, MS	
$\alpha$ -cadinol	1643	1642	2216	7.48	5.91	1, MS	
$\alpha$ -Eudesmol		1641				1, MS	
14-Hydroxy-9-epi-E-Caryophyllene	1656	1655	2304	0.55		1, MS	
Cadalene	1659	1660	2161	0.54	0.98	1, MS	
Eudesma-4(15)-7-dien-1 $\beta$ -ol	1671	1668	2229	1.38	1.05	1, MS	<a href="#">König et al. (2001)</a>
4- $\beta$ -H-Cadin-9-en-15-al		1677	2175	0.09		1, MS	
Ambrox		1745	2126		0.24	1, MS	
<b>NORISOPRENOIDS</b>							
7,8-Dihydrodro- $\alpha$ -ionone		1396	1794	0.6	0.16	1, MS	
<b>DITERPENE</b>							
<b>HYDROCARBONS</b>							
$\alpha$ -Kaurene	2034	2032	2327	0.69		1, MS	
Valpara-1,5-diene		2055	2679	2.3		1, MS	
<b>LABDANES</b>							
Manoyl oxyde	1996	1981	2347	0.38	4.3	1, MS	
13-epi-Manoyl oxyde	2023	2008	2339	8.08	4.93	1, MS	
15-Nor-Cleroda-3,13E-dien-16-ol		2028			0.16	1, MS	
Sclareol-oxyde		1872	2538	0.35	2.19	1, MS	
13-Oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-7(8)-ene		1969	2555	1.93	1.89	1, MS	
Labda-7,12(E),14-triene	2036	2019	2359	0.28		1, MS	<a href="#">König et al. (2001)</a>
Manool	2070	2041	2640	0.58		1, MS	<a href="#">König et al. (2001)</a>
Labda-7,14-diene-13-ol		2075	2699	2.29	3.3	1, MS	
Sclareol	2231	2208	2547	0.16		1, MS	
<b>PHENOLIC COMPOUNDS</b>							
Methyl-Eugenol	1369	1361			0.23	1, MS	
Total identified				76.68	79.16		

Linear Hydrocarbons	0,9	0,13
No terpenic carbonyl compounds	1,75	0,65
Monoterpene hydrocarbons		5,21
Oxygenated monoterpenes	0,82	3,93
Sesquiterpene hydrocarbons	19,63	20,12
Oxygenated sesquiterpenes	35,27	31,2
Norisoprenoids	0,6	0,16
Diterpene hydrocarbons	2,99	
Oxygenated diterpenes	14,05	16,77

Tabella 10: Composizione chimica degli oli essenziali di *C. creticus* L. subsp. *creticus*, e *C. creticus* L. subsp. *corsicus* raccolti nel 2015

*a II*= indice di ritenzione su colonna polare di letteratura.

*b Ia*= indice di ritenzione su colonna apolare (*Rtx-1*)

*c Ip*= indice di ritenzione su colonna polare (*Rtx-Wax*)

*f MS*= spettro di massa

Composti	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> 2014	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> 2015	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> 2014	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> 2015
$\gamma$ -cadinene	7,67	3,99		3,38
$\tau$ -cadinol	13,63	1,57		4,02
selina-3,11-dien-6- $\alpha$ -ol	4,23		18,04	
selin-11-en-4- $\alpha$ -ol			15,55	
13-oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-8(17)-ene	11,66	1,93	1,46	1,89
malonyl oxide	2,47	0,38	8,17	4,30
13-epi-manoyl oxyde	2,46	8,08		4,93
manool	21,07	0,58	20,26	

Tabella 11: Confronto tra i composti presenti in maggiori quantità in *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *creticus* raccolti in due anni differenti

La composizione chimica dei campioni raccolti nel 2015 è stata studiata utilizzando inoltre la tecnica della micro estrazione in fase solida (HS/SPME). Questa è una tecnica semplice e veloce che non richiede una grande quantità di campione e consente di individuare composti volatili anche quando sono presenti solo in tracce. Nel nostro caso si è rivelata utile nella caratterizzazione della frazione volatile del campione di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto nella stazione di Bonnanaro. Questo campione, iniettato aveva dato un cromatogramma con un'intensità di segnale molto bassa, al di sotto della sensibilità dello strumento.

L'analisi GC-MS ha permesso l'identificazione di 107 composti: 54 in *C. creticus* subsp. *creticus*, 62 in *C. creticus* subsp. *corsicus* e 47 in *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. I risultati sono riassunti nella tabella 12 in base all'ordine di eluizione.

I cromatogrammi delle frazioni volatili delle tre sottospecie sono abbastanza simili e in modo particolare i profili di *C. creticus* subsp. *creticus* e di *C. creticus* subsp. *corsicus*, anche se presentano alcune differenze sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (Fig. 40).

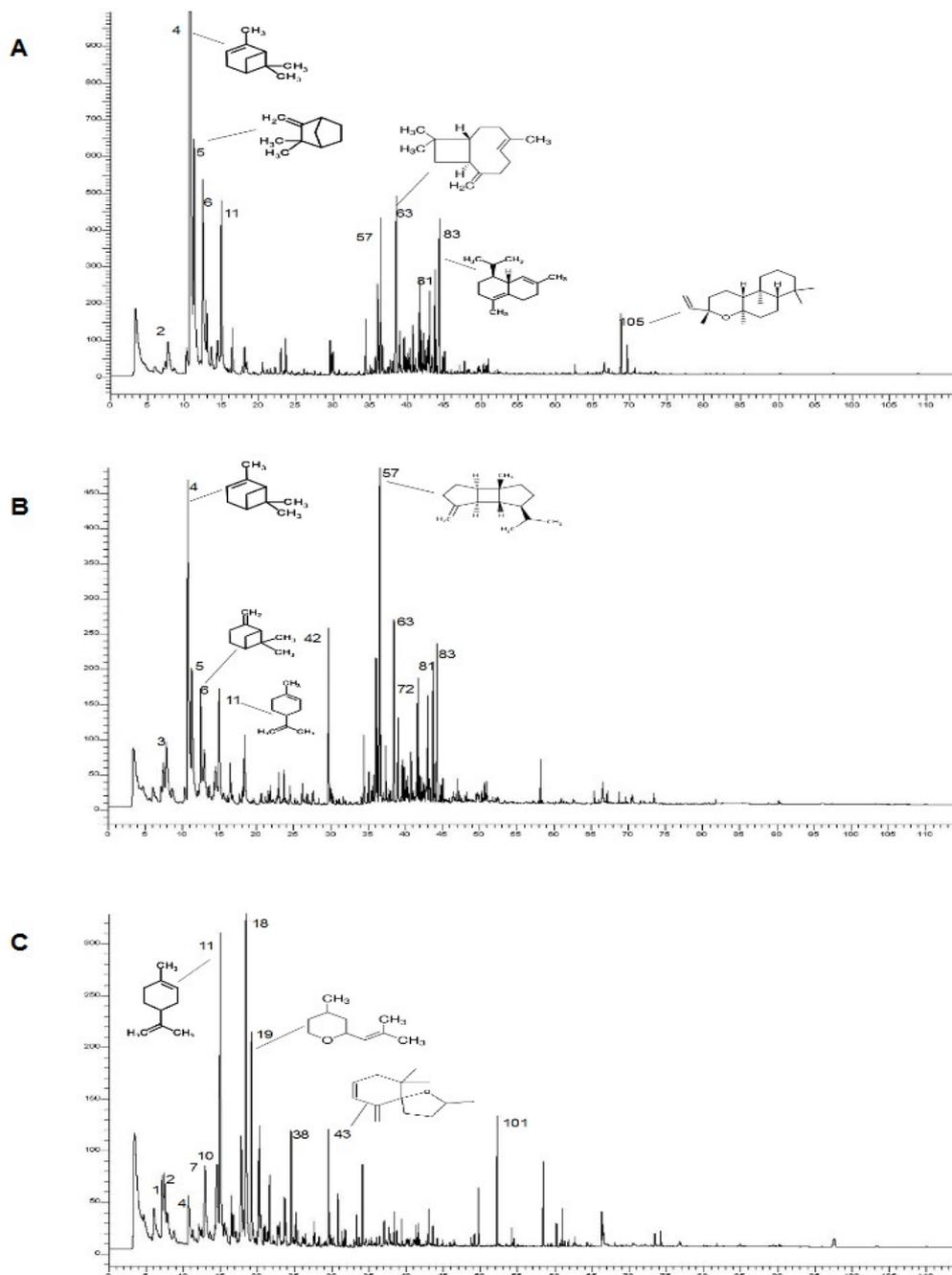


Figura 40: Cromatogrammi GC/MS degli estratti HS/SPME di *C. creticus* subsp. *creticus* (A), *C. creticus* subsp. *corsicus* (B) e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* (C) raccolti nel 2015.

Le frazioni volatili di *C. creticus* subsp. *creticus* e *C. creticus* subsp. *corsicus* sono caratterizzate entrambe da una significativa percentuale di monoterpeni idrocarburici con una predominanza di  $\alpha$ -pinene (24.23% e 17.72% rispettivamente) e di camphene (11.36% e 7.12%). Sono inoltre presenti  $\beta$ -pinene (5.56% e 4.32%) e limonene (5.59% e 3.25%). Un'altra frazione importante è costituita dai sesquiterpeni idrocarburici sia in *C. creticus* subsp. *creticus* sia in *C. creticus* subsp. *corsicus*:  $\beta$ -bourbonene (3.28% e 8.24%),  $\beta$ -cariophyllene (2.9% e 2.98%),  $\gamma$ -cadinene (2.06% e 2.72%) e  $\delta$ -cadinene (3.68% e 3%). Inoltre, solo in *C. creticus* subsp. *corsicus* sono presenti anche bornyl acetate (3.76%) e  $\gamma$ -muurolene (2.14%). Infine sono stati identificati alcuni diterpeni della famiglia dei labdani anche se in bassa concentrazione. In *C. creticus* subsp. *creticus* sono presenti sclareol (0.34%) e 13-*epi*-manoyl oxide (1.15%), mentre in *C. creticus* subsp. *corsicus* labd-7,3-dien-15-ol (0.11%) e manoyl oxide (0.23%).

La frazione volatile di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* è caratterizzata da un'alta percentuale di limonene (12.83%). Tra i monoterpeni idrocarburici sono presenti anche  $\alpha$ -pinene (2.5%), myrcene (2.95%) e *para*-cimemene (4.83%). Questa sottospecie è caratterizzata inoltre da una quantità interessante di composti lineari non terpenici che costituiscono il 25.46% del totale. Tra questi il nonanol (11.09%) è il più rappresentativo seguito da hexenal-2-E, hexen-3-en-ol, 1-hexanol-2-ethyl, decanal e octane. Infine sono presenti i monoterpeni ossigenati rappresentati da

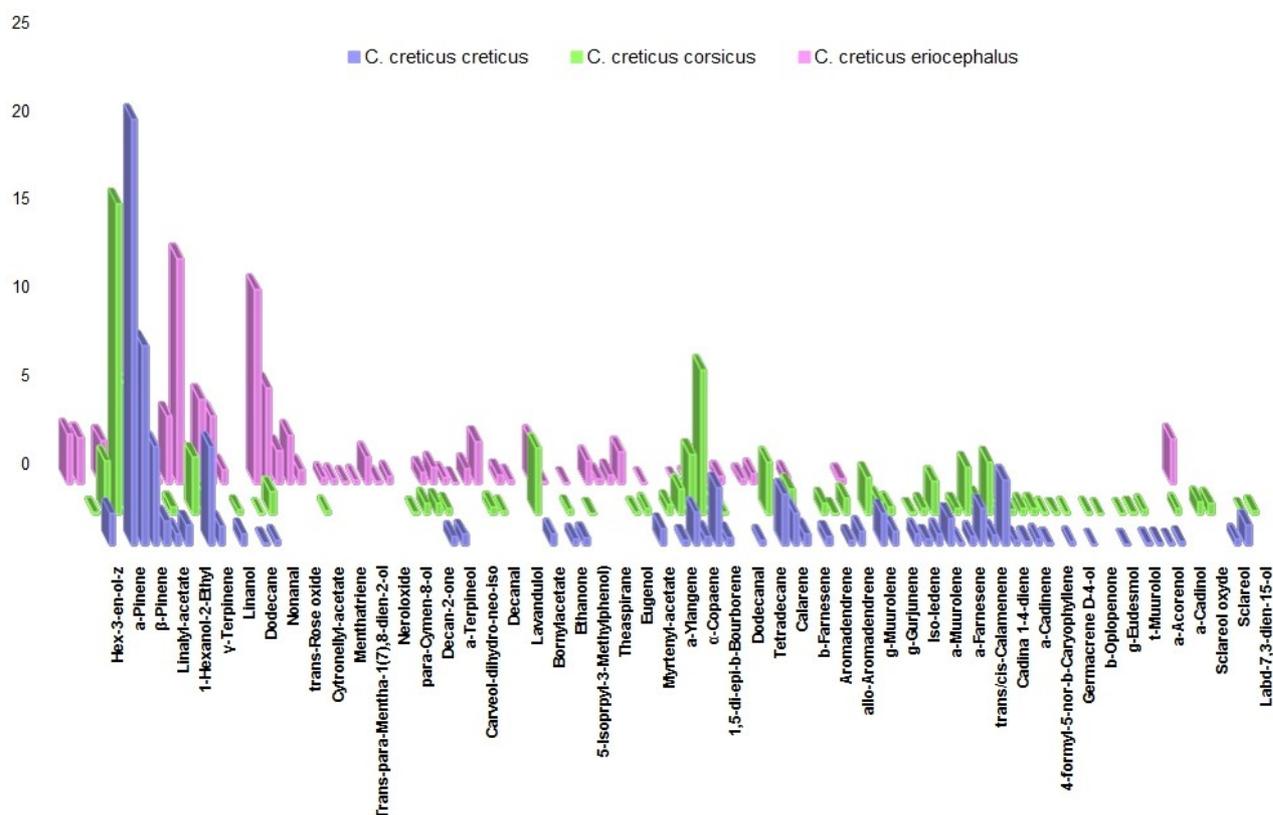


Figura 41: Confronto della composizione percentuale per i principali componenti della frazione volatile delle tre sottospecie di *Cistus creticus* raccolte nel 2015

*cis*-rose oxide (5.51%) e *trans*-rose oxide (1.94%). Sono completamente assenti i composti labdanici, presenti nelle altre due sottospecie.

In figura 41 è riportato un grafico comparativo relativo alla composizione dei tre profili dei composti volatili

Analogamente, i monoterpeni idrocarburici  $\alpha$ -pinene e myrcene risultano essere la frazione principale dei composti volatili identificati in popolazioni di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* originarie della Corsica e del Nord-Sardegna (Paolini et al., 2009) così come l'elevata quantità di composti lineari non terpenici. Nello stesso lavoro sono stati analizzati anche numerosi campioni di *C. creticus* subsp. *corsicus* raccolti in Corsica la cui componente volatile è caratterizzata da un alto contenuto di diterpeni della famiglia dei labdani e di sesquiterpeni idrocarburici.

No	Components	I a	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>
1	Hexenal-2-E	713			2.88
2	Hex-3-en-ol-z	739	1.83	0.13	2.62
3	Hexanol	742		3.07	
4	$\alpha$ -Pinene	840	24.23	17.72	2.5
5	Camphene	856	11.36	7.12	
6	$\beta$ -Pinene	888	5.56	4.32	
7	Myrcene	901	1.38	1.35	2.95
8	Linalyl-acetate	913	0.61		
9	<i>para</i> -Cymene	930	1.11	0.46	0.23
10	1-Hexanol-2-Ethyl	932			3.85
11	Limonene	940	5.59	3.25	12.83
12	$\gamma$ -Terpinene	968	1.08	1.07	1.54
13	<i>para</i> -Cymemene	995			4.83
14	Linanol	1000	0.66		3.87
15	Terpinolene	1001		0.26	0.83
16	Dodecane	1004	0.13		
17	Camphre	1005	0.27	0.05	
18	Nonanal	1006		1.3	11.09
19	<i>cis</i> -Rose oxide	1018			5.51
20	<i>trans</i> -Rose oxide	1034			1.94
21	Nor-3-en-2-one	1036			2.79
22	Cytronellyl-acetate	1039			0.8
23	<i>trans</i> -Pinocarveol	1042		0.2	
24	Menthatriene	1046			0.38
25	Limonene-1,2-epoxide-E	1049			0.31
26	<i>trans</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1053			0.18
27	Nonanol	1055			0.23
28	Neroloxide	1058			1.54
29	Ethyl benzoate	1065			0.16
30	<i>para</i> -Cymen-8-ol	1076			0.46
31	Pinocarvone	1079		0.13	
32	Decan-2-one	1080		0.67	
33	Terpina-4-ol	1081	0.51	0.63	0.68
34	$\alpha$ -Terpineol	1092	0.6	0.39	0.99
35	Nonanol-acetate	1094			0.37
36	Carveol-dihydro-neo-iso	1111			0.12
37	$\beta$ -Cyclocitral	1116			0.91
38	Decanal	1131		0.42	2.45
39	<i>cis</i> -Chrysantenol	1153		0.23	
40	Lavandulol	1154			0.56
41	Lyratol	1156			0.24
42	Bornylacetate	1185	0.63	3.76	
43	Vitispirane	1186			2.49
44	Ethanone	1189	0.36		0.18

45	Undecan-2-one	1191	0.42	0.26	
46	5-Isoprpyl-3-Methylphenol)	1195			0.13
47	Undecanal	1196		0.1	
48	Theaspirane	1204			1.31
49	Formate de Menthyle	1219			0.32
50	Eugenol	1243			0.56
51	Dihydro-Eugenol	1255		0.13	1.82
52	Myrtenyl-acetate	1260	0.96	0.34	
53	$\beta$ -Damascenone	1274			0.1
54	$\alpha$ -Ylangene	1281	0.3	0.55	
55	$\alpha$ -Cubebene	1286	1.87	1.44	
56	$\alpha$ -Copaene	1288	0.5	3.45	0.14
57	$\beta$ -Bourbonene	1293	3.28	8.24	0.16
58	1,5-di-epi-b-Bourborene	1295	0.44	0.82	
59	7,8-dihydro-a-ionone	1302		0.14	
60	Dodecanal	1303			0.45
61	$\alpha$ -Gurjunene	1312	0.29		
62	Tetradecane	1313			0.3
63	$\beta$ -Caryophyllene	1325	2.9	2.98	0.6
64	Calarene	1326	1.78		
65	$\beta$ -Copaene	1333	0.64	1.48	
66	$\beta$ -Farnesene	1340			0.46
67	$\alpha$ -Guaiene	1343	0.52		
68	Aromadendrene	1347		0.69	
69	$\alpha$ -Humulene	1355	0.3	0.1	
70	allo-Aromadendrene	1362	0.78	0.96	
71	$\beta$ -Ionone	1371			0.33
72	$\gamma$ -Muurolene	1377	1.77	2.14	
73	Germacrene D	1380	0.79	0.74	
74	$\gamma$ -Gurjunene	1384		0.42	
75	$\beta$ -Selinene	1385	0.62		
76	Iso-ledene	1389	0.31	0.11	
77	Valencene	1394	0.63	0.39	
78	$\alpha$ -Muurolene	1399	1.54	1.89	
79	$\delta$ -Guaiene	1402	0.1		
80	$\alpha$ -Farnesene	1404	0.48	0.4	
81	$\gamma$ -Cadinene	1411	2.06	2.72	
82	<i>trans/cis</i> -Calamenene	1413	0.57	0.76	
83	$\delta$ -Cadinene	1421	3.68	3.01	
84	Cadina 1-4-diene	1427	0.24	0.26	
85	$\alpha$ -Calacorene	1431	0.22	0.27	
86	$\alpha$ -Cadinene	1433	0.32	0.38	
87	Caryophyllene oxide	1467	0.12	0.37	
88	4-formyl-5-nor-b-Caryophyllene	1473		0.13	
89	Epi-Globulol	1478	0.18	0.12	
90	Germacrene D-4-ol	1484		0.13	
91	1,5-epoxi-Salviol 4(14)diene	1486	0.06		

92	$\beta$ -Oplophenone	1487		0.16	
93	Aromadendrene-oxide	1509		0.09	
94	$\gamma$ -Eudesmol	1514	0.04		
95	Cariophylle-4(14),8(15)-dien-5a-ol	1516		0.08	
96	$\tau$ -Muurolol	1521	0.1	0.17	
97	$\beta$ -Eudesmol	1523	0.16	0.29	
98	$\alpha$ -Acorenol	1529	0.09		
99	Hinesol	1533	0.23		
100	$\alpha$ -Cadinol	1534		0.35	
101	Octane	1557			2.57
102	Sclareol oxyde	1667		0.75	
103	Epiglobulol	1830		0.67	
104	Sclareol	1831	0.34		
105	13-epi-Manoyl oxide	1877	1.15		
106	Labd-7,3-dien-15-ol	1913		0.11	
107	Manoyl-oxide	1975		0.23	
Total identified			86.69	85.35	82,56

Tabella 12: Composti volatili nelle tre sottospecie di *C. creticus* raccolti nel 2015

### 3.1.3 Raccolta 2016 *C. creticus* subsp. *eriocephalus*

L'analisi sulla composizione chimica degli oli essenziali del genere *Cistus* sardo è continuata con uno studio approfondito sugli oli essenziali di sette popolazioni di *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* raccolte in varie aree del territorio regionale.

La ricerca nasce dalla necessità di fare chiarezza sui dati discordanti ottenuti negli anni precedenti sulla presenza/assenza di olio essenziale in campioni di questa sottospecie di *C. creticus* raccolti a Cala Gonone (2014) e Bonnanaro (2015). Come è stato spiegato precedentemente anche i dati di letteratura non ci hanno permesso di chiarire questo punto (Paolini et al. 2009; Maggi et al. 2016).

L'obiettivo dell'ultima parte di questa ricerca di dottorato è di studiare la variabilità della composizione chimica dei composti volatili di diverse popolazioni di *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* e individuare, se possibile, dei ecotipi/chemotipi all'interno di questa sottospecie.

L'inquadramento tassonomico dei *Cistus* a fiori rosa della Sardegna, ad eccezione di *Cistus albidus*, è stato oggetto di continue variazioni. Il complesso *C. eriocephalus/creticus/corsicus* è costituito da entità con esemplari spesso difficilmente distinguibili tra loro. Esistono, infatti, forme intermedie di cui è difficile accertare se siano da considerare nell'ambito della variabilità propria della specie, oppure se si tratti di ibridi.

Lo studio chemiotassonomico è la via scelta per capire l'origine della variabilità riscontrata. I

dati chimici, infatti, spesso si sono rivelati utili per fare fronte alla difficoltà che si può incontrare nella classificazione delle specie basata esclusivamente su dati morfologici, anche se analizzare un particolare metabolita secondario per scopi tassonomici senza tenere conto degli eventuali stress che la specie in oggetto sta subendo può portare alla sottostima o alla sovrastima di un particolare metabolita.

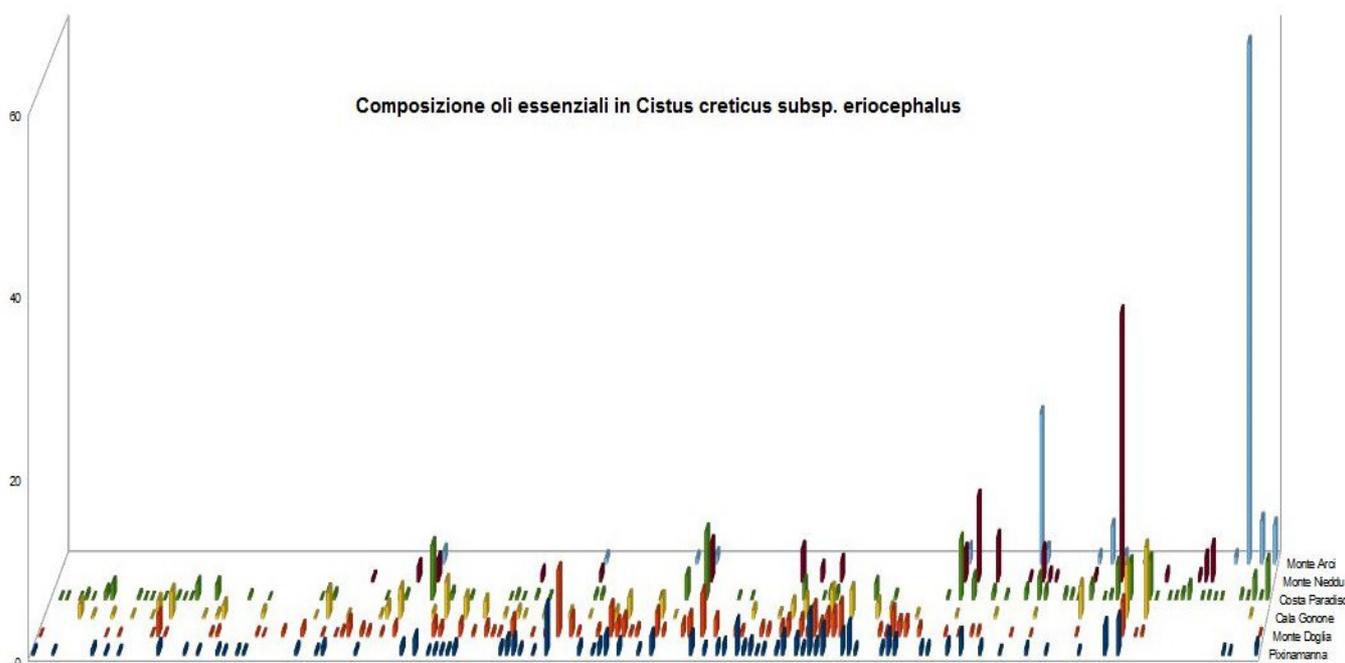


Figura 42: Confronto composizione degli estratti ottenuti per idrodistillazione di diverse popolazioni di *C. creticus subsp. eriocephalus*

Nel 2016 sono state individuate sette stazioni di raccolta sparse sul territorio isolano così come descritto nel paragrafo 2.3. Gli oli essenziali sono stati ottenuti per idrodistillazione delle parti aeree di *Cistus creticus subsp. eriocephalus* con una resa compresa tra il 5.05 mg/100g (Pixnamanna) e il 128.70 mg/100g (Monte Arci) in peso fresco; il campione raccolto in prossimità di Bonannaro non ha prodotto olio essenziale confermando i dati ottenuti l'anno precedente sul campione raccolto nella stessa stazione.

Le differenti rese percentuali ottenute dalle sette popolazioni prelevate da diversi siti geografici possono essere dovute a vari fattori sia ecologici (Demetzos and Perdetzoglou, 1999; Demetzos et al., 2002a) come le radiazioni solari o la difesa contro gli attacchi degli insetti e dei

parassiti, sia geografici come la tipologia del suolo (Robles and Garzino, 2000) così ancora come le microcondizioni ambientali. Per quel che riguarda la resa particolarmente elevata ottenuta dall'estrazione del campione di Monte Arci, la successiva analisi GC/MS ha messo in luce che l'estratto è costituito esclusivamente da cere. Il campione con la resa più interessante è quello raccolto nella stazione di Monte Doglia (37.60 mg/100g del peso fresco) all'interno del Parco di Porto Conte nella parte nord occidentale dell'Isola.

L'analisi qualitativa e quantitativa degli oli essenziali, condotte per via GC/MS, ha permesso di identificare e caratterizzare 185 composti con percentuali che vanno dal 73.15% al 99.97% della composizione totale (Fig. 42). I risultati sono riportati nella tabella 13 dove i composti identificati sono elencati in ordine di eluizione (cfr. parte sperimentale paragrafo 2.5.1.1) e divisi in classi in base alla loro struttura chimica (Fig. 43).

Components	Pixinamanna	Monte Doglia	Cala Gonone	Costa Paradiso	Monte Nieddu	Monte Arci	ID <sup>a</sup>	References
<b>LINEAR HYDROCARBONS</b>								
Dodecane				0.17			St	
Tridecene				0.08			St RI, MS	
cis-3-Tetradecene				0.08			MS	
Heicosadiene						16.84	St	
Heneicosane				0.75			St	
Tricosane						0.85	St	
Tetracosane	0.36			0.55		58.28	St	
Eicosane						0.37	St	
Pentacosane			0.35	2.58		4.85	St	
Hexacosane				0.30			St	
Heptacosane	1.23	0.20		4.36		4.40	St	
<b>NO TERPENIC CARBONYL COMPOUNDS</b>								
Nonanal			0.19	0.11			St	
Decanal				0.20			St	
Decanol				0.11			St	
2-Undecanone			0.36				St	
Tridecane	0.81			1.08			St	
2-Butanone, 4-(2,6,6-Trimethyl-2 cyclohexen-1-yl)-			0.27	1.88			RI, MS	
Undecanal				0.11			St	
Undecenal				1.91			St	
Tetradecane	0.49			1.88			St RI, MS	
Pentadecane, 7-methyl			0.09	0.43			St	
Dodecenal				0.09			St	
Dodecanol				1.07			St	
Undecanoic acid			0.33		0.46		St RI, MS	
2-Tridecanone				0.19			St	
Pentadecane	2.08			0.68			St	
Tridecanal	0.77			6.23	2.62	1.43	St	
Dodecanoic acid				0.48	1.13		St RI, MS	
Tridecan-1-ol				0.71			St	
Hexadecene				0.22			MS	
Hexadecane	2.17			2.83		0.66	MS	
Tetradecanal				7.72	4.43	1.03	MS RI, MS	
Tridecanoic acid				2.04			MS RI, MS	
Cyclotetradecane				1.92			St	
Heptadecane	1.33		0.26	0.33			MS	
Pentadecanal	2.37			6.75	3.61	1.75	RI, MS	<u>Nivinsliene, Butkiene, et al., 2007</u>
Tetradecanoic acid				2.53	9.51		MS RI, MS	
Octadecane				0.50	0.50		St	
Hexadecanal	0.84	0.10	0.41	1.18	3.65		MS	
Perhydrofarnesyl acetone				2.54	0.97	1.70	St	
Pentadecanoic acid				1.17			RI,	
Hexadecanol				0.75				

Nonadecane				0.54			MS RI, MS
Tridecane-2 methyl	0.41			0.16	0.76		MS
Heptadecanal				1.75		0.86	MS
Heptadecanoic acid				0.20			St RI, MS
Octadecanol				0.22			MS RI, MS
Octadecanoic acid				0.08			MS RI, MS
Nonadecanol				0.11			MS RI, MS
1-Docosanol				0.27			MS
Tetradecanal	2.17			7.72	4.43	1.03	St
<b>OXIGENATED MONOTERPENES</b>							
Linalool	0.43						RI, MS
$\alpha$ -Terpineol	0.45	0.10					RI, MS
Chavicol	0.40						RI, MS
Piperitone		0.23					RI, MS
<b>SESQUITERPENE HYDROCARBONS</b>							
$\alpha$ -Cubebene		0.13	0.53				St
$\alpha$ -Ylangene			0.10				St
$\alpha$ -Copaene		0.21	2.07	0.11			St
$\alpha$ -Bourbonene		2.51					St RI, MS
$\beta$ -Bourbonene	1.18	0.26	3.05	0.34			MS RI, MS
$\beta$ -Elemene				0.16			MS
$\beta$ -Ylangene		0.40	0.45				St
$\beta$ -Cariophyllene		0.59	1.55				St
(Z)-Cariophyllene	0.64						St
$\alpha$ -Gurjunene	0.43						St
$\alpha$ -Cedrene	0.52						St RI, MS
Thujopsene	0.44						RI, MS
$\beta$ -Copaene		0.36	0.80	0.07			RI, MS RI, MS
trans- $\alpha$ -Bergamotene		0.12					MS RI, MS
$\alpha$ -Himalachene		0.63					MS
Alloaromadendrene	0.80	1.09					St RI, MS
$\gamma$ -Muuroolene	0.51	0.29	2.92	0.63			MS
$\alpha$ -Curcumene	1.14	1.80					St
D-Germacrene		0.15					St RI, MS
$\alpha$ -Amorphene		0.57	0.30				RI, MS RI, MS
$\alpha$ -Zingiberene	0.58	0.93					MS RI, MS
Valencene		0.39	1.40				MS RI, MS
$\alpha$ -Muuroolene		1.18	3.31	0.55			MS

$\alpha$ -Bulsene			0.69		RI, MS
$\gamma$ -Cadinene	0.64	1.12	4.13	0.82	RI, MS
Selinene-7-epi-a	0.64				RI, MS
$\delta$ -Cadinene	1.10	1.51	2.42	0.37	RI, MS
$\alpha$ -Sesquiphellandrene					RI, MS
$\beta$ -Sesquiphellandrene		0.50			RI, MS
trans-Calamenene			1.98		RI, MS
Selina, 4-(15), 7-11-diene		0.49			RI, MS
$\alpha$ -Cadinene		0.41	0.48	0.10	RI, MS
cis-Calamenene	0.96			0.54	RI, MS
$\alpha$ -Calacorene	1.77	1.93	0.85	0.13	RI, MS
$\beta$ -Calacorene	1.88		0.29		RI, MS
Germacrene B		7.49			RI, MS
9-methoxy calamenene			0.65		RI, MS
Naphtalene, 1,2,3,4-tetrahydro-6,7 dimethyl		2.23			RI, MS
Cadalene	0.92	0.51	1.13	0.50	RI, MS
<b>OXYGENATED SESQUITERPENES</b>					
Epi-Cubebol		0.63			RI, MS
Shyobunone	0.43	1.63			RI, MS
epi-Shyobunone	0.58				RI, MS
cis-Neridol		1.23			RI, MS
Elemol		0.27			RI, MS
isoaromadendrene epoxide	0.45		0.52	0.34	RI, MS
Copaen-4- $\alpha$ -8-ol		0.77			RI, MS
Longicamphenylone	5.43				RI, MS
Bourbonanone>1>nor		0.43			RI, MS
Cedrene epoxide a	0.52	0.78			RI, MS
Acorenone	1.32				RI, MS
Spathulenol	2.28	3.39	0.76		RI, MS
Turmerol>ar>		1.65			RI, MS
Cariophyllene oxide	1.34	2.14	2.42		St
Globulol		0.47			St
Thujopsan-2- $\alpha$ -ol		0.84			RI, MS
Gleenol	0.64				RI, MS

Loizzo et al., 2013

Viridiflor	2.29	2.73	2.36			St
Isoshyobunone			1.23			RI, MS
Alloaromadendrene epoxide			0.18			RI, MS
Guaiol		1.49				St
Oplophenone B		2.28				RI, MS
Isolongifolanone		4.97				RI, MS
Bisabolol-11-ol Z	0.86					RI, MS
Cubenol-1,10-di-epi		2.05				RI, MS
Isolongifolanone trans	1.13					RI, MS
Longifenolaldeide	1.29			0.30		RI, MS
Cubenol-1-epi						RI, MS
Ledene oxide (II)						RI, MS
$\gamma$ -Eudesmol	1.06		0.99			RI, MS
<i>cis</i> Cadin-4-en-7 ol	1.43					RI, MS
$\beta$ -Acorenol	0.45	1.11				RI, MS
Dehydroxy-isocalamediol	0.71	0.87				RI, MS
Cadina-7-en-7-ol trans			0.47			RI, MS
Aromadendrene oxide	0.82	1.22				St
$\tau$ -Cadinol	2.24	1.91	1.76		3.78	RI, MS
$\tau$ -Muurolol	1.95	1.96	2.26		1.68	RI, MS
$\alpha$ -Muurolol	0.90	0.98	0.93			RI, MS
Cubenol	4.64	3.38		0.20		RI, MS
$\beta$ -Eudesmol	1.35	1.54		1.01		RI, MS
$\alpha$ -Cadinol	3.08	2.59	3.27	0.87	2.33	RI, MS
Bisabolol oxide-B- $\alpha$		2.74				RI, MS
Selin-11-en-4-a-ol		3.68				RI, MS
Eudesmol dihydroxy	2.46		3.22			RI, MS
Eudesmol-7-epi- $\alpha$	3.37					RI, MS
Intermedeol	0.76					RI, MS
Calamenen-10-ol-trans			1.77			RI, MS
Bulnesol		0.84				RI, MS
Occidentalol acetate	2.38	2.95				RI, MS
Epi- $\alpha$ -Bisabolol	1.80	1.78				RI, MS
5-neo-Cedranol		1.78				RI, MS
Ledene oxide			0.35			RI,

[Su, Ho, et al., 2006](#)

Eudesma-4(15)-dien-1- $\beta$ -ol		1.04					MS RI, MS
Acorenone	1.00						RI, MS
Acorenone B	0.90						RI, MS
Humulene-14 hydroxy $\alpha$ Ambroxide		0.39		0.44			MS St
<b>NORISOPRENOIDS</b>							
Dehydro- $\alpha$ -ionene	0.41		0.26	0.44			RI, MS
<b>DITERPENE HYDROCARBONS</b>							
Abietatriene					1.01		RI, MS
<b>OXYGENATED DITERPENES</b>							
Sclareol oxide Phytol		0.29	3.65			4.27	RI, MS St
Dihydromanoyl oxide	0.53			0.50			RI, MS
Manoyl oxide	0.04	3.93	6.00	4.22			RI, MS <u>Demetzos et al., 2002</u>
13-epi-manoyl oxide Manool Sclareol		0.44	7.97	4.54 0.14 1.59			MS St St <u>Demetzos et al., 2002</u>
<b>FATTY ACIDS</b>							
Palmitic acid	3.46			4.06	30.08	0.97	St
Linoleic acid				0.20	2.85		St
Linolenic acid				0.34	4.04		St
<b>ESTERS</b>							
Bornyl acetate 3-Hexen-1-ol, benzoate (Z)			1.68 0.21	0.59 0.56		1.25 0.68	St RI, MS <u>Hazzit, Baaliouamer, et al., 2006</u>
(E,E)-Farnesyl acetate		0.56					RI, MS
Benzyl benzoate Geranyl benzoate Benzyl salicylate Homosalate (benzoic acid 2 hydroxy)	1.06			1.01	5.03 1.20 0.55		St St St RI, MS <u>Su, Ho, et al., 2006</u>
<b>OTHERS</b>							
Eugenol				0.12			St
Tetrahydrofuran, 2 propyl	0.43						MS RI, MS
Methyleugenol 2-Butanone, 4-(2,6,6-Trimethyl- 2 cyclohexen-1-yl)-	0.58		0.27				RI, MS RI, MS
Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethyl)					1.87		RI, MS <u>Yu and Zhang, 2010</u>
2-Methyladamantane		0.28					RI, MS RI, MS
Salicylate Z, ethylexyl	0.42						RI, MS
2,3,4-Trimethylpyrrole Geranyl linalool		0.22 0.17					RI, MS RI,

						MS
g-Palmitolactone					0.76	St
Total identified	91,88	93,6	73,15	93,01	88,5	99,97
Linear Hydrocarbons	1.59	0.20	0.35	8.87		85.59
No terpenic carbonyl compounds	13,44	0,1	1,72	58,69	32,07	8,46
Oxygenated monoterpenes	1.28	0.33				
Sesquiterpene hydrocarbons	14.15	27.80	29.10	4.32		
Oxygenated sesquiterpenes	48.80	59.28	21.94	2.72	7.79	
Oxygenated diterpenes	4.68	4.66	17.62	11.09		4.27
Fatty acids	3.46			4.60	36.97	01.37.00

Tabella 13: Composizione chimica degli estratti per idrodistillazione di *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto in differenti stazioni della Sardegna nel 2016

a: **ID** Metodi di identificazione: **MS**, dal confronto con lo spettro di massa con quelli librerie Adams, Nist 11 e interpretazione dei frammenti degli spettri di massa. **RI**, dal confronto dell'indice di ritenzione con quelli riportati in letteratura. **Std**, dal confronto con il tempo di ritenzione e lo spettro di massa di standard autentici a nostra disposizione.

In tutti gli oli essenziali analizzati sono completamente assenti i monoterpeni idrocarburici che invece erano stati riscontrati nel campione di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto a Cala Gonone nel 2014, anche se in quantità non rilevanti (0.85%). I monoterpeni ossigenati sono presenti ma in percentuale limitata.

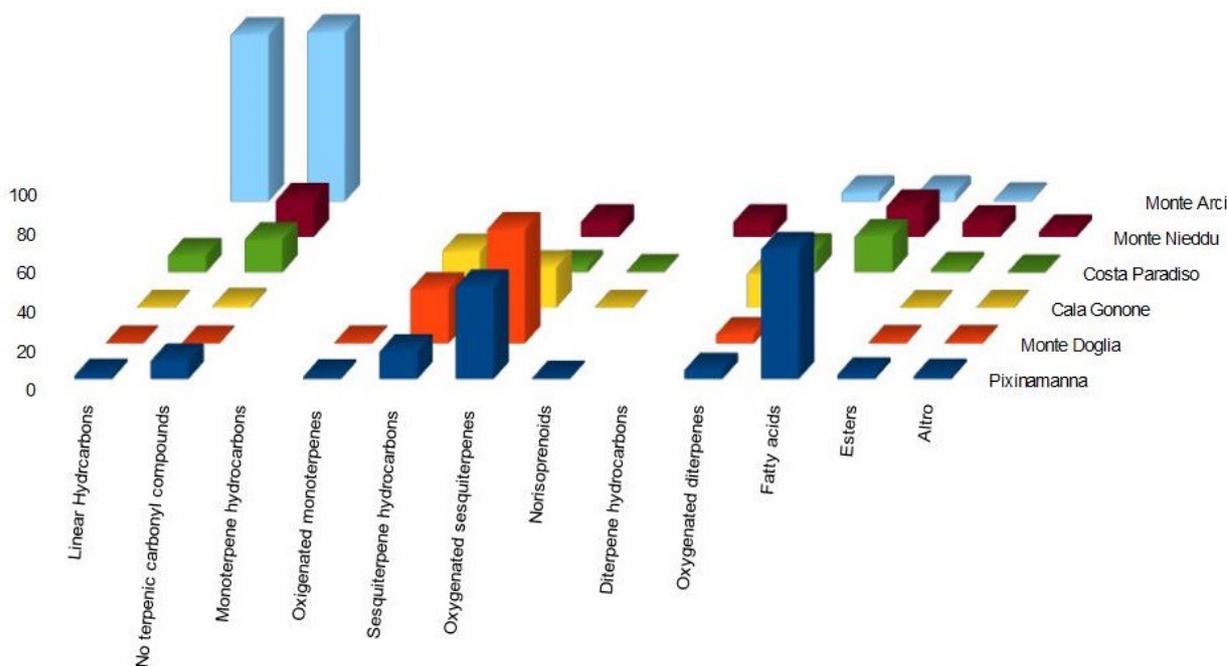


Figura 43: Composizione frazione volatile divisa per classi di composti in diverse popolazioni di *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*

I distillati in corrente di vapore proveniente dalla biomassa del cisto raccolto nelle stazioni di Cala Gonone, Pixinamanna e Monte Doglia presentano un contenuto significativo di monoterpeni ossigenati, idrocarburi sesquiterpenici, sesquiterpeni ossigenati e diterpeni ossigenati, componenti tipici degli oli essenziali (percentuali del 69, 91 e 68% rispettivamente). Il distillato del cisto proveniente da Monte Arci presenta oltre l'85% di idrocarburi lineari e solo il 4% di componenti tipici degli oli essenziali.

I distillati del cisto proveniente da Costa Paradiso e da Monte Nieddu, presentano una grande percentuale di composti carbonilici e carbossilici di natura non terpenica (rispettivamente il 63 e il 69%) e solo il 28 e l'8% di composti terpenici. Ad eccezione del campione raccolto a Monte Arci, in tutti gli altri campioni è stata rilevata la presenza di  $\alpha$ -cadinol in concentrazioni abbastanza simili. Questo composto è considerato un marker per le piante cresciute in suoli calcarei come riportato da Robles e Garzino (2000) in uno studio su piante della Provenza (Francia del sud) cresciute in suoli calcarei o silicei. E' interessante la presenza di  $\alpha$ -cadinol riscontrata in alcuni dei campioni di questa ricerca che provengono invece da terreni con substrato siliceo come Pixinamanna, Costa Paradiso e Monte Nieddu.

In conclusione sembra che solo il cisto raccolto nella stazione di Bonnanaro, che risulta isolato da altre popolazioni, non contenga per niente olio essenziale e/o prodotti distillabili in corrente di vapore. Il Cisto di Monte Arci sembra ricco di cere e di idrocarburi lineari, mentre nelle altre stazioni è probabile che ci sia stata contaminazione da parte di cultivar diverse, anche

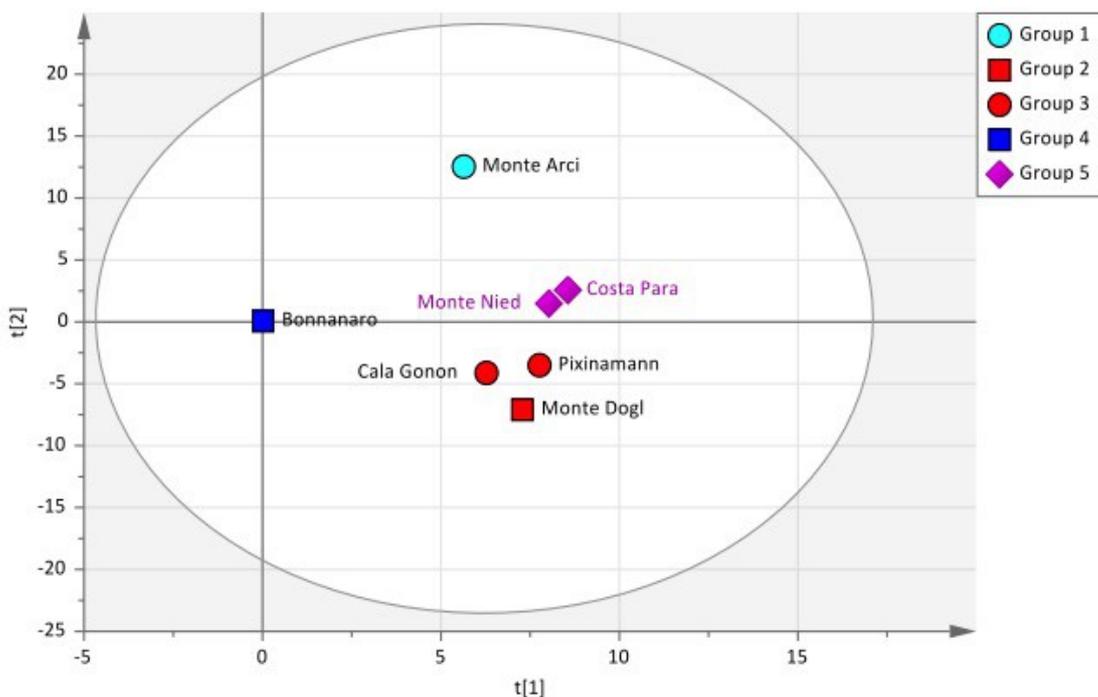


Figura 44: Analisi PCA dei campioni di *C. creticus eriocephalus* raccolti nel 2016

se Monte Nieddu e Costa Paradiso presentano una piccolissima porzione di composti potenzialmente componenti oli essenziali (Fig. 44). Cala Gonone, Monte Doglia e Pixinamanna sono località in cui si possono ritrovare, nella macchia mediterranea, molte specie di cisto differenti, per cui è ipotizzabile un'ibridizzazione tra le cultivar.

A questo punto sarebbe interessante approfondire lo studio con una indagine genetica che potrebbe finalmente chiarirebbe la situazione tassonomica di questa sottospecie.

## **3.2 Frazione fenolica**

La frazione polifenolica delle *Cistacee*, riveste una notevole importanza per le sue caratteristiche antiossidanti e antibatteriche, come descritto in alcune pubblicazioni (Kupeli and Yesilada, 2007; Barrajon-Catalán et al., 2011; Mahmoudi et al. 2016; Rebaya et al., 2016), nonostante ciò sono pochi i lavori scientifici apparsi in letteratura fino a oggi. Per quanto riguarda il Cisto sardo, non sono conosciuti studi sull'argomento. Nella presente tesi di dottorato viene proposta per la prima volta l'analisi delle frazioni fenoliche di tutte le specie e sottospecie di Cisto vegetanti in Sardegna. Le parti aeree della pianta sono state estratte utilizzando diverse modalità e la caratterizzazione della composizione chimica degli estratti ottenuti è stata realizzata con l'impiego di HPLC-DAD-ESI-MS/HPLC-DAD-ESI-MS (cfr. paragrafi 2.5.2.1/2.5.2.1).

### **3.2.1 Raccolta 2014**

Nel 2014 è stata effettuata una ricognizione su le possibili stazioni di raccolta e dopo la loro individuazione sono stati prelevati campioni significativi di tutte le specie e sottospecie di *Cistus* presenti in Sardegna, che sono state estratte utilizzando la tecnica della macerazione a freddo in metanolo acidificato, seguita da una ripartizione in solventi a differente polarità per semplificare la lettura dei cromatogrammi e permettere una più semplice identificazione dei composti (cfr. paragrafo 2.4.3.1).

I risultati, che hanno portato all'identificazione di 72 costituenti fenolici, sono riportati in tabella 14.

Peak n.	Compound identification	R <sub>t</sub> (min.)	MW	Fragment (m/z)	Cistus salvifolius	Cistus monspeliensis	Cistus albidus	Cistus creticus	Cistus creticus corsicus	Cistus creticus eriocephalus
1	3-O-methylrosmarinic acid	2,5	375	517-500-375-	++	++	+	++	+	++
2	3-Caffeoyl quinic acid	2,9	353	359-343-217-201 377 [M+Na]-355 [M+H]-192-191- 179	--	--	+	--	--	--
3	Feruloyl quinic acid	3,1	368	391[M+Na+H]- 367-353-191-173	++	tr	--	++	++	++
4	Methoxy dihydroferuloyl methyl rosmarinic acid	3,2	582	582-553-523- 391-375-361- 197-173	--	--	+	++	--	--
5	Dihydroxy-dihydro feruloyl methyl rosmarinic acid	4,1	585	585-553-523- 391-359-173	++	+	+	++	+	++
6	Feruloyl dimethyl rosmarinic acid	4,4	564	565[M+H]-403- 241-191-173	--	+	+	--	--	--
7	<i>para</i> -Hydroxy benzil rosmarinic acid	4,5	536	537-481-375- 167-134	--	+	+	--	--	--
8	Feruloyl rosmarinic acid	4,9	537	537-481-375- 167-134	--	--	--	+	+	++
9	5- Caffeoyl quinic acid	5,8	354	354-191	--	--	--	--	++	++
10	Caffeoyl quinic acid glucoside	6,1	515	515-353-191-170	+++	++	--	--	--	--
11	Quercetin 3-O-glucoside	8,1	464	485[M+Na-H]- 386-323-191-170	++	+	+	--	+	+
12	Syringyl shikimic acid dimer	8,8	526	549 [M+Na] -347-173	++	++	+	++	++	++
13	5-O-caffeoylquinic acid glucoside	9	515	516[M+H]-353- 319-222-191-132	--	--	++	--	--	--
14	Shikimic acid dimer	9,3	346	347[M+H]-173	+++	++	++	--	++	++
15	Galloyl glucose	11,2	330	353 [M+Na] -290-185-169	++	++	++	+	+	--
16	Quercetrin (quercetin-3-O-rhamnose)	11,8	448	471[M+Na] -390- 367-353-171-133	++	+++	--	++	++	++
17	Quercetin-O-pentoside	13,3	433	433-345-195	--	--	--	tr	--	--
18	Caffeoyl quinic glicoside	14	514	538 [M+Na+H] -515-390-353	+++	++	++	++	++	++
19	Ligstroside	14,3	524	524-471-360- 295-271-235	--	--	++	--	+	++
20	Prunina (naringenin 7-O-glucoside)	14,3	434	433 [M-H]- 295- 271-234-191	--	--	--	++	--	--
21	Feruloyl quinic glucoside	14,8	529	529-391-352- 317-197-171	++	++	++	--	++	++
22	Galloyl glucuronide	15,0	346	346-295-271- 235-199	--	--	--	++	++	++
23	Oleuropein	15,3	540	541 [M+H]-433- 397-391-153	++	--	--	+	--	--
24	Caftaric acid	15,5	312	312-195-169-153	--	--	+	--	--	--
25	Kaempferol-3,7-O-diglucoside	15,5	610	610-447-238- 195-153	--	--	--	--	+	--
26	Feruloyl caffeic acid	15,4	356	357[M+H]-261- 195-153	++	--	--	+	--	--
27	Rosmarinic acid	15,6	360	360-279-153-151	--	++	--	--	--	--
28	Myricetin-O- galloyl-hexoside	17,7	632	631 [M-H]- 397- 346-204-190-149	+++	++	++	++	++	++
29	3p-dihydro-coumaroylquinic acid	18,5	338	362 [M+Na+H]- 337-261-183	++	+	+	++	++	++
30	Siringyl quinic acid	18,6	375	397 [M+Na]- 375-191-183	--	--	--	--	++	++
31	Myricetin di-hexoside	19,4	642	642-403-279- 191-160	--	--	--	+	--	--
32	Quercetin 3,4-diglucoside	21,2	625	648 [M+Na]-323- 197-137	--	+	+	--	--	--
33	3-Hydroxyflavone	21,2	238	261 [M+Na]- 243-137	--	--	--	--	--	--
34	Dicafeoyl shikimic acid	20,9	498	499[M+H]-333- 261-179-153	++	--	--	+	++	++
35	Quinic acid	21,9	190	191[M+H]- 177	--	++	++	+	--	--
36	Proanthocyanidin dimer (procianidina B <sub>3</sub> )	24,9	578	579 [M+H]- 569- 451-191	--	--	--	+	--	--
37	Epicatechin methyl gallate	25,3	455	437 [M-H <sub>2</sub> O] - 261-167	+++	--	--	+	++	++

38	4,3',4'-Trimethyl catechin	25,5	332	(332)- 195-167-152	--	++	++	--	--	--
39	Salvianolic acid G	26,8	339	339-261-187-167	+++	--	--	+	+	--
40	3,3' di-O-Methyl ellagic acid 4-O-β-D-(2" acetyl) glucoside	26,9	534	558 [M+Na+H]-541-469-401-283-171	--	++	--	--	--	--
41	6'-O-Sinapoyl sucrose	26,9	548	571[M+Na]- 197-163-135	--	++	--	--	--	--
42	Luteolin 7-O-rutinoside	27,3	594	593 [M-H] – 542-197	+++	++	++	+	--	++
43	3' Methoxyquercetin-3-O-galactoside	28,6	478	501[M+Na+H]-321-261-167	+++	--	--	++	++	++
44	3' Methoxyisorhamnetin glucoside	28,7	510	532[M+Na]-50-239195-167	--	--	--	--	++	++
45	Pelargonidin 3-O-(6"malonyl)glucoside	31,5	519	541[M+Na-H] – 171	++++	--	++	++	--	--
46	Luteolin 7-O-(6"-malonyl)glucoside	32	534	557[M+Na]-387-191-176	++	++	--	++	++	--
47	Glycitin 6"-O-malonate	32,1	532	533[M+H]- 501-439-191-176	--	++	+	--	--	--
48	Diosmina	33,6	608	630 [M+Na] -387-265-221	--	--	--	tr	++	++
49	Cyanidin 3-O-glucoside	33,9	484	483[M-H] 301-261-153	+++	--	--	++	++	++
50	Procianidin	35,7	560	560 -421-385-260-157	+++	++	+	+	++	++
51	3-Sinapoyl quinic acid	36,3	399	399	--	++	--	--	--	--
52	Olivil 9-O-β-D-xyloside	36,3	508	508-418-399	++	--	--	--	--	--
53	Petunidin 3-O- glucoside	37,7	479	501[M+Na-H]-371-247-153	++	--	--	++	++	++
54	Ferulic acid oligomer	38,6	194	195 [M+H] -165	--	++	+	--	--	--
55	7-Arabinosyl kaempferol	40,1	418	417 [M-H] -301-261	--	++	--	--	--	--
56	Quercetin 3-O-(6"malonyl) glucoside	40,5	550	548[M-H <sub>2</sub> ] -371-301-247	--	--	--	--	++	++
57	Rutina (quercetin 3-O-rutinoside)	40,8	610	635[M+Na+H]-427 -333—301-261	++++	++	++	++	++	++
58	Myricetin 3-O-rutinoside	42	627	649[M+Na]-631-375-315-301	++	--	++	++	++	++
58	Quercetin 3-O-acetylramnoside	44,4	490	512 [M+Na]-301-196	--	--	--	+	--	--
60	Hydroxyferulic acid rhamnoside	45,3	357	381[M+Na+H]-261	--	--	--	tr	--	--
61	Apigenina 7-O-diglucuronide	47,9	622	646 [M+Na+H]-421-385-231-176	--	--	--	tr	--	--
62	Cyanidin 3-O-(6"succinyl)glucoside	48,3	549	549-439-247-189-171	--	--	--	+	--	--
63	Oenin (malvidin 3-O-glucoside)	48,4	492	493[M+H]- 301-197-177	++	--	--	--	--	--
64	Eriodictyol glucoside	48,7	450	451[M+H]-415-226-197	--	--	--	tr	--	--
65	Sinapic acid	48,9	224	225[M+H]	--	--	--	--	+	+
66	Peonidin 3-O-(6"-O-malonyl)glucoside	49,4	549	549 -301-299-247-189-171	--	--	--	+	--	--
67	Petunidin	49,4	317	341[M+Na+H]-317-301-299-178	++	--	--	--	--	--
68	Cyanidin 3-O-(6" dioxalyl) glucoside	49,5	592	614 [M+Na] -317-299-195-187	--	++	--	--	--	--
69	Peonidin 3-O-(6"-p-coumaroyl) glucoside	50,6	609	631[M+Na]-593-465-301	++	--	--	--	--	--
70	Kaempferol 3-O-(6"-O-malonyl)glucoside	51,7	536	559[M+Na]- 539-526-245	--	--	--	++	++	++
71	Cynarina (1.3 Dicafeoylquinic acid)	52,2	516	517[M+H]-483-303-201	++	++	--	--	++	++
72	Quercitin	58,8	301	301-285	++	++	--	++	++	++

*Tabella 14: Dati analitici e stima semiquantitativa dei maggiori composti presenti nei diversi estratti delle specie di Cistus sardo, identificati con HPLC-DAD-ESI-MS. Presenza dei composti: -, assenza; +++++, area > 30000; +++, 30000 > area > 15000; ++, 15000 > area > 1000; +, 1000 > area > 100; tr, area < 100;*

### 3.2.1.1 *Cistus creticus* ssp

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo commentare la presenza dei composti fenolici nel Cisto sardo iniziando con l'analisi delle tre sottospecie di *Cistus creticus* che richiedono un discorso a parte.

I cromatogrammi delle tre sottospecie di *C. creticus* si presentano molto simili e in modo particolare i profili di *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* sono quasi sovrapponibili.

Nella tabella 15 sono indicati i dati MS e i tempi di ritenzione dei composti individuati nelle tre sottospecie di *C. creticus*.

Peak n.	Compound identification	Rt (min.)	MW	Fragment (m/z)	<i>Cistus creticus creticus</i>			<i>Cistus creticus corsicus</i>			<i>Cistus creticus eriocephalus</i>			4	5	6
					Bu-OH	Ac-ET	H2O	Bu-OH	Ac-ET	H2O	Bu-OH	Ac-ET	H2O			
					4a	4b	4c	5a	5b	5c	6a	6b	6c			
1	3-O-methylrosmarinic acid	2.5	375	375-359-343-217-201			1283			968			196	1283	968	196
2	Feruloyl quinic acid	3.1	368	391[M+Na+H]-367-353-191-173	2604									2604		
3	Methoxy-dihydro feruloyl methyl rosmarinic acid	3.2	582	583 [M+H]-553-523-391-375-361-197-173			1985	170		1182	170		650	1985	1352	820
4	Dihydroxy-dihydro feruloyl methyl rosmarinic acid	4.1	585	585-553-523-391-359-173	1132		539	54		356	54		328	1671	410	382
5	Feruloyl dimethyl rosmarinic acid	4.4	564	565[M+H]-403-241-191-173						(+)						
6	Feruloyl rosmarinic acid	4.9	537	537-481-375-167-134	307			100		819	100		1134	307	919	1234
7	Clorogenic acid	5.8	354	354-191						1104			1168		1104	1168
8	Quercetin 3-O-glucoside	8.1	464	486[M+Na]-386-323-191-170						532			704		532	704
9	Syringyl shikimic acid dimer	8.7	526	549 [M+Na]-347-173	2036	114	1195		86	2227		291	2725	3345	2313	3016
10	Shikimic acid dimer	9.3	346	347[M+Na]-173				1408			1408				1408	1408
11	Galloyl glucose	10.5	330	353 [M+Na]-290-185-169	395				896					395	896	
12	Quercitrin (quercetin-3-O-rhamnose)	11.8	448	471[M+Na]-390-367-353-171-133	161	3219	2038	507		5493	507	516	5482	5418	6000	6505
13	Quercetin-O-pentoside	13.3	433	433-345-195	99										99	
14	Caffeoyl quinic glicoside	14.0	514	538 [M+Na+H]-515-390-353			1065			1902			2156	1065	1902	2156
15	Ligstroside	14.3	524	524-471-360-295-271-235				644			644				644	644

16	Prunin (naringenin- 7-O-glucoside)	14.4	434	434-295-271-234-191	1044							1044
17	Feruoil quinic glucoside	14.8	529	529-391-352-317-197-171				2100			1865	2100 1865
18	Galloyl glucuronide	15.0	346	346-295-271-235-199	1314	2117	1837		1837		3431	1837 1837
19	Feruoil caffeic acid	15.4	356	357[M+H]-261-195-153	247						247	
20	Kaempferol-3,7-O-diglucoside	15.5	610	610-447-238-195-153				237				237
21	Myricetin galloyl-hexoside	17.7	632	632- 397-346-204-190-149	2049	1689		2294		1858	3738	2294 1858
22	3p-dihydro-coumaroylquinic acid	18.5	338	363 [M+Na+H]-337-261-183	3725		1766		435		3725	1766 435
23	Siringyl quinic acid	18.6	375	397 [M+Na]-375-191-183			9367		9367			9367 9367
24	Myricetin di-hexoside	19.4	642	642-403-279-191-160	579							579
25	Dicaffeoyl shikimic acid	20.9	498	499[M+H]-333-261-179-153	387	1515			1515		387	1515 1515
26	3-Hydroxyflavone	21.2	238	261 [M+Na]-243-137			698		684			698 684
27	Quinic acid	22.0	190	191 [M+H]-177	384							384
28	Proanthocyanidin dimer (procianidina B3)	24.9	578	579 [M+H]- 569-451-191	642							642
29	Epicatechin methylgallate	25.3	455	437 [M-H2O]-261-187-167437	797	1558	735		1558 1269		797	2293 2827
30	Salvianolic acid G	26.7	339	339-261-206-191	842		839				842	839
31	Luteolin 7-O-rutinoside	27.7	594	594-593-542-197	426					225	426	225
33	3' Methoxyquercetin-3-O-galactoside	28.6	478	501[M+Na+H]-321-261-167	1525	799	2550		2550		2324	2550 2550
32	3' Methoxyisorhamnetin glucoside	28.7	510	532[M+Na]-50-239195-167			2294		1050 6		2294	10506
34	Luteolin 7-O-(6"-malonyl)glucoside	32.3	534	557[M+Na]-387-191-176	394	702	1834				1096	1834
35	Pelargonidin 3-O-(6"-malonyl)glucoside	33.4	519	542[M+Na]-423-261-157-143	1612							1612
36	Diosmina	33.6	608	630 [M+Na]-387-265-221	119		1529		1529 9940		119	1529 11469
37	Cyanidin 3-O-glucoside	34.5	484	484-301-261-153	622	2320	387	2058	2327	2058	3329	4385 2058
38	Procianidina	36.5	560	560-421-385-260-157	304		5486		5486 2350		304	5486 7836
39	Petunidina 3-O- glucoside	37.7	479	502 [M+Na]-371-247-153	1237		1570		2582		1237	1570 2582
40	Rutina (quercetin 3-O-rutinoside)	40.2	610	635[M+Na+H]-393-301-261-143	4336		4758		4758		4336	4758 4758

41	Quercetin 3-O-(6''malonyl) glucoside	40.5	550	548[M-H2]-371-301-247		3793 2065	3793 5805	5858 9598
42	Myricetin 3-O-rutinoside	42.0	627	649[M+Na]-631-375-315-301-247	1086	2456	2456	1086 2456 2456
43	Quercetin 3-O-acetylramnoside	44.4	490	512 [M+Na]-301-196	178			178
44	Hydroxyferulic acid rhamnoside	45.3	357	381[M+Na+H]-261	28			28
45	Apigenina 7-O- diglucuronide	47.9	622	646 [M+Na+H]-421-385-231-176	24			24
46	Cyanidin 3-O-(6''succinyl)glucoside	48.3	549	549-439-247-189-171	732			732
47	Eriodictyol glucoside	48.7	450	451[M+H]-415-226-197	24			24
48	Sinapic acid	48.9	224	225[M+H]		648	648	648 648
49	Peonidin 3-O-(6''-O-malonyl)glucoside	49.4	549	549 -301-299-247-189-171	792			792
50	Kaempferol 3-O-(6''-O-malonyl)glucoside	51.7	536	559[M+Na]-539-526-245	476 5540	1947	1947 1398	6016 1947 3345
51	Cynarina (1.3 Dicaffeoylquinic acid)	52.2	516	517[M+H]-483-303-201		8262	8446	8262 8446
	Quercitin	58.0	301	301-285-247-153	1842	1548	1548	1842 1548 1548

Tabella 15: Analisi semiquantitativa dei diversi estratti delle tre sottospecie di *Cistus creticus*

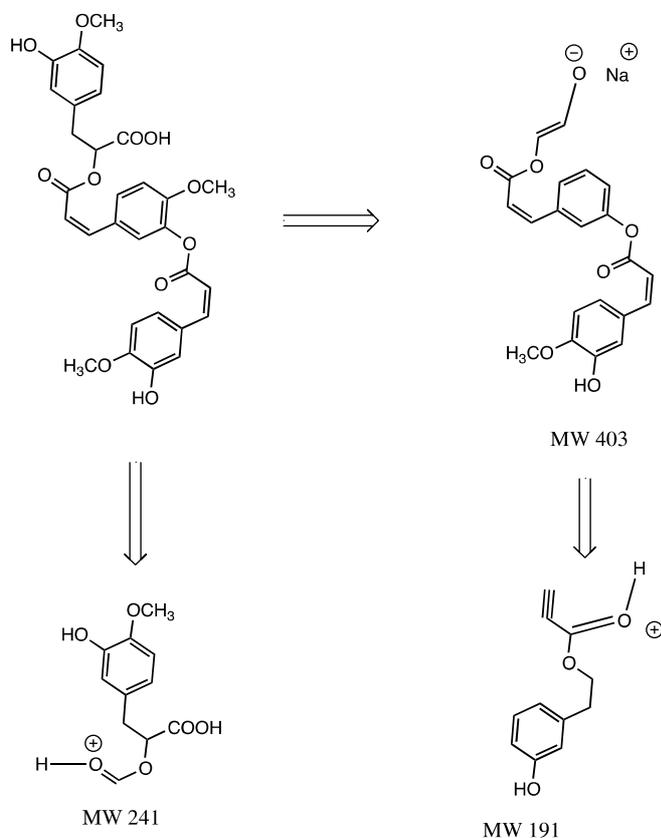


Figura 45: Frammenti di feruloyl dimethyl rosmarinic acid

L'analisi semiquantitativa, indicata in tabella 15, non rivela una grande differenza tra le tre sottospecie anche se vanno fatte alcune osservazioni circa la composizione dei diversi estratti. In figura 47 sono riportati i cromatogrammi dei diversi campioni ottenuti dalla ripartizione degli estratti nei diversi solventi così come è già stato descritto in precedenza.

In tutti e tre i campioni la classe maggiormente rappresentata è quella degli acidi fenolici. In particolare, tre composti (1-2-3) sono presenti in tutte le sottospecie a  $t_R$  2.5 min, 4.1 min e 4.4 min. Nei loro spettri

di massa si può osservare come picco base uno ione con  $m/z$  375 e un frammento a  $m/z$  360, che permettono l'identificazione di derivati metilici dell'acido rosmarinico: 3-O-methylrosmarinic acid, dihydroxy-dihydro feruoyl methyl rosmarinic acid e 5-feruloyl dimethyl rosmarinic acid rispettivamente, in accordo con i dati di letteratura (Bais et al., 2002; Liu et al., 2007).

Il composto 3, individuato al tempo di ritenzione 3.2 min, è stato identificato come feruloyl quinic acid (Fang et al., 2002). Nel suo spettro di massa si può notare lo ione  $[M+Na+H]^+$  a  $m/z$  391, il picco base a  $m/z$  367 e due frammenti a  $m/z$  191 e  $m/z$  173 in accordo con la formula di questo composto. E' presente anche il quinic acid (26), ma solo nell'estratto butanologico del *C. creticus* subsp. *creticus* e in bassa concentrazione.

Il feruloyl caffeic acid (18) è stato identificato nell'estratto in acetato di etile di *C. creticus* subsp. *creticus* e *C. creticus* subsp. *corsicus* sulla base del suo ione molecolare e il suo modello di frammentazione:  $m/z$  153 come picco base,  $m/z$  261 e  $m/z$  195, come indicato nella figura 46.

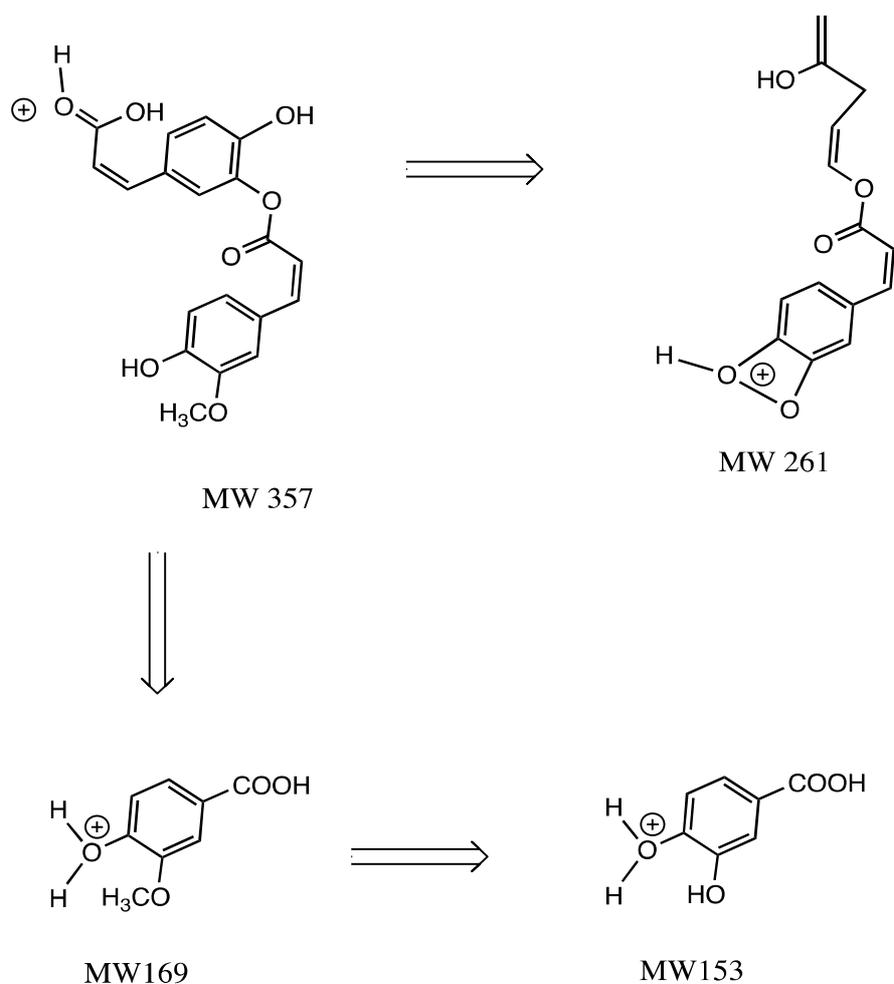


Figura 46: frammentazione del feruloyl caffeic acid

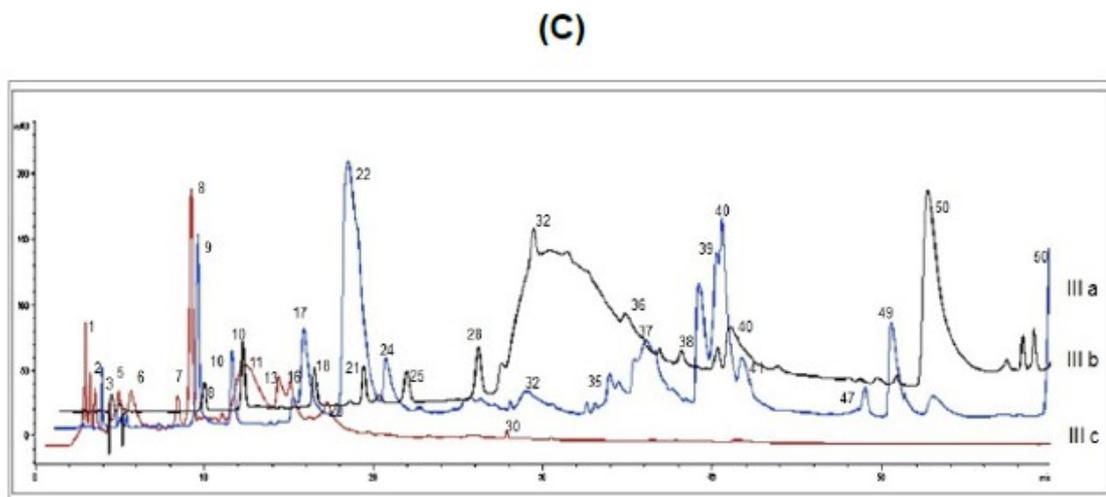
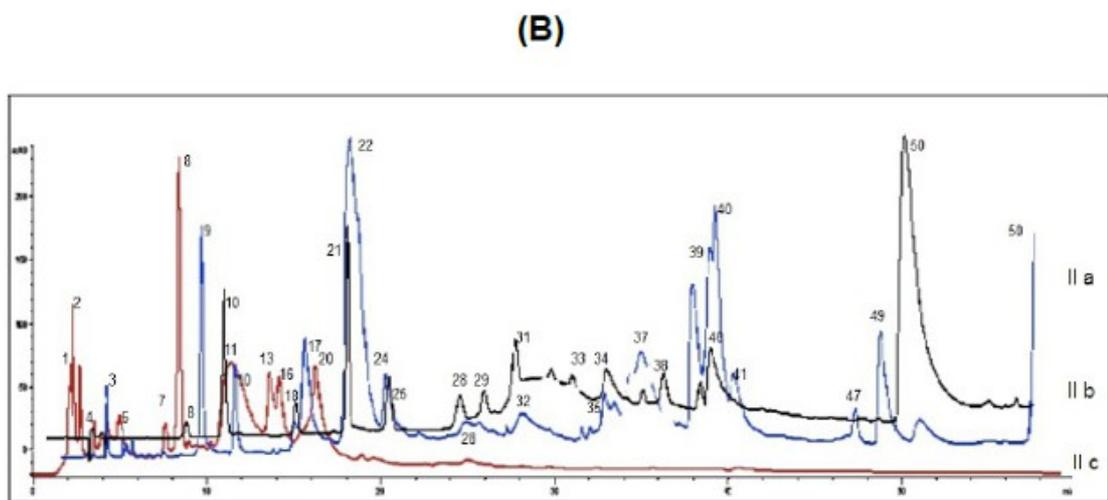
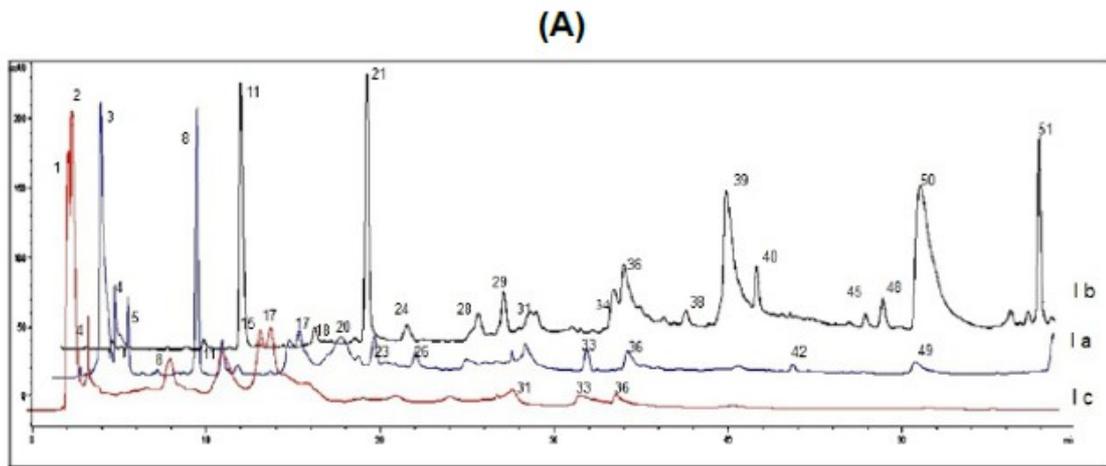


Figura 47: Cromatogrammi HPLC-DAD-ESI-MS degli estratti delle tre sottospecie di *Cistus creticus*: *C. creticus* subsp. *creticus* (A); *C. creticus* subsp. *corsicus* (B); *C. creticus* subsp. *eriocephalus* (C). I numeri romani indicano la sottospecie (I per *C. creticus* subsp. *creticus*, II per *C. creticus* subsp. *corsicus*, III per *C. creticus* subsp. *eriocephalus*); le lettere minuscole indicano il tipo di estrazione (a e linea blu per l'estrazione butanolica; b e linea nera per l'estrazione in acetato di etile; c e linea rossa per l'estrazione acquosa).

Il 3p-dihydrocoumaroylquinic acid (21) è presente in tutte e tre le sottospecie con ione molecolare  $m/z$  363  $[M+Na+H]$  e picco base a  $m/z$  183 (Fig. 48).

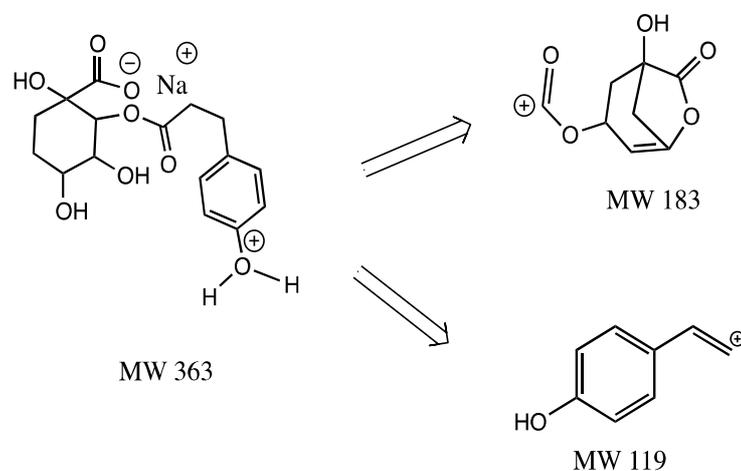


Figura 48: Frammentazione del 3p-dihydrocoumaroylquinic acid

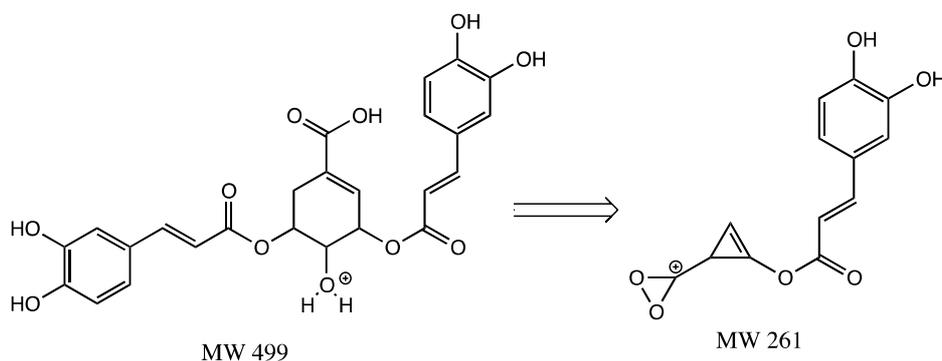


Figura 49: Frammentazione del dicaffeoyl shikimic acid

In *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* è stato identificato in grande quantità il dimero del shikimic acid ( $m/z$  347) con un frammento  $m/z$  173 che rappresenta  $[M-H]$  della subunità del shikimic acid. Il dicaffeoyl shikimic acid (24) è invece presente in tutte e tre le sottospecie più o meno nella stessa concentrazione (Fig. 49). Il picco al tempo di ritenzione 26.7 min, che presenta un importante ione a  $m/z$  339 (100% di intensità relativa), è presente in *C. creticus* subsp. *creticus* e *C. creticus* subsp. *corsicus*; per questo composto è stato fatto un tentativo di identificazione che ha portato all'ipotesi della struttura del salvianolic acid G (29) (Fig.4950

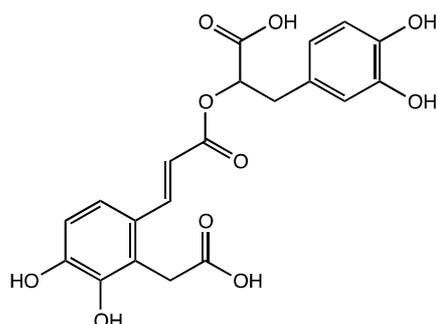


Figura 50: Salvianolic acid G

Infine, in tutte le sottospecie di *Cistus creticus* è stato trovato in quantità significative l'1,3-dicaffeoylquinic acid (50) (Fig.51)

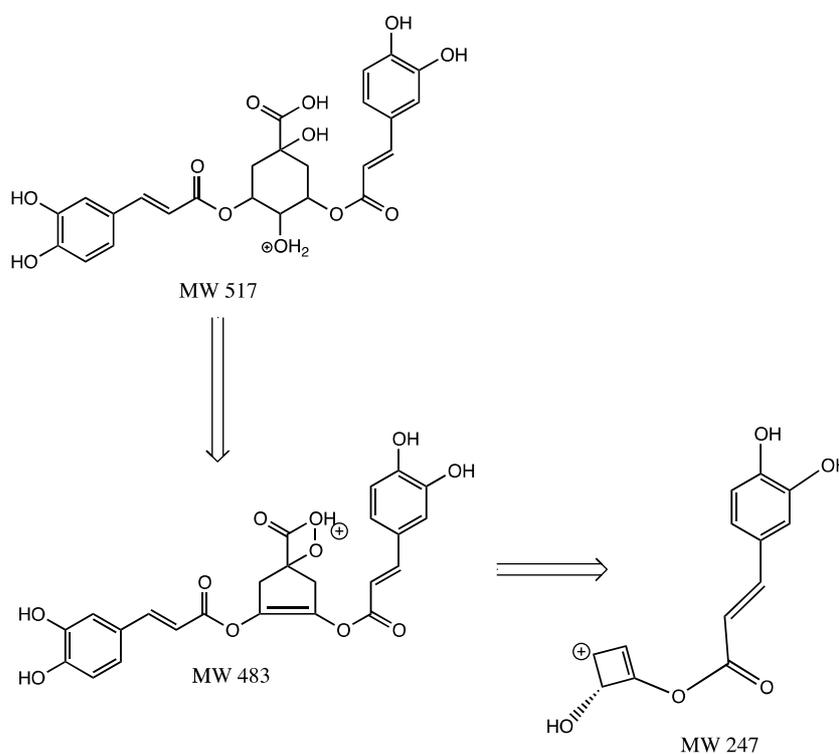


Figura 51: Frammenti del 1,3-dicaffeoylquinic acid

Sono stati identificati anche cinque diversi glicosidi degli acidi fenolici: galloyl glucose (10) è stato identificato a  $t_R$  10.5 min, la massa mostra il frammento  $[M+Na]$   $m/z$  353 e un frammento  $m/z$  169, che corrisponde alla perdita del glucosio (Barros et al., 2013).

Sia il caffeoyl quinic glicoside (13) che il galloyl glucuronide sono stati identificati nelle tre

sottospecie. Mentre hydroxyferuloyl rhamnoside (43) (Barrajón-Catalán et al., 2011) è stato identificato solo nel campione di *C. creticus* subsp. *creticus*, e feruoyl quinic glucoside (16) solo in *C. creticus* subsp. *eriocephalus*.

Un'altra frazione importante identificata nei diversi estratti di *Cistus creticus* è rappresentata dai flavonoli. Tra questi quercitrin (11), quercetin (51), myricetin galloyl hexoside (20) and kaempferol 3-O-(6''-O-malonyl)glucoside (49) sono i più abbondanti in tutti e tre gli estratti. Il kaempferol diglucoside (19) è presente solo in *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, mostrando un caratteristico frammento  $m/z$  447 che corrisponde alla perdita di un esoso (Fernández-Arroyo et al., 2010). *C. creticus* subsp. *creticus* è caratterizzato dalla presenza di quercetin-O-pentoside (12), myricetin di-hexoside (23), naringenin-7-O-glucoside (15) e quercetin 3-O-acetyl ramoside (42), composto caratterizzato dal frammento  $m/z$  301 indicante la presenza della quercetina e dal frammento  $m/z$  261 come indicato nella figura 52.

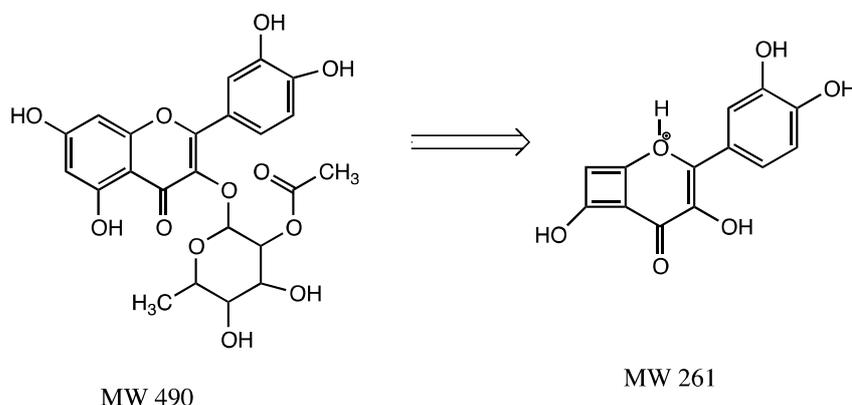


Figura 52: Quercetin 3-O-acetyl ramoside: frammento 261

Rutina (39) e diosmina (35) sono presenti in tutte le sottospecie, 3'-methoxyquercetin galactoside (31) è stato identificato sia in *C. creticus* subsp. *creticus* sia in *C. creticus* subsp. *corsicus* mentre myricetin 3-O-rutinoside (41) è stato identificato in *C. creticus* subsp. *creticus* e in *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. Infine, nei campioni di *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* sono presenti quercetin 3-O-glucoside (7) e methoxy isorhamnetin glucoside (Fig. 53).

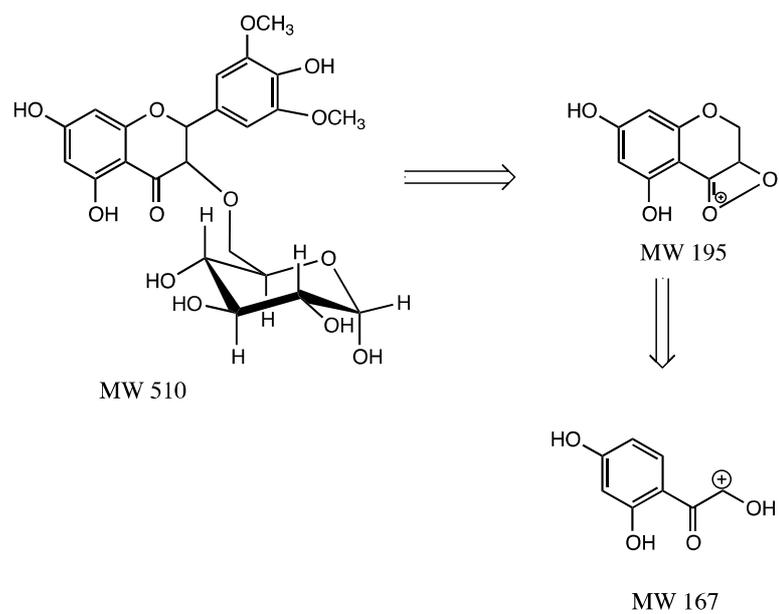


Figura 53: Frammenti di methoxy isorhamnetin glucoside

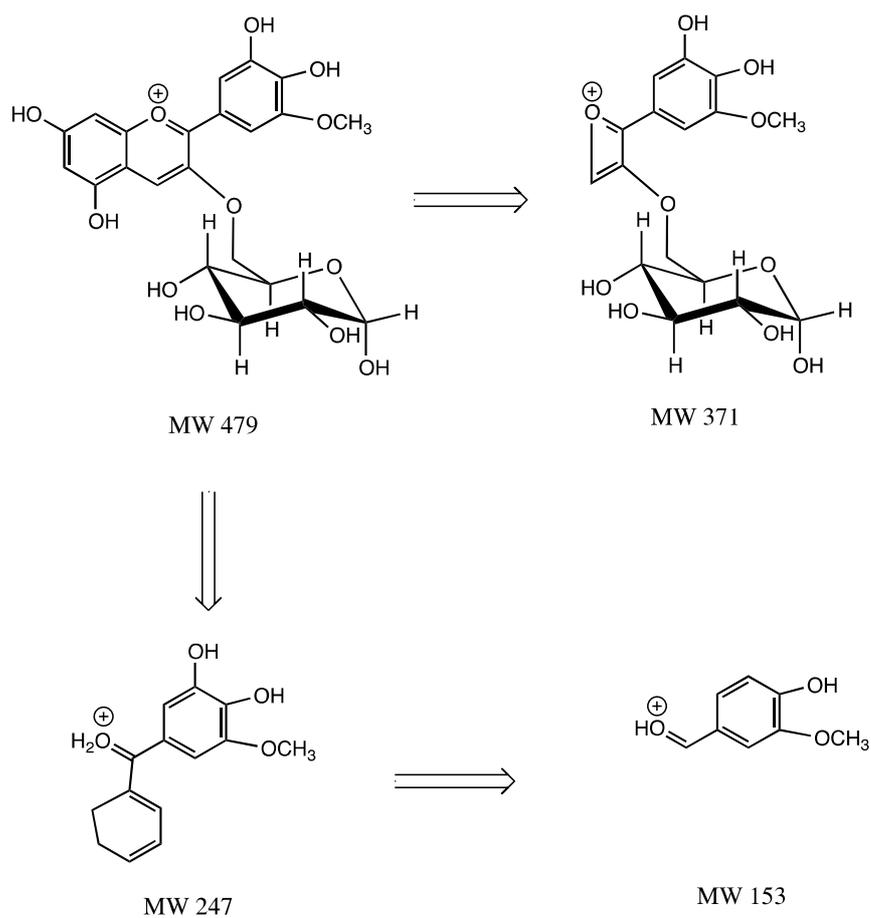


Figura 54: Frammenti di petunidina glucoside

Tra le antocianine, cyanidin 3-O-glucoside (36) e petunidin 3-O-glucoside (Fig. 54) sono state identificate in tutte e tre le sottospecie; pelargonidin 3-O-(6''malonyl)glucoside (34) è stata identificata sia in *C. creticus* subsp. *Creticus*, sia in *C. creticus* subsp. *corsicus*.

*C. creticus* subsp. *creticus* è caratterizzato dalla presenza di cyanidin 3-O-(6''succinyl)glucoside (45) e peonidin 3-O-(6''-O-malonyl) glucoside, inoltre contiene diversi flavoni: luteolin 7-O-(6''-malonyl)-glucoside (33), apigenin 7-O-diglucuronide (44) (Fig.54) e luteolin 7-O-rutinoside (30); quest'ultimo composto è presente anche in *C. creticus* subsp. *eriocephalus* come 3-hydroxyflavone (25) (Fig. 54).

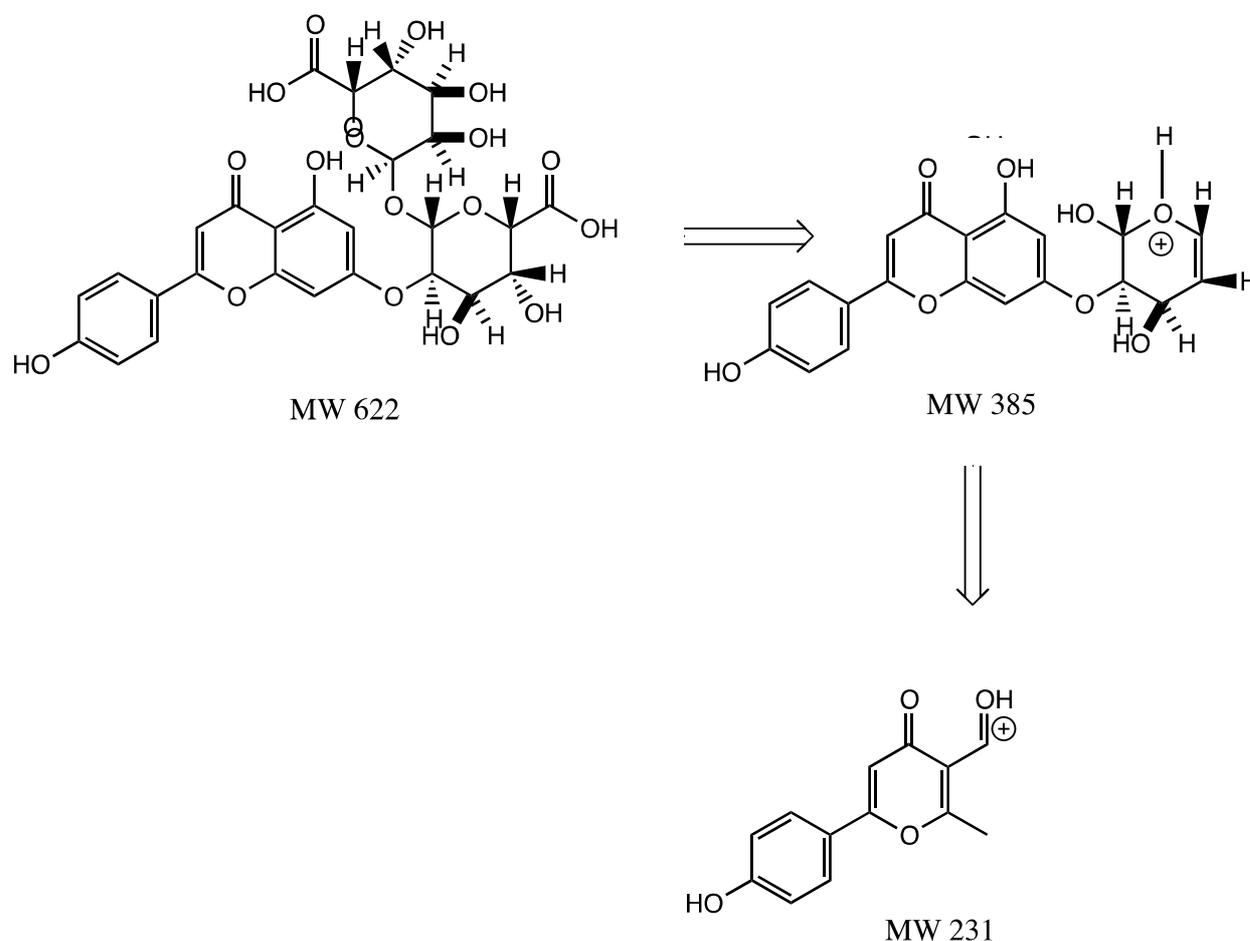


Figura 54: Frammentazione in apigenin 7-O-diglucuronide

Diversamente da altre specie del genere *Cistus*, in queste tre sottospecie sarde sono assenti i tannini polimerici, ma è stata riscontrata la presenza di alcuni precursori, quali: procyanidin B3 (27), epicatechin methylgallate (28) e procyanidin (37).

In *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* al  $t_R$  14.3 min è stato osservato un composto con ione molecolare  $m/z$  524 e identificato come ligstroside. La

frammentazione di questo composto, è rappresentata nella figura 55 attraverso i frammenti a  $m/z$  360, corrispondente alla perdita del glucosio, e  $m/z$  295 come riportato in letteratura (Cardoso et al., 2011).

Infine, solo in *C. creticus* subsp. *corsicus* è stato identificato l'eriodictyol glucoside, un composto presente a  $t_R$  48.7 min, con spettro di massa  $[M+2H]^+ m/z$  452.

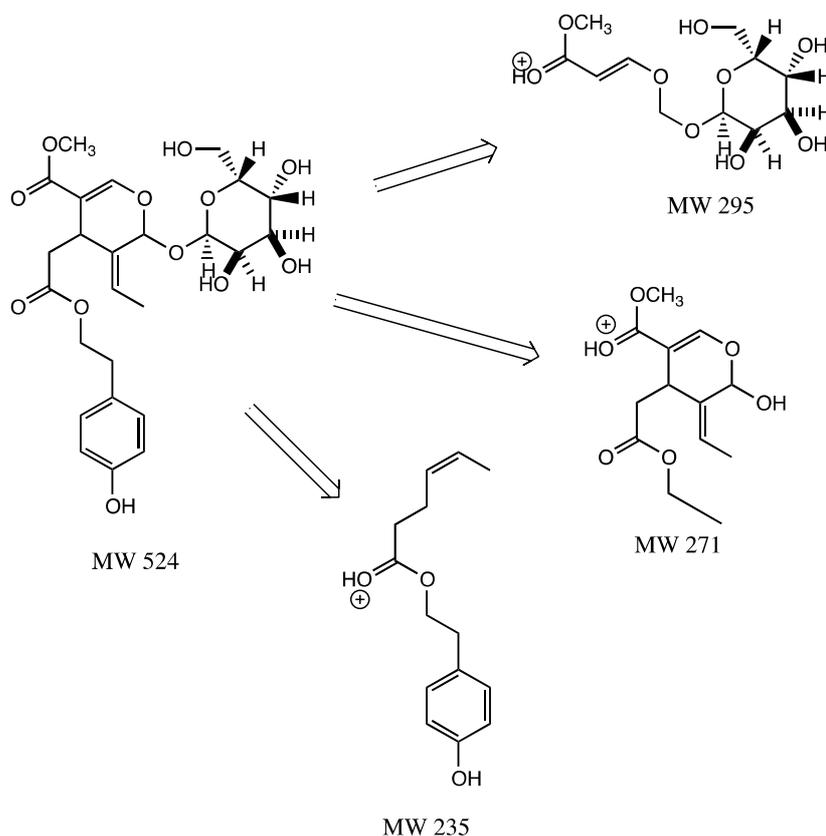


Figura 55: Frammentazione di ligstroside

Nella figura 56 è stata messa a confronto il contenuto di composti fenolici nelle diverse sottospecie di *Cistus creticus*.

Come precedentemente descritto, la figura mostra che alcuni composti sono caratteristici di una particolare sottospecie, mentre altri sono presenti, ma in quantità diverse.

In particolare, *C. creticus* subsp. *creticus* contiene differenti glicosidi che non sono presenti nella altre sottospecie, oltre al quinic acid e alla procyanidin B<sub>3</sub> che sono peculiari di questa sottospecie. Un'altra caratteristica del *C. creticus* subsp. *creticus* è la presenza, nella composizione dell'estratto metanolico, di un più alto contenuto di derivati dell'acido rosmarinico rispetto alle altre due sottospecie. Al contrario, le altre due sottospecie mostrano composti non

ricontrati in *C. creticus* subsp. *creticus* come ad esempio, siringyl quinic acid, myricetin-3-O-rutinoside e 3' methoxyisorhamnetin glucoside che sono presenti in alta percentuale in *C. creticus* subsp. *eriocephalus* (se si considera 100% la quantità totale presente nelle tre sottospecie, *C. creticus* subsp. *eriocephalus* ne contiene 76%); *C. creticus* subsp. *eriocephalus* è l'unica sottospecie che contiene kaempherol-3,7-O-diglucoside.

La quercetina e i suoi derivati e la cinarina sono comuni alle tre sottospecie.

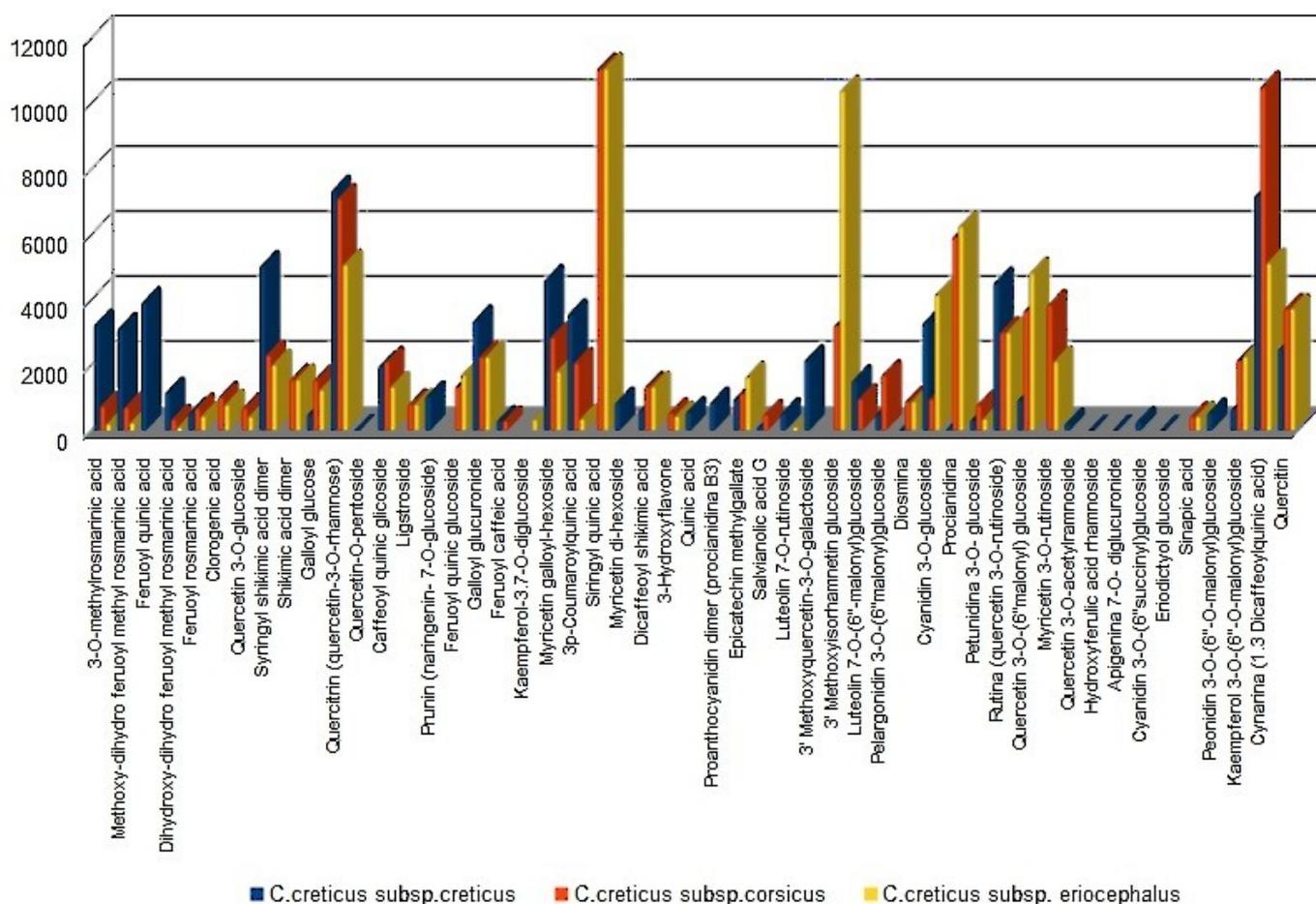


Figura 56: Comparazione dei composti fenolici nelle tre sottospecie di *Cistus creticus sardo*

### 3.2.1.2 Altre specie di *Cistus* vegetanti in Sardegna

Nella tabella 16 sono riportati i risultati ottenuti dall'estrazioni di *C. salvifolius*, *Cistus monspeliensis* e *Cistus albidus*. Sono indicati sia i contenuti totali, sia la distribuzione dei composti fenolici nei solventi a diversa polarità.

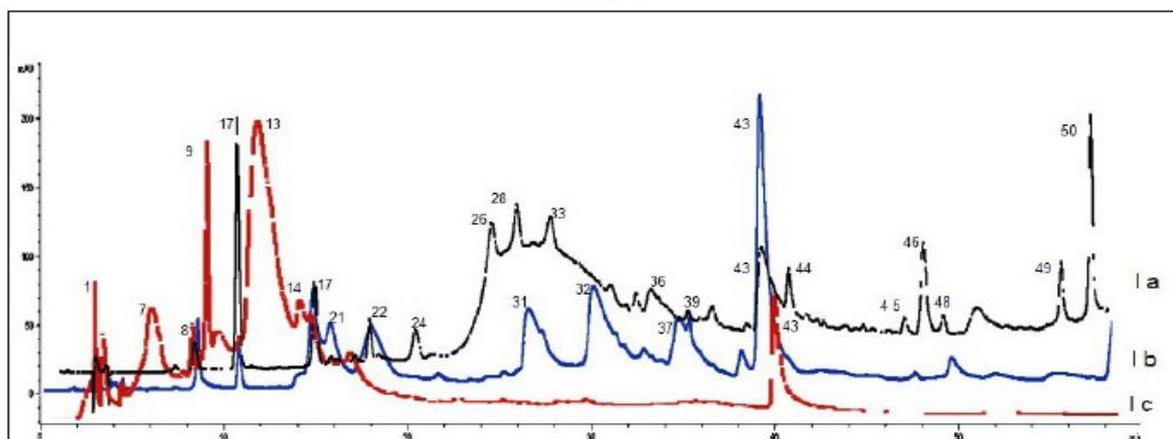
In figura 57 sono riportati i cromatogrammi dei diversi campioni ottenuti dalla ripartizione degli estratti nei diversi solventi.

Peak n.	Compound identification	Rt (min.)	MW	Fragment (m/z)	<i>Cistus salvifolius</i>			<i>Cistus monspeliensis</i>			<i>Cistus albidus</i>			1	2
					BuOH	Ac-Et	H2O	BuOH	Ac-Et	H2O	BuOH	Ac-Et	H2O		
					1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	3c		
1	3-O-methylrosmarinic acid	2,5	375	517-500-375-359-343-217-201			2030			1581	93	589	2030	1581	
2	3-Caffeoyl quinic acid	2,9	353	377 [M+Na]-355 [M+H]-192-191-179									552		
3	Feruloyl quinic acid	3,1	368	391[M+Na+H]-367-353-191-173	570		2200	393		960			2770	1353	
4	Methoxy dihydroferuoyl methyl rosmarinic acid	3,2	582	582-553-523-391-375-361-197-173							739				
5	Dihydroxy-dihydro feruoyl methyl rosmarinic acid	4,1	585	585-553-523-391-359-173			1452	193		487	202	136	1452	680	
6	para-Hydroxy benzil rosmarinic acid	4,5	536	537-481-375-167-134						249	72	102		249	
7	Caffeoyl quinic acid glucoside	6,1	515	515-353-191-170			13702			4334			13702	4334	
8	Quercetin 3-O-glucoside	8,1	464	485[M+Na-H]-386-323-191-170			4721			944		325	4721	944	
9	Syringyl shikimic acid dimer	8,8	526	549 [M+Na] -347-173		847	9727		264	1749		657	10574	2013	
10	5-O-caffeoylquinic acid glucoside	9	515	516[M+H]-353-319-222-191-132									2256		
11	Shikimic acid dimer	9,3	346	347[M+H]-173	1938		16003	1676			1556		17941	1676	
12	Galloyl glucose	11,2	330	353 [M+Na] -290-185-169	1288	6241		363	1234		613	535	7529	1597	
13	Quercetrin (quercetin-3-O-rhamnose)	11,8	448	471[M+Na] -390-367-353-171-133			59915			16852			59915	16852	
14	Caffeoyl quinic glicoside	14	514	538 [M+Na+H] -515-390-353			19838			9376			1504	19838	9376
15	Prunina (naringenin 7-O-glucoside)	14,3	434	433 [M-H]- 295-271-234-191							1253				
16	Feruoyl quinic glucoside	14,8	529	529-391-352-317-197-171			10990			8005			1010	10990	8005
17	Oleuropein	15,3	540	541 [M+H]-433-397-391-153	7797									7797	
18	Caftaric acid	15,5	312	312-195-169-153								148			
19	Feruoyl caffeic acid	15,4	356	357[M+H]-261-195-153		2653								2653	
20	Rosmarinic acid	15,6	360	360-279-153-151			3717	571						4288	
21	Myricetin-O- galloyl-hexoside	17,7	632	631 [M-H]- 397-346-204-190-149	7883		10988	3102		5770	1780	32	18871	8872	
22	3p-dihydro-coumaroylquinic acid	18,5	338	363 [M+Na+H]-337-261-183	10260	1127			261			262	11387	261	
23	Quercetin 3,4-diglucoside	21,2	625	648 [M+Na]-323-197-137						588		203		588	
24	Dicaffeoyl shikimic acid	20,9	498	499[M+H]-333-261-179-153		1919								1919	
25	Quinic acid	21,9	190	191[M+H]- 177			1246	232		1398				1478	
26	Epicatechin methyl gallate	25,3	455	437 [M-H2O] - 261-167		19823								19823	
27	4,3',4'-Trimethyl catechin	25,5	332	(332)- 195-167-152					1296		1907	603		1296	
28	Salvianolic acid G	26,8	339	339-261-187-167		16166								16166	
29	3,3' di-O-Methyl ellagic acid 4-O-b-D-(2" acetyl) glucoside	26,9	534	558 [M+Na+H]- 541-469-401-283-171			5321							5321	
30	6'-O-Sinapoyl sucrose	26,9	548	571[M+Na]- 197-163-135					1729			536		1729	
31	Luteolin-7-O-rutinoside	27,3	594	593 [M-H] - 542-197	13421		2936		386	1473			13421	3322	
33	3' Methoxyquercetin-3-O-galactoside	28,6	478	501[M+Na+H]-321-261-167		20597								20597	
32	Pelargonidin 3-O-(6"malonyl)glucoside	31,5	519	541[M+Na-H] - 171	17894	22309					1740	398		40203	
34	Luteolin 7-O-(6"-malonyl)glucoside	32	534	557[M+Na]-387-191-176		8833		9921					8833	9921	
35	Glycitin 6"-O-malonate	32,1	532	533[M+H]- 501-439-191-176					6958		260			6958	
36	Cyanidin 3-O-glucoside	33,9	484	483[M-H] 301-261-153		16965								16965	
37	Procianidin	35,7	560	560 -421-385-260-157	11730	7372		6050				360	19102	6050	

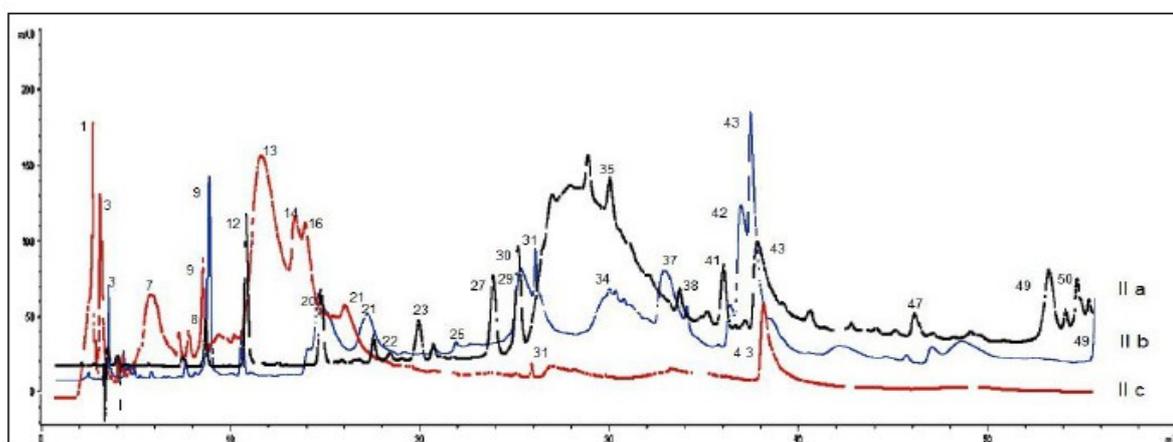
38	3-Sinapoyl quinic acid	36,3	399	399				1615	2775		4390		
39	Olivil 9-O-b-D-xyloside	36,3	508	508-418-399	4026						4026		
40	Petunidin 3-O- glucoside	37,7	479	501[M+Na-H]-371-247-153		6668					6668		
41	Ferulic acid oligomer	38,6	194	195 [M+H] -165				1724		572	1724		
42	7-Arabinosyl kaempferol	40,1	418	417 [M-H] -301-261				6612			6612		
43	Rutina (quercetin 3-O-rutinoside)	40,8	610	635[M+Na+H]- 427-333—301-261	18234	15937	6120	4967	5086	2064	1572	40291	12117
44	Myricetin 3-O-rutinoside	42	627	649[M+Na]-631-375-315-301		7043				1510		7043	
45	Oenin (malvidin 3-O-glucoside)	48,4	492	493[M+H]- 301-197-177		5658				857		5658	
46	Petunidin	49,4	317	341[M+Na+H]- 317-301-299-178		7508				1034		7508	
47	Cyanidin 3-O-(6" dioxalyl) glucoside	49,5	592	614 [M+Na] -317-299-195-187					1630			1630	
48	Peonidin 3-O-(6"-p-coumaroyl) glucoside	50,6	609	631[M+Na]-593-465-301		3767				1585		3767	
49	Cynarina (1.3 Dicafeoylquinic acid)	52,2	516	517[M+H]-483-303-201		5255		1158	2256		912	5255	3414
50	Quercitin	58,8	301	301-285		11228		1469		2137		11228	1469

*Tabella 16: Analisi semiquantitativa dei diversi estratti di C. salvifolius, C. monspeliensis e C. albidus*

(A)



(B)



(C)

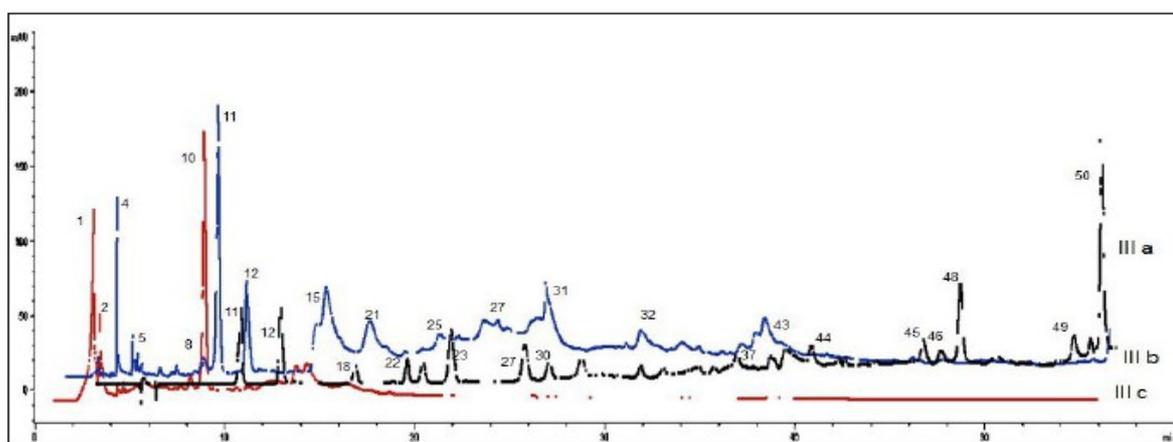


Figura 57: Cromatogrammi HPLC-DAD-ESI-MS degli estratti di *C. salvifolius* (A); *C. monspeliensis* (B); *C. albidus* (C). I numeri romani indicano la specie (I per *C. salvifolius*, II per *C. monspeliensis*, III per *C. albidus*); le lettere minuscole indicano il tipo di estrazione (a e linea blu per l'estrazione butanolica; b e linea nera per l'estrazione in acetato di etile; c e linea rossa per l'estrazione acquosa).

### *Cistus salvifolius*

La classe di composti maggiormente rappresentata nel *C. salvifolius* sardo è quella degli acidi fenolici e dei loro derivati glicosidici. Tra questi il composto presente in maggiore quantità è stato identificato come shikimic acid dimer al tempo di ritenzione 9.3 min con ione molecolare [M+H]  $m/z$  347 e un frammento a  $m/z$  173 che corrisponde alla subunità [M- H] dell'acido shikimico. Il composto corrispondente al  $t_R$  26,8 min con ione base  $m/z$  339 è stato identificato come salvianolic acid G in base ai dati di letteratura (Liu et al., 2007) ed è presente in quantità significativa, così come il syringyl shikimic acid dimer ( $t_R$  8.8 min; [M+Na]  $m/z$  549). Tra gli acidi fenolici sono stati identificati anche due derivati dell'acido rosmarinico: 3-O-methylrosmarinic acid ( $t_R$  2.5 min) e il dihydroxy-dihydro feruoyl methyl rosmarinic acid ( $t_R$  4.1 min); questi ultimi due hanno come picco base uno ione con  $m/z$  375 e un frammento a  $m/z$  360, in accordo con i dati di letteratura (Bais et al., 2002; Liu et al., 2007). Sono inoltre presenti il feruloyl quinic acid a  $t_R$  3.1 min identificato dai frammenti [M+Na+H]  $m/z$  391-367-353-173 (Fang et al., 2002) e il feruloyl caffeic acid ( $t_R$  15.6 min) presente solo nell'estratto in acetato di etile. Anche il dicaffeoyl shikimic acid è presente solo nella ripartizione in acetato di etile a  $t_R$  21.5 min e presenta uno ione molecolare [M+H]  $m/z$  489 e un frammento con  $m/z$  261.

Tra i glicosidi degli acidi fenolici è stato identificato il caffeoyl quinic glucoside ( $t_R$  6.1 min) con ione molecolare  $m/z$  515 e un frammento  $m/z$  353, che corrisponde all'acido clorogenico dopo la perdita del glucosio, picco base  $m/z$  191 diagnostico della presenza dell'acido chinico. Al tempo di ritenzione 14.0 min è stato individuato un composto con [M+Na+H]  $m/z$  538, un frammento  $m/z$  515 ed uno a  $m/z$  353, corrispondente all'acido clorogenico, che ci ha permesso di identificare il caffeoyl quinic glucoside (Yu et al., 2015). Sono presenti anche il galloyl glucose ( $t_R$  11.2 min) con [M+Na]  $m/z$  353 e picco base  $m/z$  169, caffeoyl quinic glucoside ( $t_R$  14 min; [M+Na+H]  $m/z$  538) e feruloyl quinic glucoside ( $t_R$  14.8 min; ione molecolare  $m/z$  529).

Anche la classe dei flavoni è ben rappresentata nel *C. salvifolius* in modo particolare dai flavonoli con la quercitina e i suoi derivati presenti in quantità interessanti. Il composto al tempo di ritenzione 8.16 min e [M+Na+H]  $m/z$  485 è stato identificato come quercetin 3-O-glucoside; la quercetrin ( $t_R$  11.8 min; [M+Na]  $m/z$  471) è il composto più abbondante presente in questo campione (Fig. 58), inoltre 3' methoxyquercetin-3-O-galactoside ( $t_R$  28.6 min; [M+Na+H]  $m/z$  501), rutina ( $t_R$  40.8 min; [M+Na+H]  $m/z$  635) e quercetina ( $t_R$  58.8 min; ione molecolare  $m/z$  301) sono presenti in quantità significativa.

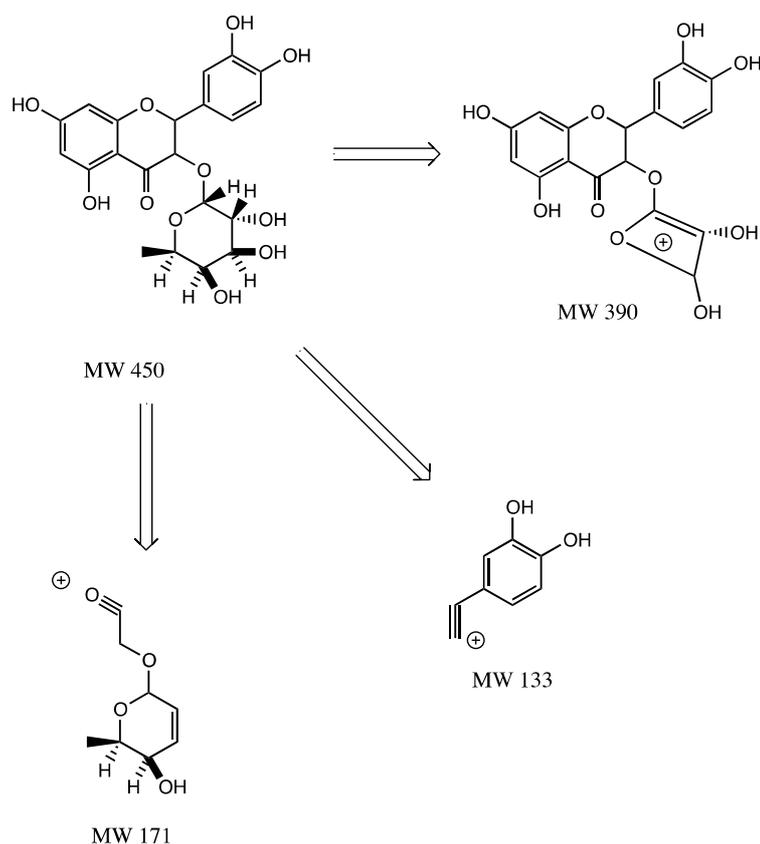


Figura 58: Frammentazione di quercitrina

Altri flavoni identificati sono: myricetin-O-galloyl-hexoside ( $t_R$  17.7 min; [M-H]  $m/z$  631), luteolin-7-O-rutinoside ( $t_R$  27.3 min; [M-H]  $m/z$  593), luteolin 7-O-(6''-malonyl)glucoside ( $t_R$  32 min, [M+Na]  $m/z$  557 e myricetin 3-O-rutinoside ( $t_R$  42 min; [M+Na]  $m/z$  649). La presenza di quercetina e miricetina glicosilati sono in accordo con precedenti studi eseguiti su *C. salvifolius* provenienti da diverse aree del Mediterraneo (Saracini et al., 2005; Barrajón-Catalán et al., 2010; Tomas-Menor et al., 2013).

Sono stati identificati anche due flavan-3-oli: epicatechin methyl gallate ( $t_R$  25.3 min; [M-H<sub>2</sub>O]  $m/z$  437) e procianidin ( $t_R$  35.7 min e ione molecolare  $m/z$  560).

*C. salvifolius* è l'unica specie tra quelle studiate in questa ricerca in cui è stato possibile identificare due composti presenti esclusivamente nella frazione butanolica.

Il composto 17 a  $t_R$  15.3 min, presenta il picco molecolare protonato a  $m/z$  541, un frammento a  $m/z$  153 (corrispondente all'idroxytyrosol) e un frammento a  $m/z$  397 (Fig. 59). Questi dati hanno permesso di identificare il composto come oleuropein (Cardoso et al., 2011).

Il composto 39 a  $t_R$  36.3 min mostra uno ione molecolare a  $m/z$  508. I dettagli della frammentazione (Fig. 59) suggeriscono che si tratti di un glicoside con un picco base  $m/z$  399 (aglicone + Na), formatasi dopo la perdita di uno zucchero che potrebbe essere lo xylose. Il

glucoside è stato identificato come olivil 9-*O*- $\beta$ -D-xyloside (Sadhu et al., 2006). Il frammento *m/z* 418 sarebbe dovuto ad un riarrangiamento della molecola dell'olivil dopo il distacco dello xylose (Fig. 60).

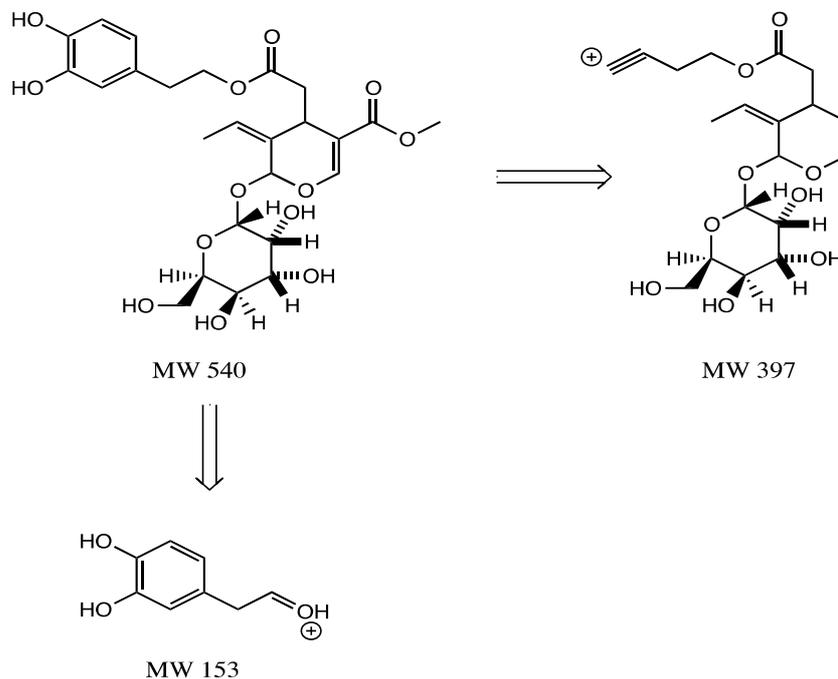


Figura 59: Frammentazione di oleuropeina

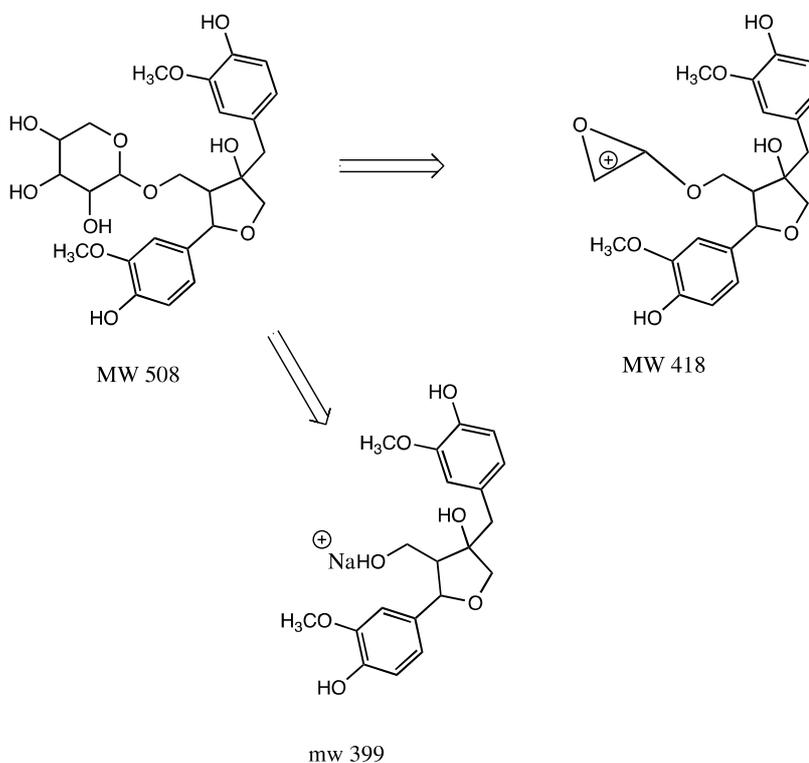


Figura 60: Frammenti di olivil 9-*O*- $\beta$ -D-xyloside

### Cistus monspeliensis

Anche per il *C. monspeliensis* i composti identificati in maggior numero sono gli acidi fenolici e i loro glucosidi e la maggior parte sono in comune con il *C. salvifolius* anche se in quantità decisamente più basse: 3-O-methylrosmarinic acid (1), feruloyl quinic acid (3), dihydroxy-dihydro feruoyl methyl rosmarinic acid (5), syringyl shikimic acid dimer (9), shikimic acid dimer (11), dicaffeoyl quinic acid (49). Inoltre, solo in questa specie, è presente l'acido rosmarinico ( $t_R$  15.6 min; ione molecolare  $m/z$  360) e un suo derivato a  $t_R$  4.5 min, *para*-hydroxy benzyl rosmarinic acid presente anche in *C. albidus*. Il composto è stato individuato per la presenza dello ione molecolare ( $[M+H]$   $m/z$  481), del picco base a  $m/z$  204 e di un frammento a  $m/z$  243:

Il 3*p*-dihydro coumaroylquinic acid ( $t_R$  18.5 min) mostra  $[M+Na+H]$   $m/z$  363 e un picco base  $m/z$  183, il quinic acid è stato individuato a  $t_R$  21.9 min con ione molecolare  $m/z$  191 e picco base  $m/z$  177.

Il composto 38 con ione molecolare ( $m/z$  399) a  $t_R$  36.3 è il 3-sinapoyl quinic acid, mentre a  $t_R$  38.6 min con  $[M+H]$   $t_R$  195 e picco base  $t_R$  165 è stato identificato un oligomero del ferulic acid.

Tra i glicosidi *C. monspeliensis* presenta come il *C. salvifolius*: caffeoyl quinic glucoside (7), galloyl glucose (12), caffeoyl quinic glicoside (14), feruoyl quinic glucoside (16). Nella frazione in acetato di etile del *C. monspeliensis* a  $t_R$  26.9 min il composto 30 è stato identificato come 6'-O-sinapoyl sucrose con  $[M+Na]$   $m/z$  571. La possibile frammentazione è mostrata nella figura 61.

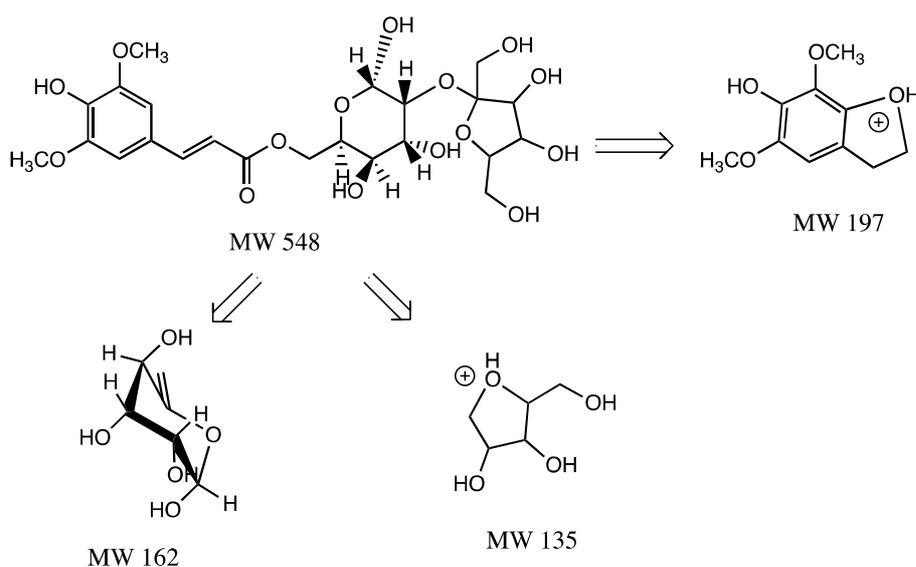


Figura 61: Frammenti di 6'-O-sinapoyl sucrose

Mentre nella frazione butanolica, sempre al tempo di ritenzione 26.9 min, è presente un composto che non è stato individuato nelle altre specie studiate e che è stato identificato come 3,3' di-O-Methyl ellagic acid 4-O-b-D-(2" acetyl) glucoside sulla base dei dati di letteratura (Xiao-Hong Yan and Yue-Wei Guo, 2004). Lo spettro di massa presenta uno ione molecolare [M+H]  $m/z$  558 e due frammenti dovuti a riarrangiamenti degli ioni.

Tra i flavononi la quercetina e i suoi derivati sono i più rappresentati. I composti 7, 13, 43, e 50 presenti in *C. salvifolius*, sono presenti, pur se in quantità minore, anche nel *C. monspeliensis* in cui è stato rilevato la quercetin 3,4-diglucoside ( $t_R$  21.2 min; [M+Na]  $m/z$  648). Altri glicosidi presenti sono: myricetin-O- galloyl-hexoside ( $t_R$  17.7 min; [M-H]  $m/z$  631), luteolin-7-O-rutinoside ( $t_R$  27.3 min; [M-H]  $m/z$  593), luteolin 7-O-(6"-malonyl)glucoside ( $t_R$  32 min, [M+Na]  $m/z$  557. Al tempo di ritenzione 32.1 min con [M+H]  $m/z$  533 è stato identificato un isoflavone: il glycitin 6"-O-malonate.

Infine, nella frazione butanolica è stato identificato 7-arabinosyl kaempferol ( $t_R$  40.1 min; [M-H]  $m/z$  417, picco base  $m/z$  301).

Tra i flavanoli oltre alla procianidin ( $t_R$  35.7 min e ione molecolare  $m/z$  560), è stata identificata la 4,3',4 trimethyl catechin ( $t_R$  25.5 min; ione molecolare  $m/z$  332, picco base  $m/z$  167).

Per quel che riguarda la classe delle antocianine, in *C. monspeliensis* è stato possibile identificare solo il composto cyanidin 3-O-(6"-dioxalyl-glucose) (47), il suo riconoscimento è stato possibile considerando il tempo di ritenzione ( $t_R$  49.5 min) e lo ione [M+Na]  $m/z$  614.

### *Cistus albidus*

In generale il *C. albidus* è risultata la specie meno ricca quantitativamente di composti fenolici. La sua composizione fenolica mostra diversi composti in comune con le altre specie considerate, ma sempre in quantità inferiori. Alcune molecole sono risultate presenti in questa specie e nelle sottospecie di *C. creticus* come ad esempio il methoxy dihydroferuoyl methyl rosmarinic acid ( $t_R$  3.1 min; ione molecolare  $m/z$  582).

Per quanto riguarda gli acidi clorogenici al tempo di ritenzione 2.9 min; ([M+Na]  $m/z$  377-[M+H]  $m/z$  355 -192-191-179) è stato identificato il 3-caffeoyl quinic (Clifford et al., 2006; Clifford et al., 2008), anziché il 5-caffeoyl quinic, presente nelle altre specie.

Feruoyl dimethyl rosmarinic acid è presente nella frazione acquosa a  $t_R$  4.4 min, il cui modello di frammentazione è già stato descritto precedentemente. Il caftaric acid è stato identificato nella frazione in acetato di etile al tempo di ritenzione 15.5 min grazie al suo ione molecolare ( $m/z$  312) e alla frammentazione (Fig. 62).

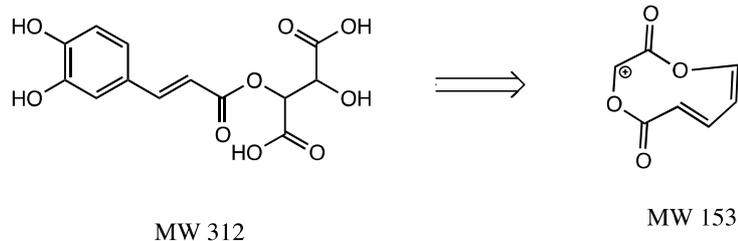


Figura 62: Frammenti di acido caftarico

Tra i derivati glicosidici degli acidi fenolici è da mettere in evidenza a  $t_R$  9.0 min il glucoside dell'acido neo-clorogenico: il caffeoylquinic-5-O-glucoside che presenta  $[M+H]^+$  a  $m/z$  516. e frammenti a  $m/z$  222 e a  $m/z$  132.

I flavonoli sono i composti presenti in maggiore quantità in *C. albidus*. Quercetin ( $t_R$  58.8 min; ione molecolare  $m/z$  301) è il composto più abbondante della frazione fenolica di questa specie. A  $t_R$  14.3 min è stata individuata la prunina (naringenin 7-O-glucoside), che è assente sia in *C. salvifolius* sia in *C. monspeliensis*, ma presente in *C. creticus*. Sono inoltre presenti myricetin-O-galloyl-hexoside ( $t_R$  17.7 min;  $[M-H]^-$   $m/z$  631), quercetin 3,4-diglucoside ( $t_R$  21.2 min;  $[M+Na]^+$   $m/z$  648), luteolin-7-O-rutinoside ( $t_R$  27.3 min;  $[M-H]^-$   $m/z$  593), rutina ( $t_R$  40.8 min;  $[M+Na+H]^+$   $m/z$  635) e myricetin 3-O-rutinoside ( $t_R$  42 min;  $[M+Na]^+$   $m/z$  649). Inoltre è presente l'isoflavone glycitin 6''-O-malonate ( $t_R$  32.1 min con  $[M+H]^+$   $m/z$  533) già identificato in *C. monspeliensis*.

I flavanoli sono rappresentati da procianidin ( $t_R$  35.7 min e ione molecolare  $m/z$  560), e 4,3',4' trimethyl catechin ( $t_R$  25.5 min; ione molecolare  $m/z$  332, picco base  $m/z$  167).

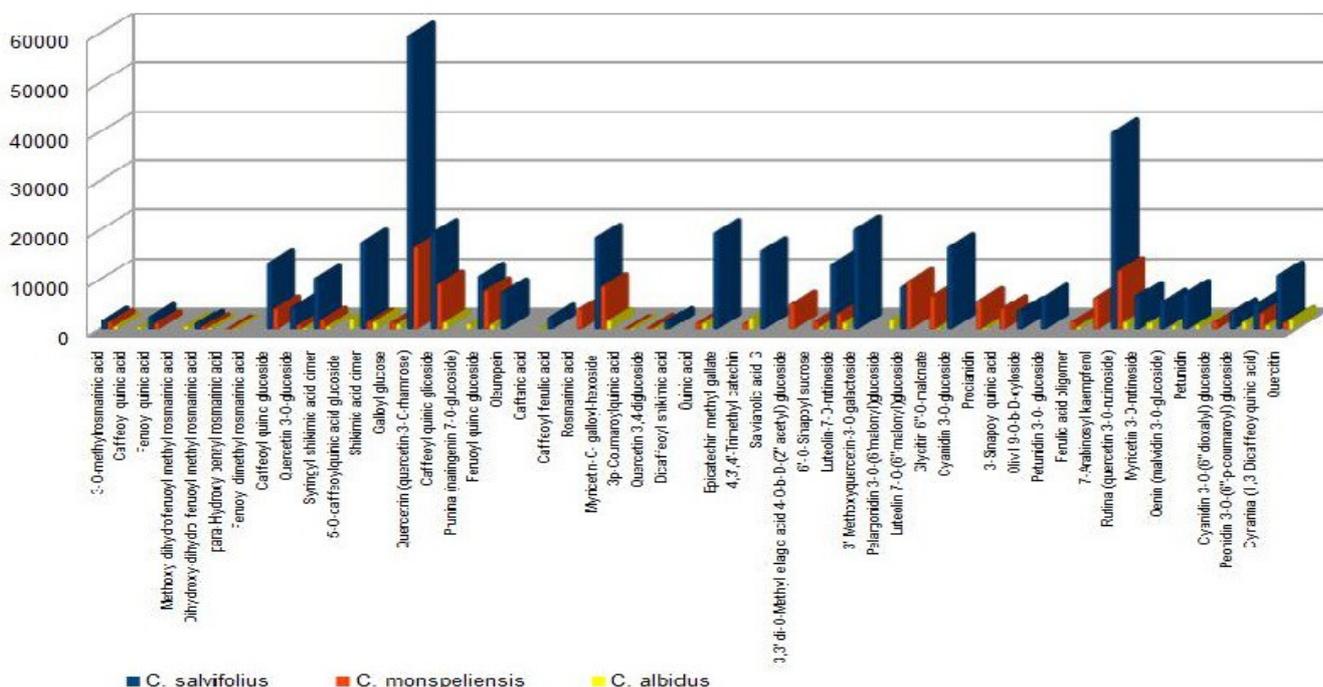


Figura 63: Analisi quantitativa dei composti fenolici nelle specie *Cistus salvifolius*, *Cistus monspeliensis* e *Cistus albidus*

Infine le antocianine, quasi assenti in *C. monspeliensis*, qui si trovano in discreta quantità e sono rappresentate da: pelargonidin 3-O-(6"malonyl)glucoside (32), malvidin 3-O-glucoside (45), petunidin (46) e peonidin 3-O-(6"-p-coumaroyl) glucoside(48).

Nella figura 63 è stata messa a confronto l'analisi quantitativa dei composti fenolici delle specie *Cistus salvifolius*, *Cistus monspeliensis* e *Cistus albidus*. Come si può notare è evidente come alcuni composti siano caratteristici di una particolare specie, mentre altri siano comuni, ma espressi in quantità diverse.

Nella figura 64 sono stati messi a confronto i profili fenolici di tutte le specie e sottospecie di *Cistus* studiate.

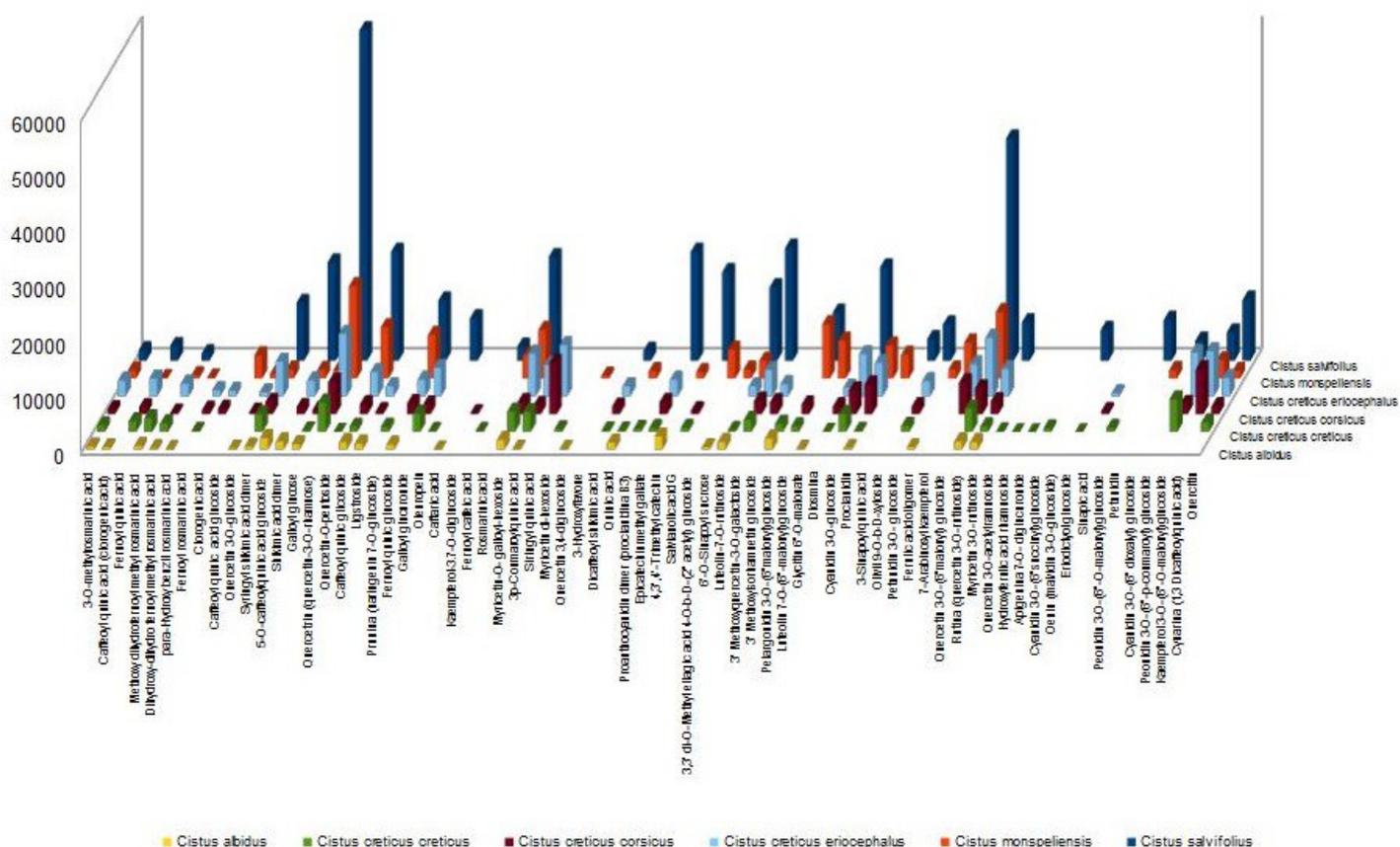


Figura 64: Frazione fenolica delle specie e sottospecie di *Cistus* studiate

Nella figura 65 è messa confronto l'analisi quantitativa della frazione fenolica, divisa per classi di composti, delle specie e sottospecie di *Cistus* presenti in Sardegna.

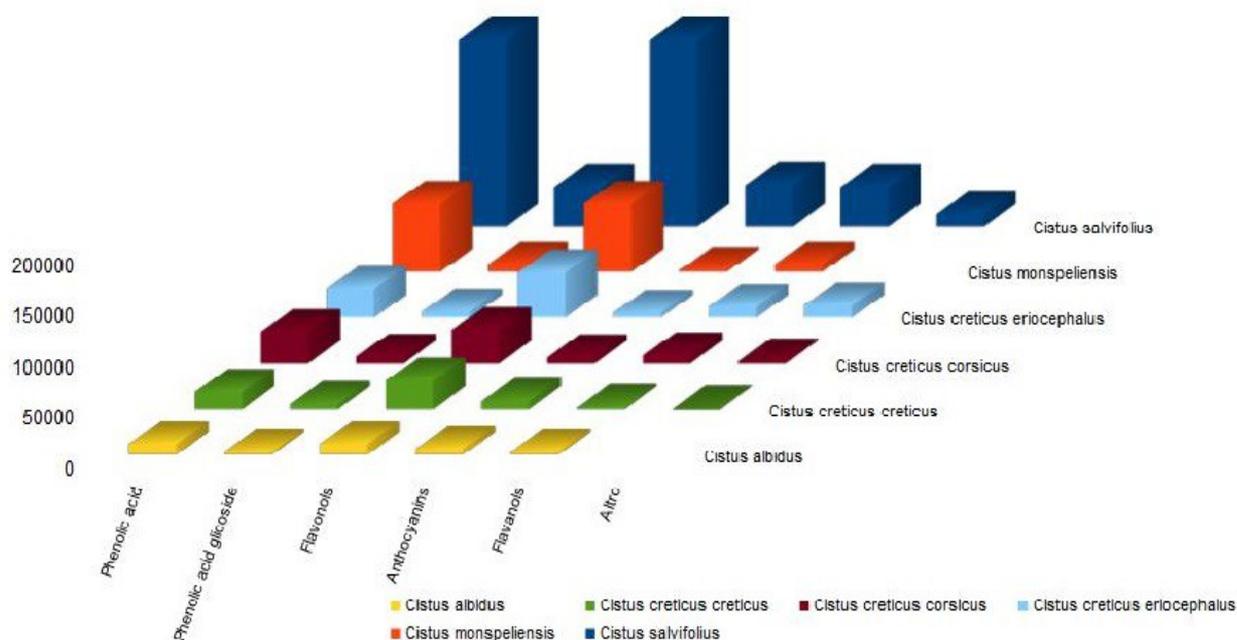


Figura 65: Frazione fenolica, divisa per classi di composti, delle specie e sotto specie di *Cistus* studiate

Le specie studiate, pur nella loro diversità, sono caratterizzate da un alto contenuto di acidi fenolici e i loro derivati glicosidici, in modo particolare di acido rosmarinico e derivati, e dall'acido dicaffeoyl chinico. Un'altra classe di composti fenolici ben rappresentata in tutte le specie e sottospecie sono i flavonoli con la quercetina e i suoi derivati.

Un altro dato comune alle specie e sottospecie di *Cistus* sardo è la presenza di alcuni composti della famiglia della catechine, anche se non ne rappresentano i componenti principali, in contrasto con quanto affermato in studi eseguiti su specie di Cisto raccolto in altre aree del Mediterraneo (Petereit F. et al., 1992; Danne et al., 1994).

*C. salvifolius* è la specie quantitativamente più ricca di composti fenolici, tra questi quercetrin e rutin sono i componenti più abbondanti. E' da notare la presenza di alcuni composti come l'oleuropein, l'olivil 9-O-b-D-xyloside e il salvianolic acid G, completamente assenti nelle altre specie.

*C. albidus* si è rivelata la specie con un contenuto fenolico poco interessante dal punto di

vista quantitativo anche se con un buon numero di composti di cui alcuni presenti solo in questa specie come il 3- caffeoyl quinic acid e la prunina.

### 3.2.2 Raccolta 2015 *C. creticus* ssp

Nel 2015 la ricerca è proseguita con la raccolta delle tre sottospecie di *Cistus creticus*: *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. Le prime due sottospecie sono state raccolte nelle medesime stazioni dell'anno precedente (Cala Gonone per *C. creticus* subsp. *creticus* e Lago di Baratz per *C. creticus* subsp. *corsicus*). Il *C. creticus* subsp. *eriocephalus* nel 2015 non era più presente nella stazione di Cala Gonone dove era stato raccolto nel 2014 (la stazione constava di poche piante, che a causa di un incendio erano andate

distrutte), quindi è stata individuata un'altra stazione di raccolta nei pressi di Bonannaro.

Queste tre sottospecie sono state studiate presso il laboratorio CPN dell'Università di Corte con l'obiettivo di confrontare differenti metodologie di estrazione e di analisi. In questo caso è stata utilizzata sia l'estrazione a freddo con metanolo sia l'estrazione a caldo utilizzando un Soxhlet con diversi solventi: metanolo, esano e acetato di etile. La caratterizzazione dei composti è stata

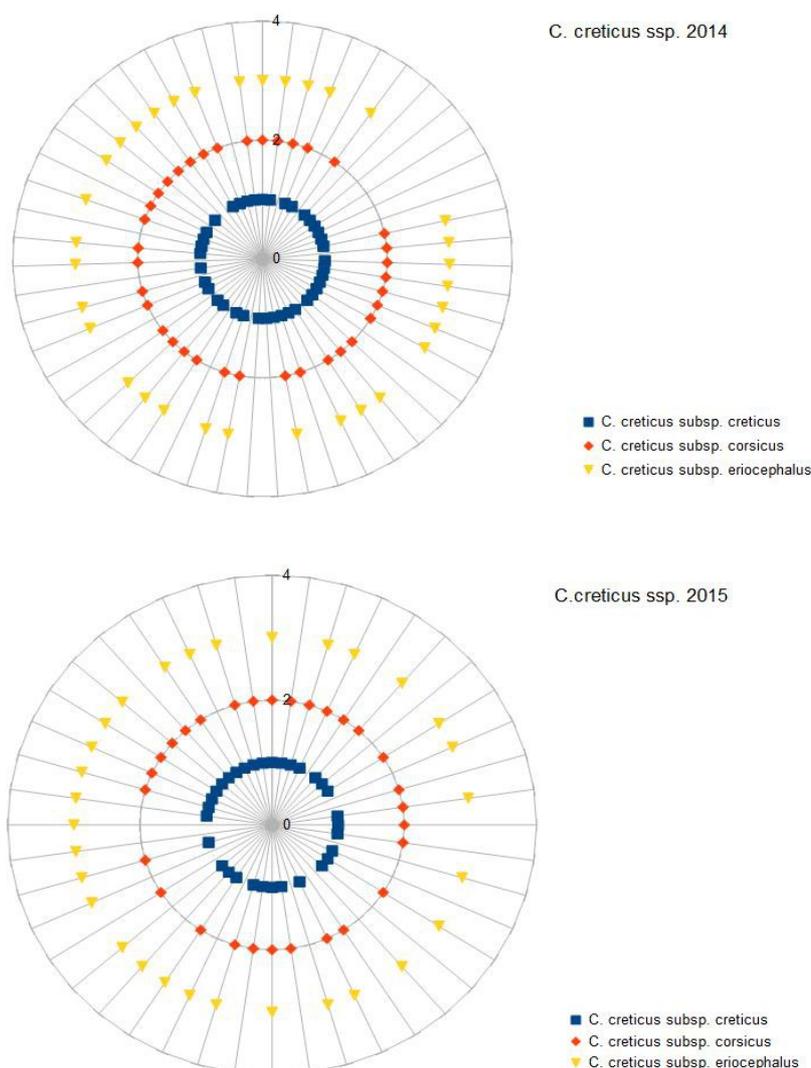


Figura 66: Confronto tra frazioni fenoliche dei campioni delle sottospecie di *C. creticus* raccolte nel 2014 e nel 2015.

eseguita utilizzando un apparecchio CL-UHP-SM/SM (Paragrafo 2.5.2.1). Nella tabella 17 sono indicati i composti fenolici individuati

Gli estratti delle sottospecie di *C. creticus* raccolte nel 2015 hanno mostrato alcune differenze con i campioni raccolti nell'anno precedente.

Nella figura 66 sono stati confrontate le frazioni fenoliche dei campioni delle sottospecie di *C. creticus* raccolte nel 2014 e nel 2015.

Nell'analisi dei risultati è necessario tenere conto delle diverse tecniche di estrazione e di analisi utilizzate rispetto a quanto riportato per l'anno 2014. Le differenti tecniche sia di estrazione con metanolo a freddo non acidificato, sia con gli altri solventi a riflusso, hanno fornito estratti con composizione differente, sia pur non drasticamente, rispetto a quanto ottenuto con il metanolo leggermente acidificato nell'anno precedente, in generale possiamo affermare che i dati sono complementari.

In accordo con i dati presenti nelle tabelle precedentemente analizzate e come la figura 66 mette in evidenza si può affermare, per tutti i campioni raccolti nei due anni differenti, che esistono alcune differenze tra il profilo fenolico di *C. creticus* subsp. *creticus* e le altre due sottospecie. Tuttavia è evidente che i composti fenolici seguono lo stesso andamento, indipendentemente dal metodo di estrazione, fatto che conferma la classificazione botanica in sottospecie. E' da notare una maggiore similitudine tra *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* per quel che concerne la composizione metabolica: per esempio si può osservare come nella subsp. *creticus* la varietà di fenoli è più numerosa rispetto a quella del *C. creticus* subsp. *corsicus* e a quella del *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, anche se l'estrazione è stata effettuata in condizioni differenti. Queste osservazioni confermano quanto già evidenziato dall'analisi dei risultati ottenuti nella caratterizzazione degli oli essenziali precedentemente discussa in cui le tre sottospecie di *Cistus creticus* presentano una buona similitudine anche nei profili dei composti volatili (cfr. Paragrafo 3.1).

Compound	Rt (min)	<i>C. creticus subsp. corsicus</i>				<i>C. creticus subsp. creticus</i>				<i>C. creticus subsp. eriocephalus</i>		
		MeOH	SOX MeOH	SOX esano	SOX EtAc	MeOH	SOX MeOH	SOX esano	SOX EtAc	MeOH	SOX MeOH	SOX esano
Quinic acid	2,4	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Shikimic acid	2,4	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Gallic acid	5	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Rutine	7,9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Epicatechin	8	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Datiscin	8,2	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Methylgallate	8,3	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Quercetin-3-O-glucopyranoside	8,3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Luteolin-7-O-glucoside	8,4	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Myricitrine	8,4	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Kaempferol-3-O-glucoside	8,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apigetrin	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Naringenin-7-O-glucoside	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quercitrine	8,8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Neohesperidine	8,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trilobatin	9,5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Vanillin	9,5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Acetoisovanillone	9,7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Didymine	9,7	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Poncirine	9,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2',6'-dihydroxy-4-methoxychalcone-4'-O-neohesperidoside	9,8	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Tiliroside	9,9	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Eriodictyol	1-,6	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
3',4',5,7-tetrahydroxy-3-methoxyflavone	11	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Eriodictyolchalcone	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apigenine	11,3	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Cupressoflavone	11,3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Chryseriol	11,4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Amentoflavone	11,4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naringenine	11,4	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Cupressoflavone	11,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaempferol	11,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eupatorin	12,6	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavanone	12,8	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Oroxyline A	13,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5,7-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone	13,1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isorhamnetin	13,2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Acacetine	13,4	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Isosakuranetine	13,5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Pinocembrin	13,7	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
Kaempferide	13,8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Dihydrocaffeic acid	14,1	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Caffeic acid	14,2	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
P-Coumaric acid	16,4	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabella 17: Composizione fenolica dei diversi estratti delle tre sottospecie di *Cistus creticus* raccolte nel 2015

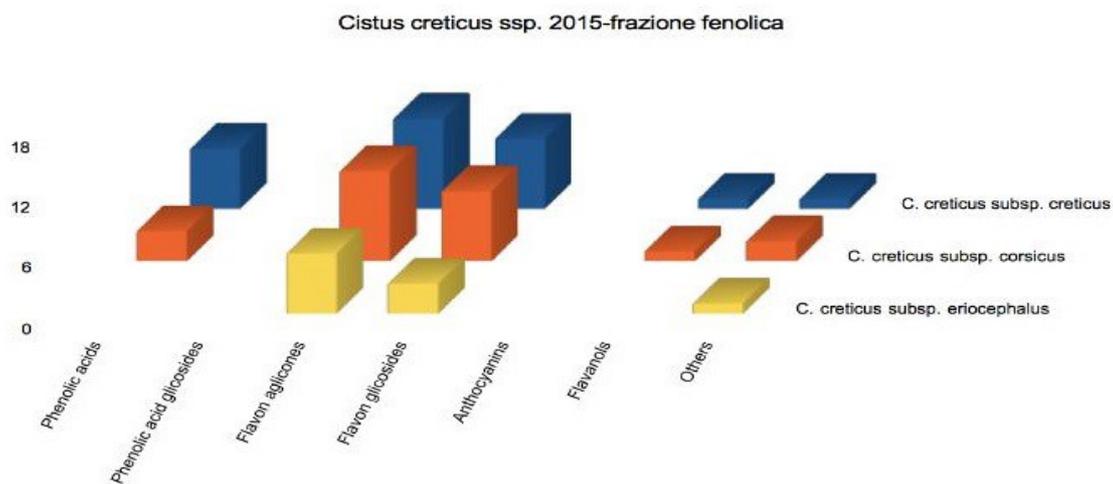
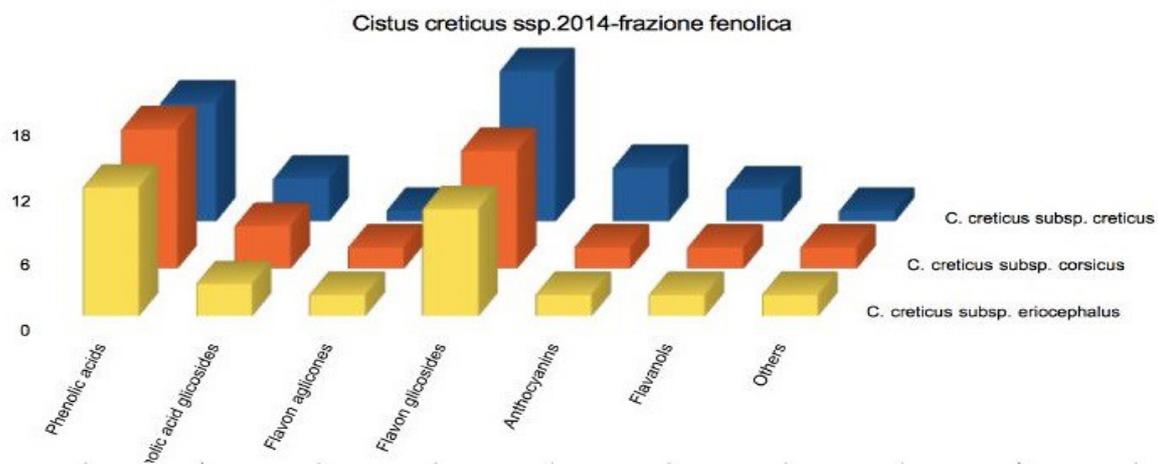


Figura 67: Confronto delle frazioni fenoliche estratte per macerazione in metanolo acidificato e metanolo non acidificato, divise per tipologie di composti, dei campioni delle sottospecie di *C. creticus* raccolti nel 2014 e nel 2015.

Nella figura 67 sono stati confrontati i profili fenolici degli stessi campioni divisi per tipologie di composti. Il primo dato evidente è l'assenza, negli estratti derivati dalla raccolta del 2015, delle antocianine e dei glicosidi degli acidi fenolici. Le altre classi di composti sono presenti sia negli estratti del 2014 sia in quelli del 2015 anche se in proporzioni differenti. Queste differenze sono dovute alle diverse condizioni di estrazione indagate. Per quanto riguarda l'estrazione a freddo con metanolo, si nota una significativa differenza tra l'estrazione per macerazione a freddo con metanolo tal quale e l'estrazione per macerazione a freddo con metanolo leggermente acidificato.

La capacità estrattiva dei due sistemi è risultata diversa, rivelando che la leggera acidificazione del metanolo consente di ottenere un maggior numero di molecole fenoliche. Dall'analisi dei dati si osserva come gli acidi fenolici e i loro glicosidi aumentino molto la loro solubilità in presenza di tracce di acido, infatti la protonazione del carbossile permette una maggiore solubilità in un solvente organico, sia pur polare, come il metanolo (il pH fisiologico della cellula vegetale è compreso tra 7,5 e 8,0 e quindi il carbossile sarà in forma carbossilata). Questo fenomeno è maggiormente evidente, quando gli acidi fenolici sono glicosilati con gli zuccheri che aumentano ulteriormente l'idrofilità di questi composti, in questo caso, se il metanolo non è acidificato i glicosidi degli acidi fenolici non vengono estratti dalla biomassa.

Un discorso a parte meritano le antocianine, infatti l'equilibrio tra le varie forme isomeriche, riportato in figura 68, ci indica come la forma a pH 4-5 sia il miglior candidato per la solubilizzazione in metanolo, quindi l'uso di tracce di acido ci permette un'efficace estrazione di questi composti (Vatai T. et al., 2009). Nel caso di pH fisiologico, le antocianine sono sotto forma di anione chinonico poco solubile in metanolo. Qualora il pH fosse spostato verso valori fortemente acidi le antocianine si trasformerebbero in ioni flavilio, nuovamente insolubili in metanolo mentre a pH decisamente basici, le antocianine si trasformerebbero in calconi, nuovamente solubili in solventi organici.

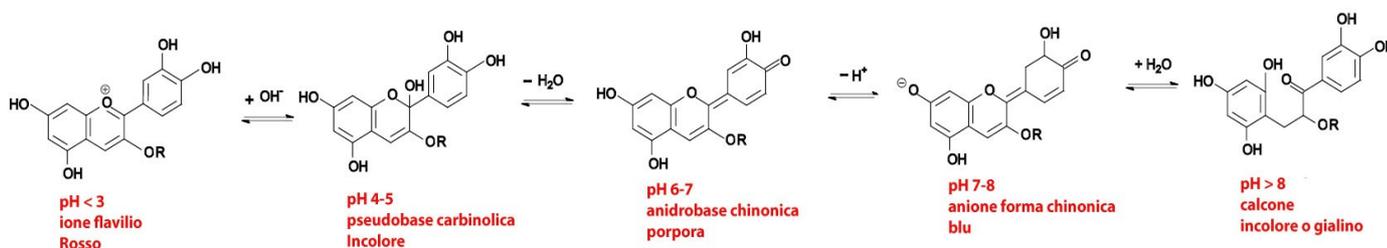


Figura 68: Equilibrio tra le varie forme delle antocianine al variare del pH.

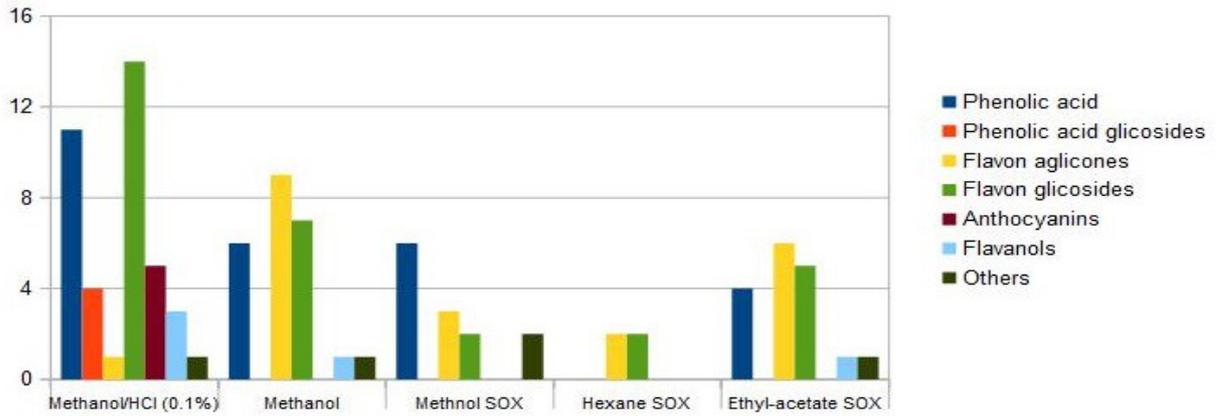
Per quanto riguarda l'estrazione con i solventi in Soxhlet, va fatto notare che il riscaldamento prolungato di estratti polifenolici può portare alla degradazione di alcuni composti dando luogo a artefatti (Buchner et al., 2006), in particolare potrebbe favorire l'idrolisi di glicosidi, a conferma di questo abbiamo riscontrato una maggiore presenza di agliconi negli estratti a caldo.

E' stato eseguito anche un confronto tra tutti i metodi di estrazione indagati e la ripartizione dell'estratto in metanolo acidificato in vari solventi (figura 69). Il metanolo a freddo acidificato si è dimostrato il sistema estrattivo più efficiente.

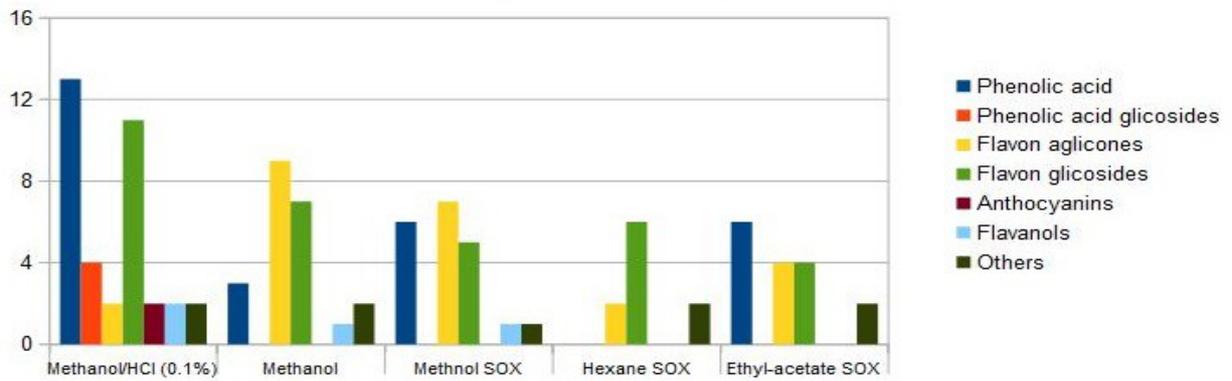
Come è possibile osservare, solo con metanolo acidificato si estraggono i glicosidi degli acidi fenolici e le antocianine, che non sono presenti negli altri estratti, con metanolo a caldo (Soxhlet) si ha una maggiore estrazione degli acidi fenolici rispetto a metanolo non acidificato, ma la maggior efficienza anche in questo caso è data dalla leggera acidificazione del metanolo. Con gli altri solventi a caldo l'estrazione non si è dimostrata particolarmente efficiente.

Abbiamo voluto confrontare la ripartizione dell'estratto metanolico acidificato in solventi a polarità differente con l'estrazione diretta a caldo (Fig. 70). L'estratto in metanolo acidificato, una volta privato del solvente, è stato disciolto in acqua e estratto con butanolo e etilacetato, ripartendo così i metaboliti in tre tipi di solvente: butanolo (poco polare), etil acetato (mediamente polare) e acqua (polare). Abbiamo voluto confrontare la composizione nei vari solventi con quella delle estrazioni in soxhlet a caldo con solventi a polarità crescente: esano (non polare), etil acetato (mediamente polare) e metanolo (polare). Nel confronto bisogna tenere conto del fatto che nell'estratto madre con metanolo acidificato erano presenti i glicosidi degli acidi fenolici e le antocianine che nel caso di estrazione in assenza di acido non erano state rilevate. Per cui prenderemo in considerazione le classi di composti presenti nell'estratto senza acidificazione (acidi fenolici, agliconi, flavoni glicosilati, flavanoli).

Cistus creticus creticus



Cistus creticus corsicus



Cistus creticus eriocephalus

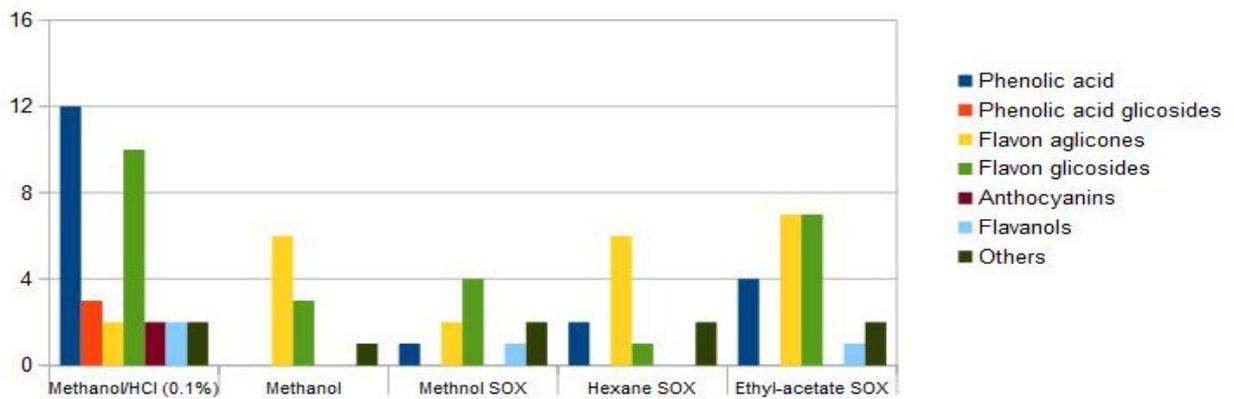


Figura 69: Confronto tra i vari metodi estrattivi

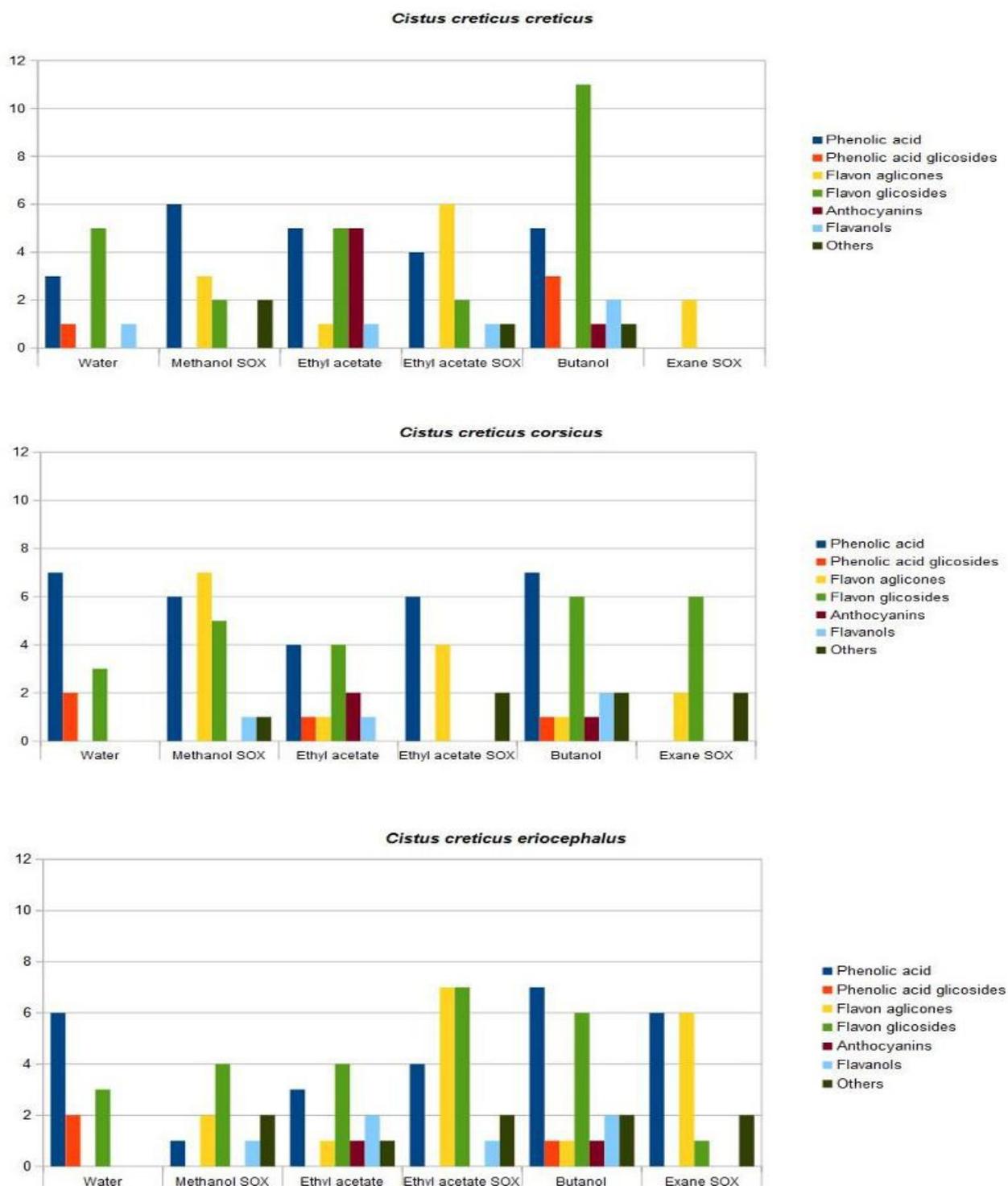


Figura 70: Confronto tra la ripartizione dell'estratto metanolico acidificato in solventi a polarità differente con l'estrazione diretta a caldo

#### Confronto tra la ripartizione in solvente polare (acqua) e l'estrazione con metanolo a caldo.

Nel prendere in considerazione i solventi polari, tenendo in opportuna considerazione la diversa modalità sperimentale (in pratica, in un caso l'estratto metanolico acidificato è stato ridisciolti in acqua e l'acqua estratta con due diversi solventi, nell'altro la biomassa è stata estratta direttamente con metanolo a caldo), si notano delle analogie importanti, anche se, come previsto gli acidi fenolici sono maggiormente solubili in acqua si nota molto bene, in particolare per il *C. creticus* subsp. *creticus*, che sono efficacemente estratti dal metanolo a caldo. Inoltre gli agliconi che nell'estrazione con metanolo acidificato erano poco presenti, vengono estratti completamente dall'acqua quando si effettua la ripartizione con acetato di etile, questo è confermato dal fatto che questi composti sono estratti molto bene dalla biomassa quando si opera con acetato di etile a caldo. Nel caso dell'estrazione con metanolo in Soxhlet gli agliconi vengono estratti direttamente dalla biomassa. Infine l'acqua trattiene molto bene i flavonoli glicosilati, che sono estratti efficacemente anche dal metanolo a caldo.

#### Confronto tra la ripartizione in etil acetato e l'estrazione con etil acetato a caldo.

Per quanto riguarda i solventi a media polarità in tutti e due i casi è stato utilizzato l'etilacetato. Nel caso della ripartizione l'etil acetato estrae dall'acqua una buona quantità di acidi fenolici, e di flavoni glicosilati, estrae inoltre flavanoli e agliconi. In questo caso si trova una buona corrispondenza con quanto ottenuto nell'estrazione di retta in Soxlet con lo stesso solvente. In questo caso vengono estratti direttamente dalla biomassa le stesse classi di composti.

#### Confronto tra la ripartizione in butanolo e l'estrazione con esano a caldo.

Per quanto riguarda i solventi a bassa polarità il confronto è stato eseguito tra un solvente poco polare come il butanolo e uno apolare come l'esano. Nel caso del *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, abbiamo un'ottima corrispondenza delle classi di molecole estratte. E' da notare una maggiore presenza di agliconi nell'estrazione con esano in Soxlet rispetto alla ripartizione in butanolo, anche se questi composti sono ben estratti dal butanolo; si deve ricordare che nel caso dell'estrazione con metanolo acidificato gli agliconi erano poco presenti già dall'inizio. Come atteso, il butanolo ha mostrato una maggiore affinità per gli acidi fenolici rispetto all'esano, che ha estratto questi composti solo nel caso del *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, probabilmente perché più ricco in questi composti.

### **3.3 Attività antibatterica e antifungina**

In collaborazione con il Dipartimento di Chimica e Farmacia, Laboratorio di Microbiologia (Università degli Studi di Sassari), sono stati eseguiti i test di attività antibatterica e antifungina sugli estratti di *C. salvifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. albidus* L., *C. creticus* L. subsp.

creticus, *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* e *C. creticus* L. subsp. *corsicus* raccolti nella primavera 2014.

L'attività antibatterica è stata testata usando due diversi ceppi batterici, solitamente utilizzati come modelli di batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativi (*Escherichia coli*), mentre per l'attività antifungina sono stati utilizzati *Candida albicans* e altri tre ceppi di *Candida* di origine clinica (paragrafo 2.6.1).

I risultati relativi alla valutazione dell'attività antimicrobica hanno consentito di delineare un primo quadro in merito alla presenza e all'intensità dell'azione inibente espressa dagli estratti oggetto dello studio, nei confronti dei microrganismi scelti per il test.

Com'è possibile vedere dalle tabelle 18,19 e 20, gli estratti saggiati hanno evidenziato azioni piuttosto simili anche se con specifiche differenze in accordo con le diverse tipologie di estrazione e in funzione dei diversi ceppi microbici testati, con valori di MIC compresi in un range tra 1.25 e 24.8 mg/mL.

I campioni ottenuti dal frazionamento in butanolo hanno mostrato di avere tutti una maggiore attività verso *S.aureus* (MIC 1.25 mg/mL) ad eccezione di *C. albidus* che presenta una MIC di 2.5 mg/mL. L'attività verso *E. coli* e i quattro ceppi di *Candida* è sensibilmente più bassa come si può vedere nella tabella 18.

Anche i campioni estratti in acetato di etile (Tabella 19) hanno mostrato di avere una maggiore attività inibitoria verso *S. aureus*, con MIC 2.5 mg/mL per *C. c. corsicus* e *C. c. eriocephalus*, e MIC 1.25 mg/mL per gli altri estratti. Per quel che concerne l'attività nei confronti di *E. coli*, gli estratti di *C. c. corsicus* e *C. albidus* sono risultati i più attivi con MIC 1.25 mg/mL, *C. salvifolius* ha presentato un effetto più blando (2.5 mg/mL), mentre per *C.c. creticus*, *C.c. eriocephalus* e *C. monspeliensis* abbiamo osservato valori di MIC più alti (5 mg/mL).

Species	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida</i> ATCC 10231	<i>Candida</i> SPP 1	<i>Candida</i> SPP2	<i>Candida</i> SPP3
<i>C. c. creticus</i>	5	1,25	5	5	5	5
<i>C. c. corsicus</i>	5	1,25	5	5	5	5
<i>C.c. eriocephalus</i>	> 5	1,25	5	5	5	5
<i>C. albidus</i>	> 5	2,5	10	10	10	10
<i>C. salvifolius</i>	> 5	1,25	> 5	> 5	> 5	> 5
<i>C. monspeliensis</i>	> 5	1,25	10	10	10	10

Tabella 18: Valori di MIC degli estratti butanolici delle specie di *Cistus* in esame. I valori sono espressi in mg/ml.

Species	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida</i> ATCC 10231	<i>Candida</i> SPP 1	<i>Candida</i> SPP2	<i>Candida</i> SPP3
<i>C. c. creticus</i>	5	1,25	>5	>5	>5	>5
<i>C. c. corsicus</i>	1,25	2,5	>5	>5	>5	>5
<i>C.c. eriocephalus</i>	5	2,5	>5	>5	>5	>5
<i>C. albidus</i>	1,5	1,25	>5	>5	>5	>5
<i>C. salvifolius</i>	2,5	1,25	>5	>5	>5	>5
<i>C. monspeliensis</i>	>5	1,25	>5	>5	>5	>5

Tabella 19: Valori di MIC degli estratti in acetato di etile delle specie di *Cistus* in esame. I valori sono espressi in mg/ml.

Species	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>Candida</i> ATCC 10231	<i>Candida</i> SPP 1	<i>Candida</i> SPP2	<i>Candida</i> SPP3
<i>C. c. creticus</i>	24.8	6.2	24.8	24.8	24.8	24.8
<i>C. c. corsicus</i>	24.8	6.2	24.8	24.8	24.8	24.8
<i>C.c. eriocephalus</i>	24.8	6.2	24.8	24.8	24.8	24.8
<i>C. albidus</i>	24.8	12.4	24.8	24.8	24.8	24.8
<i>C. salvifolius</i>	24.8	6.2	24.8	24.8	24.8	24.8
<i>C. monspeliensis</i>	24.8	6.2	24.8	24.8	24.8	24.8

Tabella 20: Valori di MIC degli estratti in acqua delle specie di *Cistus* in esame. I valori sono espressi in mg/ml.

Nel caso dei ceppi di *Candida*, è stata osservata un'inibizione della crescita alle concentrazioni più alte (MIC 5 mg/mL), confermando la bassa sensibilità di queste specie di funghi agli estratti di *Cistus* studiati.

Infine, tutti gli estratti acquosi hanno dimostrato un'efficacia piuttosto limitata, con valori di MIC decisamente alti nei riguardi sia di *E. coli* (MIC 24.8 mg/mL) che dei ceppi di *Candida* (MIC 24.8 mg/mL), dimostrando la scarsa azione inibente di questo tipo di estratti rispetto agli altri estratti esaminati. In accordo con questa bassa attività inibente degli estratti acquosi, le MIC osservate nei riguardi di *S. aureus* sono relativamente alte e sono comprese in valori tra 6.2 e 12.4 mg/mL (Tabella 20).

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno messo in evidenza che i batteri Gram-positivi sono

più sensibili dei batteri Gram-negativi agli estratti vegetali studiati, dato confermato anche da studi precedenti (Proestos et al., 2006; Mahboubi and Haghi, 2008; Boukhebt et al., 2011) e dovuto probabilmente alla presenza di lipopolisaccaridi idrofobici sulla superficie della membrana dei batteri Gram-negativi, dove svolgono azione protettiva (Nikaido and Vaara, 1985), non permettendo alle sostanze studiate di esplicare l'effetto inibente o riducendolo in maniera drastica.

Non esistendo lavori precedenti sull'attività antimicrobica delle diverse specie di Cisto presenti in Sardegna, i dati ottenuti in questo lavoro sono stati confrontati con i risultati ottenuti da altri Autori in lavori eseguiti su specie del genere *Cistus* anche diverse da quelle studiate in questa ricerca. Per esempio, Bouamama et al. (1999; 2006) riferiscono che l'estratto acquoso di *C. incanus* e *C. monspeliensis* dimostrano un'attività antimicrobica decisamente diversa. In particolare, l'estratto di *C. villosus* presenta un'azione inibente maggiore contro *S. aureus* (MIC 0.8 mg/mL) e *Candida glabrata* (MIC 0,2 mg/mL) rispetto a *C. monspeliensis* (MIC 1.6 mg/mL per entrambi i microrganismi).

Barrajón-Catalán et al. nel 2010 hanno studiato l'attività antimicrobica su *S.aureus* e *E.coli* degli estratti acquosi di *C. ladanifer* (con MIC rispettivamente 0.154 mg/mL e 0.9 mg/mL) e *C. populifolius* (MIC 0.344 mg/mL e 0.123 mg/mL, rispettivamente). Uno studio condotto da Rebaya et al. (2016) su *C. salvifolius* e *C. monspeliensis* ha evidenziato che gli estratti etanolici testati mostrano un'azione inibente più alta verso *S. aureus* (MIC 1.562 mg/mL), mentre le MIC osservate verso *E. coli* sono decisamente più alte (12.5 mg/mL). Infine, Mahmoudi et al. (2016) riportano valori di MIC per *C. salvifolius* e *C. monspeliensis* comprese tra 3.1 e 25 mg/mL e 6.3- 12.5 mg/mL rispettivamente, in relazione ai diversi microrganismi testati.

Dalla ricerca bibliografica è emerso che i dati sull'effetto antimicrobico espresso dagli estratti naturali viene valutato in modo diverso. Alcuni Autori considerano significativi valori di MIC inferiori a 100 µg/mL di estratto e moderati quando sono compresi in un range tra 100 e 625 µg/mL (Kueete et al, 2011). Pertanto, i risultati ottenuti in questa ricerca sugli estratti in butanolo e acetato di etile possono essere considerati moderati per tutte le specie di *Cistus*. Precedentemente a questo studio, erano stati descritti criteri diversi di valutazione da Fabry et al. (1998), che considerano come attività antimicrobica degna di nota, per gli estratti vegetali, valori di MIC di 8 mg/mL. Nel contesto di questi criteri di valutazione meno rigorosi, possiamo considerare significativa l'attività complessiva degli estratti studiati.

Nel 2001 Aligiannis et al. hanno invece proposto una classificazione per gli effetti degli estratti

vegetali sulle varie specie di *Candida*, basata sui valori di MIC ottenuti: forti inibitori (MIC fino a 0.5 mg/mL), moderati (MIC comprese tra 0.6 e 1.5 mg/mL), deboli con MIC superiori a 1.6 mg/mL. In base a questa classificazione, si può quindi affermare che gli estratti in studio hanno dimostrato di non possedere effetti inibenti sulle diverse specie di *Candida*.

Dai test effettuati è emerso che gli estratti ottenuti utilizzando le parti aeree delle diverse specie di *Cistus* presenti in Sardegna, hanno mostrato significativa inibizione della crescita di *Staphylococcus aureus*, giustificando l'uso del Cisto nella medicina tradizionale per la cura di infezioni cutanee, e una debole azione antibatterica nei confronti di *Escherichia coli*, mentre sono risultati essere completamente inefficaci nei confronti di *Candida albicans* e dei tre ceppi clinici di *Candida* testati.

Sulla base di precedenti studi fitochimici svolti sul genere *Cistus* (Daglia, 2012; Barraji n-Catalán et al., 2010; Rubio-Moraga et al., 2013), l'attivit  antibatterica degli estratti di Cisto pu  essere attribuita alla presenza dei composti fenolici. Pertanto, sarebbe necessario approfondire la ricerca per cercare la relazione tra i composti fenolici identificati nelle specie di *Cistus* studiate e la loro attivit  antimicrobica.

## CONCLUSIONI

La famiglia delle *Cistaceae* comprende numerosi generi diffusi in prevalenza nel bacino del Mediterraneo. Le diverse specie del genere *Cistus* sono usate frequentemente nella medicina popolare nel trattamento di diverse patologie dermatologiche, dei reumatismi, della febbre e della diarrea e come odontalgico. Al giorno d'oggi l'infuso delle foglie di *Cistus incanus* (“*Cistus tea*”) viene usato come integratore alimentare nella dieta.

In Sardegna il Cisto è estremamente diffuso su tutto il territorio, tanto da essere considerato infestante, e gioca un ruolo importante come pianta pioniera nei terreni abbandonati o colpiti dagli incendi. Nella tradizione etnobotanica sarda i preparati di Cisto sono sempre stati utilizzati per la cura delle più svariate patologie.

Questo lavoro trova la sua motivazione dal fatto che, nonostante la sua diffusione, in Sardegna il cisto è stato poco considerato e in letteratura è stato pubblicato solo uno studio (Paolini et al., 2009) sulla composizione dell'olio essenziale di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto nel Nord- Sardegna. Non esistono altri studi riguardanti né gli oli essenziali e né il profilo fenolico delle altre specie sarde. Inoltre, non è stato ancora risolto completamente il problema dell'inquadramento botanico delle specie del genere *Cistus* in particolare delle tre sottospecie di *C. creticus*.

Nel presente lavoro di tesi di dottorato l'attenzione è stata rivolta, oltre che alla caratterizzazione chimica anche allo studio dell'attività antimicrobica degli estratti.

L'analisi comparativa determinata per via gascromatografica sulla composizione degli oli essenziali di *C. salvifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. albidus* L., *C. creticus* L. subsp. *creticus*, *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* e *C. creticus* L. subsp. *corsicus* ha mostrato l'esistenza di sei diversi profili. *C. creticus* subsp. *eriocephalus* mostra un'alta quantità di manoyl oxide e dei suoi isomeri. *C. salvifolius* ha messo in evidenza il gruppo dei labdani mentre un'altra consistente percentuale è costituita da molecole profumate come lo ionone ed i suoi derivati. Gli idrocarburi lineari rappresentano la percentuale maggiore in *C. monspeliensis* e l'heneicosane è il composto principale. In *C. albidus* non sono stati identificati diterpeni del gruppo dei labdani. L'analisi del *C. creticus* subsp. *creticus* ha rivelato la presenza di diversi sesquiterpeni ossigenati e di diterpeni del gruppo dei labdani. *C. creticus* subsp. *corsicus* è qualitativamente simile al *C. creticus* subsp. *creticus*, soprattutto per quel che concerne i composti labdanici. Per quel che riguarda i campioni

delle tre sottospecie di *C. creticus* raccolte nel 2015, gli oli essenziali di *C. creticus* subsp. *creticus* e *C. creticus* subsp. *corsicus* hanno confermato, con minime differenze, i profili dei campioni dell'anno precedente. Nell'olio essenziale di *C. creticus* subsp. *creticus* i costituenti principali sono i sesquiterpeni ossigenati  $\alpha$ -eudesmol e  $\tau$ -muurolol e tra i labdani il 13-epi manoyl oxyde. Anche in questo caso il *C. creticus* subsp. *corsicus* è qualitativamente simile al *C. creticus* subsp. *creticus*, con il  $\beta$ -eudesmol ed il 13-epi manoyl oxyde come maggiori costituenti. Il campione di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolto nel 2015 a Bonnanaro non ha prodotto olio essenziale in contrasto con il campione del 2014 raccolto a Calagonone.

La microestrazione in fase solida (SPME) degli stessi campioni ha evidenziato la presenza in *C. creticus* subsp. *creticus* dei monoterpeni  $\alpha$ -pinene e camphene, in *C. creticus* subsp. *corsicus*  $\alpha$ -pinene e una buona percentuale di  $\beta$ -bourbonene. Il *C. creticus* subsp. *eriocephalus* è invece caratterizzato dal limonene e dal nonanal.

Nel corso della ricerca si è ritenuto opportuno cercare di fare chiarezza sui dati discordanti ottenuti sulla presenza/assenza di olio essenziale in campioni di *C. creticus* subsp. *eriocephalus* raccolti a Cala Gonone (2014) e Bonnanaro (2015) e allo scopo sono state individuate sette stazioni di raccolta sparse sul territorio isolano. L'estrazione per idrodistillazione e la caratterizzazione condotta per via GC/MS ci ha permesso di suddividere i campioni in due gruppi: uno costituito da esemplari che non contengono oli essenziali come Bonnanaro, Monte Arci e Monte Nieddu; e un secondo che comprende i campioni contenenti oli essenziali come Pixinamanna, Monte Doglia, Cala Gonone e Costa Paradiso. Quantitativamente, la frazione maggiore dei quattro oli è costituita dai sesquiterpeni ossigenati in modo particolare nei campioni di Monte Doglia e di Pixinamanna. Presenti nei campioni del secondo gruppo sono anche i composti della classe dei diterpeni ossigenati presenti in buona quantità nel campione di Cala Gonone e tutti contengono il marker tassonomico manoyl oxide.

Dai risultati ottenuti si può ipotizzare che i campioni contenenti olio essenziale siano degli ibridi o quantomeno popolazioni che abbiano subito delle contaminazioni, nonostante dal punto di vista botanico le piante di tutti e sette i campioni raccolti siano morfologicamente indistinguibili. Lo studio richiederebbe un maggiore approfondimento dal punto di vista genetico.

Per quanto riguarda la frazione fenolica del Cisto sardo, non sono conosciuti studi sull'argomento. Nella presente tesi di dottorato è stata proposta per la prima volta l'analisi delle frazioni fenoliche di tutte le specie e sottospecie di Cisto vegetanti in Sardegna.

Le specie e sottospecie studiate, pur nella loro diversità, sono caratterizzate da un alto contenuto di acidi fenolici e i loro derivati glicosidici, in modo particolare di acido rosmarinico e

derivati, e dall'acido dicaffeoyl chinico. Un'altra classe di composti fenolici ben rappresentata sono i flavonoli con la quercetina e i suoi derivati. Un altro dato comune alle specie e sottospecie di *Cistus* sardo è la presenza di alcuni composti della famiglia della catechine, anche se non ne rappresentano i componenti principali, in contrasto con quanto affermato in studi eseguiti su specie di Cisto raccolto in altre aree del Mediterraneo. *C. salvifolius* è la specie quantitativamente più ricca di composti fenolici, tra questi quercetrin e rutin sono i componenti più abbondanti. Interessante la presenza di alcuni composti come l'oleuropein, l'olivil 9-O-b-D-xyloside, completamente assenti nelle altre specie. Il *C. albidus* si è rivelata la specie con un contenuto fenolico poco interessante dal punto di vista quantitativo anche se con un buon numero di composti.

Con l'obiettivo di confrontare differenti metodologie di estrazione e di analisi le tre sottospecie di *Cistus creticus* sono state studiate presso il laboratorio CPN dell'Università di Corte.

Le differenti tecniche sia di estrazione con metanolo a freddo non acidificato, sia con gli altri solventi a riflusso, hanno fornito estratti con composizione differente, sia pur non drasticamente, rispetto a quanto ottenuto con il metanolo leggermente acidificato nell'anno precedente. In generale possiamo affermare che i dati sono complementari e che, per tutti i campioni raccolti nei due anni differenti, esistono alcune differenze tra il profilo fenolico di *C. creticus* subsp. *creticus* e le altre due sottospecie. Tuttavia è evidente che i composti fenolici seguono lo stesso andamento, indipendentemente dal metodo di estrazione, fatto che conferma la classificazione botanica in sottospecie. E' da notare una maggiore similitudine tra *C. creticus* subsp. *corsicus* e *C. creticus* subsp. *eriocephalus* per quel che concerne la composizione metabolica. Per quanto riguarda l'estrazione a freddo con metanolo si nota una significativa differenza tra l'estrazione per macerazione a freddo con metanolo tal quale e l'estrazione per macerazione a freddo con metanolo leggermente acidificato.

La capacità estrattiva dei due sistemi è risultata diversa rivelando che la leggera acidificazione del metanolo consente di ottenere un maggior numero di molecole fenoliche.

L'attività biologica è stata testata sugli estratti metanolici dei campioni raccolti nel 2014. Gli estratti fenolici agiscono sulla crescita di batteri, sia Gram-positivi che Gram- negativi, mentre non è stata evidenziata attività verso i miceti del genere *Candida*. Questo fatto suggerisce che i composti presenti negli estratti possono giocare un ruolo attivo nella protezione da diverse patologie, in particolare verso *Staphylococcus aureus*.

I risultati ottenuti in questo lavoro di ricerca costituiscono un valido contributo ad una maggiore conoscenza del grande patrimonio vegetale della Sardegna, nell'ottica di una sua

valorizzazione come potenziale fonte di molecole bioattive, che potrebbe trovare ampie applicazioni da parte dell'industria alimentare (additivo naturale per l'industria di trasformazione), cosmetica (in pillole o aggiunto in formulazioni cosmetiche varie) e farmaceutica e fitoterapica (ingrediente per integratori alimentari); inoltre, dal punto di vista della classificazione tassonomica, come punto di partenza per approfondite indagini genetiche.

**THÈSE DE DOCTORAT EN CHIMIE**  
UNIVERSITÀ DI CORSICA-PASQUALE PAOLI  
ECOLE DOCTORALE « ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ »  
UMR CNRS 6134 « SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT »

*Problématique de Thèse et Principaux Résultats*

**Caractérisation des métabolites secondaires présents dans diverses espèces de Ciste (fam. *Cistaceae*) de Sardaigne**

Les *Cistaceae* sont une famille de plantes herbacées ou ligneuses comprenant de nombreuses espèces typiques de l'aire méditerranéenne; les compositions chimiques des huiles essentielles de différentes espèces de Ciste ont été abondamment décrites dans la littérature. De même, différents composés phénoliques ont été identifiés et une activité antimicrobienne significative des extraits de ces plantes a été mise en évidence. Le genre *Cistus* L., très répandu dans toute la Sardaigne, est représenté par différentes espèces : *C. salvifolius* L., *C. monspeliensis* L., *C. albidus*, *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, (Viv.) Greuter & Burdet, *C. creticus* L. subsp. *creticus* and *C. creticus* L. subsp. *corsicus*, (Loisel.) Greuter & Burdet. Cette dernière est considérée comme un taxon endémique corso-sarde. Bien que certaines espèces du genre *Cistus* L. soient particulièrement abondantes dans le maquis sarde et que leur intérêt en ethnobotanique soit reconnu, nous ne trouvons qu'un faible nombre de travaux dans la littérature traitant de la nature et de la teneur des principes actifs, notamment en ce qui concerne les composés phénoliques.

L'objectif de ce travail est de réaliser des études comparatives qualitatives et quantitatives des huiles essentielles, d'une part, et des extraits aux solvants, d'autre part, des parties aériennes des espèces de Ciste présentes en Sardaigne. Il s'agit, aussi, d'étudier le potentiel de ces espèces en termes de propriétés antibactériennes contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, d'activités antifongiques vis-à-vis de différentes souches de *Candida* et enfin, de d'évaluer d'éventuelles caractéristiques antioxydantes.

Dans la première partie de notre travail, nous présentons un état de l'art sur les aspects botaniques du genre *Cistus* et sur les usages traditionnels des différentes espèces dans la

pharmacopée.

Cette étude bibliographique est complétée par une enquête de terrain sur l'ensemble du territoire Sarde afin de sélectionner les stations de prélèvement des divers taxons de *Ciste*. Le matériel végétal a été récolté durant la deuxième quinzaine du mois de mai et les premiers jours du mois de juin des années 2014, 2015 et 2016. En 2014, nous avons réalisé les prélèvements de *C. salvifolius* et *C. albidus* sur le Mont Ortobene (Nuoro) tandis que *C. monspeliensis* a été récolté au Mont Albo (Oliena). *C. creticus* subsp. *creticus* et *C. creticus* subsp. *eriocephalus* ont été cueillis dans la partie Centre-Est de la Sardaigne, dans le golfe d'Orosei, à Calagonone alors que *C. creticus* subsp. *corsicus* a été échantillonné dans le Nord-Ouest dans la région du Lac de Baratz, près d'Alghero. En 2015, les échantillons de *C. creticus* subsp. *creticus* et *C. creticus* subsp. *corsicus* ont été prélevés dans les mêmes station que l'année précédente (Calagonone et Lac de Baratz, respectivement) alors que *C. creticus* subsp. *eriocephalus* a été récolté dans le Nord-Ouest de Sardaigne, près de Bonnanaro. Enfin, en 2016, *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet a été prélevé dans sept stations réparties sur l'ensemble du territoire Sarde. D'un point de vue taxonomique, toutes les espèces ont été identifiées par Prof. A.D Atzei sur la base de leurs caractéristiques morphologiques ; un échantillon certifié de chacune d'elles a été déposé dans l'herbarium SASSA du Département de Chimie et Pharmacie de l'Université de Sassari.

Nos travaux ont débuté par un screening chimique et biologique des quatre espèces de *Ciste* présentes en Sardaigne. Puis, nous nous sommes focalisés sur l'étude des trois sous-espèces de *Cistus creticus* ; eu égard aux résultats obtenus, notre recherche s'est orientée plus particulièrement vers la caractérisation du taxon *C. creticus* L. subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet. Les métabolites étudiés sont les constituants volatils des huiles essentielles et les composés phénoliques des extraits. Les huiles essentielles ont été préparées par hydrodistillation tandis que extraits ont été obtenus soit par macération soit par extraction avec des solvants usuels avec et sans utilisation d'un appareil de type Soxhlet.

La fraction volatile émise par les plantes a également été étudiée par micro-extraction en phase solide (MEPS). Les compositions en volatils (huiles essentielles et MEPS) et en composés phénoliques des extraits ont été établies, selon le cas, à l'aide des techniques de la chromatographie en phase gazeuse (GC) et liquide (HPLC) couplées ou non à la spectrométrie de masse (GC/MS, GC-FID et HPLC/MS, HPLC-DAD)

Les propriétés antimicrobiennes des extraits phénoliques ont été testés sur

*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ainsi que sur quatre souches différentes de *Candida*. Ces activités antibactériennes et antifongiques ont été établies par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) selon la méthode de la macro-dilution en agar.

### **Analyse des huiles essentielles**

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a permis d'identifier globalement 111 constituants et de mettre en évidence un profil en volatils spécifique pour chacune des six espèces récoltées en 2014. L'espèce *C. incanus* L. (*Cistus villosus* Auct.) est caractérisé par une richesse en diterpènes de type labdane, avec le manoyl oxyde et son isomère 13-épi comme constituants majoritaires (70%). L'huile essentielle de *C. salvifolius* a exhibé de fortes teneurs en molécules odorantes, notamment l'ionone alors que celle de *C. monspeliensis* est dominée par hydrocarbures saturés à longue chaîne tel que l'héneicosane. L'huile essentielle de *C. albidus* est riche en sesquiterpènes hydrocarbonés, dont le curcumène (24,4%) et le cadinène (12%). En outre, cette dernière se caractérise par la quasi absence des labdanes. La composition chimique de *C. creticus* est atypique en raison des forts pourcentages en diterpènes oxygénés (38% de labdanes), avec comme constituant principal le manool. Au niveau des sous-espèces, l'huile essentielle de la subsp. *corsicus* présente de fortes ressemblances avec celle de *C. creticus* subsp. *creticus*, en particulier au niveau de leur composante diterpénique riche en labdanes. L'analyse statistique en composantes principales (PCA) établie à partir des profils des huiles essentielles des six espèces, a permis d'observer un groupe d'échantillons constitué par les trois sous-espèces de *C. creticus* et un autre formé par les autres taxons (*C. salvifolius* étant celui qui se rapproche le plus de *C. creticus*).

En ce qui concerne les huiles essentielles des trois sous-espèces de *C. creticus* récoltées en 2015, les analyses de *C. creticus* subsp. *creticus* et *C. creticus* subsp. *corsicus* ont confirmé, avec un minimum de divergence, les profils des échantillons de l'année précédente. Pour *C. creticus* subsp. *creticus*, les constituants principaux sont les sesquiterpènes oxygénés, notamment  $\alpha$ -eudesmol (5,9%) et  $\tau$ -muurolol (4,0%) et les diterpènes de type labdane avec le 13-épi manoyl oxyde (4,9%). Les huiles essentielles de la subsp. *corsicus* et de la subsp. *creticus* présentent de nombreuses similitudes qualitatives, avec des teneurs importantes en eudesmol (7,5%) et 13-épi manoyl oxyde (8,08%). En revanche, les échantillons de la subsp. *eriocephalus* se distinguent de ceux des deux autres taxons : ceux prélevés en 2015 n'ont pas permis d'obtenir d'huile essentielle *a contrario* de ceux récolté en 2014. La micro-extraction en phase solide (MEPS) de ces mêmes échantillons végétaux a mis en évidence (i) dans *C. creticus* subsp. *creticus* la

prédominance de monoterpènes tels  $\alpha$ -pinène (24.23%) et camphène (11.36%) et (ii) dans *C. creticus* subsp. *corsicus* la prédominance moins marquée de  $\alpha$ -pinène (17.72%) et un pourcentage élevé de  $\beta$ -bourbonène (8.24). *C. creticus* subsp. *eriocephalus* est dominé par le limonène (12.83%) et le nonanal (11.09%). Les travaux menés sur les végétaux prélevés en 2016 ont confirmé l'absence de production d'huile essentielle pour les populations de *C. creticus* subsp. *eriocephalus* de la station de Bonannaro. Les huiles essentielles produites en 2016 à partir des autres espèces se répartissent en deux groupes en fonction de leurs profils métaboliques. A ce stade, il apparaît pertinent de mener une étude approfondie sur la diversité génétique de la subsp. *eriocephalus* en la confrontant à celle des deux autres taxons de *C. creticus* présents en Sardaigne.

### **Analyse des compositions phénoliques**

L'analyse des extraits au méthanol acidifié, des végétaux récoltés en 2014, a permis de d'identifier 71 composés phénoliques. Il s'agit principalement d'acides phénoliques, de flavan-3-ols et flavonoïdes glycosylés. Tous les extraits se caractérisent par des teneurs importantes en acide rosmarinique, en quercitrine et en composés dérivés de ceux-ci. D'un point de vue quantitatif, l'espèce la plus riche en composés phénoliques est *Cistus salvifolius* avec la présence de quelques composés particuliers comme l'oleuropeine 9-O- $\beta$ -D-xyloside tandis que *Cistus albidus* présente les plus faibles teneurs en constituants phénoliques. Les trois sous-espèces de *Cistus creticus* se différencient au niveau des profils en polyphénols. Sur ce point, les subsp. *corsicus* et *eriocephalus* présentent une empreinte métabolique relativement semblable en comparaison de celle observée pour la subsp. *creticus*. D'une manière générale, nous pouvons affirmer que les résultats sur les polyphénols confirment la classification botanique en trois taxons pour l'espèce *C. creticus* et sont donc complémentaires des données obtenues par la taxonomie et l'étude des molécules volatiles.

### **Activité antimicrobienne**

L'activité biologique a été testée sur les extraits au méthanol obtenus à partir des échantillons végétaux de *Cistus* recueillis en 2014. Ces extraits montrent une activité contre les bactéries Gram positives et négatives tandis que l'activité antifongique n'a pas été décelée contre les champignons pathogènes du genre *Candida*. A ce stade, il semble intéressant de poursuivre les investigations par l'isolement des constituants actifs présents dans les extraits et susceptibles de lutter contre les pathologies liées aux bactéries résistantes, en particulier *Staphylococcus aureus*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams R.P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing, Carol Stream.
2. Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, J.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40, 4168-4170.
3. Al-Qudah M.A. 2013. Chemical composition of the essential oil from Jordanian *Lupinus varius* L. Arabian Journal of Chemistry, 6, 225-227
4. Anghelopoulou D., Demetzos C., Perdetzoglou D., 2002. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. Biochem. Syst. Ecol. 30, 189-203.
5. Anghelopoulou D, Demetzos C, Dimas C, Perdetzoglou D, Loukis A, 2001. Essential Oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of *ent*-13-*epi*-Manoyl oxide and its isomers. Planta Med. 67(2): 168-171
6. Angioni G., 1989. I pascoli erranti: antropologia del pastore in sardegna. Liguori Editore, Napoli.
7. Ark M., Ustun O., Yesilada E., 2004. Analgesic activity of *Cistus laurifolius* in mice. Pharmaceutical Biology 42, 176-178.
8. Arrigoni P.V., 2010. Flora dell'Isola di Sardegna. Sassari, Carlo Delfino Editore.
9. Attaguile G., Russo A., Campisi A., Savoca F., Acquaviva R., Ragusa N., Vanella A., 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. Cell Biology Toxicol. 16: 83.
10. Attaguile, G., Caruso, A., Pennisi, G, Savoca, F., 1995. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. Pharmacol. Res. 31: 29.
11. Atzei A.D., Camarda I., Piras G., Satta V., 2004. Usi tradizionali e prospettive futuri delle specie della macchia mediterranea in Sardegna. Italus Hortus – Vol. 11. n. 4, luglio-agosto.
12. Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., Vivanco, J.M., 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Plant Physiol. Biochem. 40, 983-995.
13. Atzei A.D., 2003. Le piante nella tradizione popolare della Sardegna. Carlo Delfino Editore.
14. Ballero M., Poli F., Sacchetti G., Loi M.C., 2001. Ethnobotanical research in the territory

- of Fluminimaggiore (south-western Sardinia). *Fitoterapia* 72 (2001) 788-801.
15. Barbaferri M., Dadea C., Tassi E., Bretzel F., Fanfani L., 2011. Uptake of heavy metals by native species growing in a mining area in sardinia, italy: discovering native flora for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 13, 985–997.
  16. Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Roldan, C., Guillen, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312.
  17. Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Saura, D., Guillen, E., Fernandez- Gutierrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2273– 2282.
  18. Barros, L., Duenas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I., 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Ind. Crops Prod.* 41, 41-45.
  19. Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006.
  20. Bouamama H., Noel T., Villard J., Benharref A., 2006. Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species . *Journal of Ethnopharmacology* 104,104–107.
  21. Bouamama, H.,Villard, J., Benharref, A., Jana, M., 1999. Antibacterial and antifungal activities of *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* leaf extracts. *Therapie*, 54, 731.
  22. Boukhebti, H., Chaker, A.N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., Harzallah, D., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Letters.* 3, 267-275.
  23. Bruni A., Ballero M., Poli F., 1997. Quantitative ethnopharmacological study of the campidano Valley and Urzulei district, Sardinia, Italy.*Journal of Ethnofarmacology* 57, 97-124.
  24. Camarda I., Valsecchi F., 2008. Alberi e arbusti spontanei della Sardegna. Carlo Delfino Editore., Sassari.
  25. Camarda I., Satta V., 1996. Piante officinali di interesse economico nella comunità della Baronia. Gal Barbagia-Baronia - Dip. Di Botanica ed Ecol. Veg., Università di Sassari.
  26. Camarda I., 1990. Ricerche etnobotaniche nel Comune di Dorgali. *Boll. Soc. Sarda Sci. Nat.* 27: 147-204.
  27. Campeol, E.; Flamini, G.; Chericoni, S.; Catalano, S.; Cremonini, R., *Volatile compounds from three cultivars of Olea europaea from Italy*, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 11, 5409-5411.

28. Cardoso, S.M., Falcao, S.I., Peres, A., Domingues, M.R.M., 2011. Oleuropein/ligstroside isomers and their derivatives in Portuguese olive mill wastewaters. *Food Chemistry* 129, 291-296.
29. Chaves N., Escudero J.C., Gutierrez-Merino C., 1997. Quantitative variation of flavonoids among individuals of a *Cistus ladanifer* population. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 429-435.
30. Chen Y.T., Zheng R.L., Jia Z.J., Ju Y., 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 19.
31. Chinou I., Demetzos C., Harvala C., Roussakis C., Verbist J.F., 1994. Cytotoxic and antibacterial labdane diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Plant. Med.*, 60:34-36.
32. Clifford M.N., Kirkpatrick J., Kuhnert N., Roozendaal H., Rodrigues Salgado P., 2008. LC-MS<sup>n</sup> analysis of the *cis* isomers of chlorogenic acids. *Food Chemistry*, 106 379-385.
33. Clifford M.N., Wu W., Kirkpatrick J., Kuhnert N., 2006. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal *Cyananthemum* by LC-MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.* 55, 929-936.
34. Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 174–181.
35. Danne A., Petereit F., Nahrstedt A., 1994. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochem.* 37: 533.
36. Danne A., Petereit F., Nahrstedt A., 1993., Proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochem.* 34: 1129.
37. De Andres A.I., Gomez-Serrallinos M.P., Iglesias I., Villar A.M., 1999. Effects of extract of *Cistus populifolius* L. on the central nervous system. *Phytother Res* 13: 575-579.
38. Demetzos, C., Anastasaki, T., Perdetzoglou, D., 2002a. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. Growing in Crete (Greece). *Z. Naturforsch., C* 57, 89–94.
39. Demetzos C, Agelopoulou D, Perdetzoglou D. 2002b. A comparative study of the essential oil of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology.* 30, 651-655
40. Demetzos C., Dimas K., Hatziantoniou S., Anastasaki T., Angelopoulou D., 2001. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and *cis*-clerodane type diterpenes. *Planta Medica.* 67: 614.
41. Demetzos, C., Perdetzoglou, D.K., 1999. Chemotaxonomic survey of wild and cultivated *Cistus* L. Species. *Plant Biosyst.* 133, 251–253.

42. Demetzos, C., Stahl, B., Anastasaki, T., Gazouli, M., Tzouvelekis, L.S., Rallis, M., 1999. Chemical analysis and antimicrobial activity of the resin ladano, of its essential oil and of the isolated compounds. *Planta Med.* 65, 76–78.
43. Demetzos, C., Katerinopoulos, H.E., Kouvalaris, A., Stratigakis, N., Loukis, A., Ekonomakis, C., Spiliotis, V., Tsaknis, J., 1997. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta Med.* 63, 477–479.
44. Demetzos C., Mitaku S., Hotellier F., Harvala A., 1989. Heterosides polyphenoliques des feuilles de *Cistus creticus* L. *Ann. Pharm. Fr.* 47: 314.
45. Dimas K., Demetzos C., Angelopoulou D., Kolokouris A., Mavromoustakos T., 2000. Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. *Pharmacol.Res.* 42:475.
46. Dimas K., Demetzos C., Marsellos M., Sotiriadou R., Malamas M., Kokkinopoulos D., 1998. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Medica.* 64: 208.
47. European Commission, DG Health and Consumer Protection, Overview, Food and Feed Safety: <http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood>.
48. European Pharmacopoeia 6.0, 2008. Determination of essential oils in herbal drugs, pp. 251-252 (02.08.12)
49. Fabry, W., Okemo, P.O., Ansorg, R., 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 79-80
50. Fang, N., Yu, S., Prior, R.L., 2002. LC/MS/MS Characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3579-3585.
51. Fernandez-Arroyo, S., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2010. High-performance Liquid Chromatography with Diode array Detection Coupled to Electrospray Time-of-flight and Ion-trap Tandem Mass Spectrometry to Identify Phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* Aqueous Extract. *Phytochem. Anal.*, 21 307-313.
52. Ferreira S., Santos J., Duarte A., Duarte A.P., Queiroz J.A., Domingues F.C., 2012. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extract. *Nat. Prod. Res.* 26, 1558-1560.
53. Gertsch J., 2011. Botanical drugs, synergy and network pharmacology: Forth and back to intelligent mixtures. *Planta Med.* 77, 1086-1098.
54. Güvenç A., Yildiz S., Özkan A. M., Erdurak C.S., Coşkun M., Yilmaz G., Okuyama T., Okada Y., 2005. Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species. *Pharm. Biol.* 43, 178-183.
55. Hamm, S.; Bleton, J.; Connan, J.; Tchaplal, A., A chemical investigation by headspace

- SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples, *Phytochemistry*, 2005, 66, 12, 1499-1514.
56. Hanning C., Sorg J., Spitzmuller B., Hanning M., Al-Ahmad A., 2009. Polyphenolic beverage reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. *Journal of Dentistry*, 37 560-566.
  57. Hanning C., Spitzmuller B., Al-Ahmad A., Hanning M., 2008. Effects of *Cistus*-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. *Journal of Dentistry*, 36, 540-545.
  58. Harborne J. B. 1989 Plant phenolics in *Methods in plant biochemistry*. Academic Press Harcourt Brace Jovanovich, vol. 1, XII, London.
  59. Hazzit, M.; Baaliouamer, A.; Faleiro, M.L.; Miguel, M.G., Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 17, 6314-6321.
  60. Hertog M.G., Kromhout D., Aravanis C., 1995. Flavonoids intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* 155: 381.
  61. Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study. *Lancet*. 342: 1007.
  62. Hutschenreuther A., Birkemeyem C., Groetzinger K., Straubinger R.K., Rauwald H.W. 2010. Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. in vitro. *Pharmazie*, 65, 290-295.
  63. Jemia M.B., Kchouk M.E, Senatore F., Autore G., Marzocco S., Feo V. D., et al., 2013. Antiproliferative activity of exane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chem. Cent. J.* 7, 1-7.
  64. Jiménez M.N., Bacchetta, G. Casti M., Navarro F.B., Lallena A.M., Fernández-Ondono E., 2011. Potential use in phytoremediation of three plant species growing on contaminated mine-tailing soils in Sardinia . *Ecological Engineering* 37 392–398.
  65. Joulain D., König W.A., 1998. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. EB-Verlag, Hamburg.
  66. Koch, A.L., 1981. Evolution of antibiotic resistance gene function. *Microbiological Reviews* 45, 355-378
  67. König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., 2001. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*. Library of MassFinder 2.1. University of Hamburg. Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany.
  68. Kuete, V., Alibert-Franco, S., Eyong, K.O., Ngameni, B., Folefoc, G.N., Nguemaving,

- J.R., Tagmouo, J.G., Fotso, G.W., Komguem, J., Ouahouo, B.M., Bolla, J.M., Chevalier, J., Ngadjui, B.T., Nkengfack, A.E., Pages, J.M., 2011. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37, 156-161.
69. Kupeli E., Yesilada E., 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. Ethnopharmacol* 112: 524-530.
70. Ligios C., Viglietti A., Carta P., Dexter G., Simmons M. M., Agrimi U., 2004. Clinicopathological findings in sheep from Sardinia showing neurological signs of disease. *Veterinary Record* 2004; 154:365-370.
71. Liu, A.H., Guo, H., Ye, M., Lin, Y.H., Sun, J.H., Xu, M., Guo, D.A., 2007. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161 170-182.
72. Loizzo M.R., Ben Jemia M., Senatore F., Bruno M., Menichini F., Tundis R., 2013. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 59, 586-594.
73. Lucero, M.E.; Estell, R.E.; Frederickson, E.L., *The essential oil composition of Psoralea scoparius (A. Gray) Rydb.*, *J. Essent. Oil Res.*, 2003, 15, 2, 108-111.
74. Maccioni S., Baldini R., Cioni P.L., Tebano M., Flamini G., 2007. *In vivo* volatiles emission and essential oils from different organs and pollen of *Cistus albidus* from Caprione (Eastern Liguria, Italy). *Flavour Fragr. J.* 22, 61-65.
75. Maffei M., 2015. Molecole bioattive delle piante. Libro pubblicato dall'autore. ISBN: 9788891097248.
76. Maggi F, Lucarini D, Papa F, Peron G, 2016. Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochemical Systematic and Ecology* 66 50-57.
77. Mahmoudi H., Aouadhi C., Kaddour R., Gruber M., Zargouni H., Zaouali W., Ben Hamida N., Ben Nasri M., Ouerghi Z., Hosni K., 2016. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *Biosci. J. Uberlandia*, v.32, n.1, p. 226-237, Jan/Feb.
78. Mahboubi, M., Haghi, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 119, n. 2, p. 325-327.
79. Mastino PM, Marchetti M, Costa J, Usai M, 2016. Comparison of essential oils from *Cistus* species growing in Sardinia. *Natural Product Research* 31: 299-307.
80. McGinnis M.R., Rinaldi M.G., 1986. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd ed., (Ed.

- V. Lorian), Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, pp. 223–281.
81. McLafferty F.W., Stauffer D.B., 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data, sixth ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM Version 3.10d. Palisade, Newfield.
  82. National Institute of Standards and Technology, 2005. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database. Gaithersburg, MD (<http://webbook.nist.gov/chemistry>).
  83. Nikaido, H., Vaara, M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology Review*. v. 49, p. 1-32.
  84. Orhan N., Aslan M., Sukuro M., Orhan D. D., 2013. In vivo and in vitro antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC–TOF-MS analysis. *Journ. Ethnopharm.* 146, 859–865.
  85. Palà-Paül J, Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Sanz J, 2005. Seasonal variation in chemical composition of *Cistus albidus* L. from Spain. *Journal of essential Oil Research* vol. 17 19-22.
  86. Paolini J., Falchi A., Quilinchini Y., Desjobert J-M., De Cian M-C., Varesi L., Costa J., 2009. Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* 70, 1146- 1160
  87. Paolini J., Tomi P, Bernardini A. F., Bradesi P., Casanova J., Kaloustian J., 2008. Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combination of GC/RI, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Nat. Prod. Res.* 22, 1270-1278.
  88. Pathak D., Pathak K., Singla A.K., 1991. Flavonoids as medicinal agents – recent advances. *Fitoterapia*. 5: 371.
  89. Petereit F., Kolodziej H., Nahrstedt A., 1992. Proanthocyanidins and biogenetically related dihydroflavonols from *Cistus incanus* L. *Basic Life Sci.* 59: 729.
  90. Petereit F., Kolodziej H., Nahrstedt A., 1991. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochem.* 30: 981.
  91. Petereit F., Nahrstedt A., Innerlich B., Lupke. N.P., Theissen N.L., Kemper F.H., Winterhoff H., 1989. Antiinflammatory activity of the traditionally used herb of *Cistus incanus*. *Planta Medica.* 55: 650.
  92. Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95, 664-671.
  93. Ramalho, P.S., De Freitas, V.A.P., Macedo, A., Silva, G., Silva, A.M.S., 1999. Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves. *Flav. Frag. J.* 14, 300–302.

94. Rebaya A., Belghith Igueld S., Hammrouni S., Amaaroufi A., trabelsi Ayadi M., Cherif J.K., 2016. Antibacterial and antifungal activities of *Halimium halimifolium*, *Cistus salviifolis* and *Cistus monspeliensis*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*; 8(4):243-247.
95. Riehle, P., Vollmer, M., Rohn S., 2013. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions — Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Research International* 53 891–899
96. Robak J., Gryglewski R.J., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37: 837.
97. Robles C., Garzino S., 1998. Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry* 48, 1341-1345.
98. Robles C., Garzino S., 2000. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry* 53, 71-75
99. Rubio-Moraga, A., Argandoña, J., Mota, B., Pérez, J., Verde, A., Fajardo, J., Gómez-Navarro, J., Castillo-López, R., Oussama Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (*Cistaceae*) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J. Ethnopharmacol.* 148, 287–296.
100. Russel, A.D., 1991. Mechanism of bacterial resistance to non antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 191-201.
101. Sadhu S.K., Okuyama E., Haruhiro F., masami I., Yesilada E., 2006. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 371-378.
102. Santagati, N.A., Salerno, L., Attaguile, G., Savoca, F., Ronsisvalle, G., 2008. Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *J. Chromatogr. Sci.* 46, 150–156.
103. Saracini E., Tattini M., Traversi M.L., Vincieri F. F., Pinelli P., 2005. Simultaneous LC-DAD and LC-MS Determination of Ellagitannins, Flavonoid Glycosides, and Acyl-Glycosyl Flavonoids in *Cistus salvifolius* L. Leaves . *Chromatographia* 62, 245–249 .
104. Skoric, M., Todorovic, S., Gligorijevic, N., Jankovic, R., Zivkovic, S., Ristic, M., Radulovic, S., 2012. Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind. Crops Prod.* 38, 153– 159.
105. Sichel G., Corsaro C., Scalia M., Di Bilio A.J., Bonomo R.P. , 1991. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub>-(·). *Free Rad. Biol. Med.* 11: 1.
106. Su, Y.C.; Ho, C.L.; Wang, E.I.C., *Analysis of leaf essential oils from the*

*indigenous five conifers of Taiwan*, Flavour Fragr. J., 2006, 21, 3, 447-452.

107. Tomás-Menor L., Morales-Soto A., Barrajon-Catalán E., Roldán-Segura C., Segura-Carretero A., Micol V., 2013. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species . Food Chem. Toxicol. 55 , 313–322 .
108. Üstun O., Ozcelik B., Akyon Y., Abbasoglu U., Yesilada E., 2006. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. J. Ethnopharmacol. 108, 457-461.
109. Vatai T., Škerget M., Knez Ž., 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. Journal of Food Engineering, 90 246-254.
110. Vogt T, Prioksch P, Gulz PG. 1987. Epicuticular flavonoid aglycones in the genus *Cistus*, *Cistaceae*. J. Plant Physiol., 131: 25-36.
111. Yan X.H. and Guo Y.W., 2004. Two new ellagic glycosides from leaves of *Diplopanax stachyanthus*. Journal of Asian Natural Products Research, 6(4) 271-276.
112. Yesilada E., Gurbuz I., Ender E., 1997. Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesion. J. Ethnopharmacol. 55, 201-211.
113. Yu Y., Jiang Z., Song W., Yang Y., 2015. Glucosylated caffeoylquinic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera japonica*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 5(3): 210-214
114. Weyerstahl, P.; Marschall, H.; Eckhardt, A.; Christiansen, C., *Constituents of commercial Brazilian Iantana oil*, Flavour Fragr. J., 1999, 14, 1, 15-28.
115. de Whalley C. V., Rankin S.M., Hoult R.S., Jessup W., Leake D.S., 1990. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. Biochem. Pharmacol. 39: 1743.
116. Wulfson N.S, Zaretskii V.I., Sadovskaya V.L., Semenovskiy A.V., Smit W.A., Kucherov V.F.. 1966. Mass spectrometry of steroid systems—IV *Cis-trans* isomerism of di- and tricyclic model compounds. Tetrahedron, 22, 603-614