



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

CARATTERIZZAZIONE DEI
CAROTENOIDI E TOCOFEROLI NEL
CRITHMUM MARITIMUM

Title: Characterization of carotenoids and tocopherols in
Crithmum maritimum
TIPO TESI: sperimentale

Studente:
Arianna Raffaelli

Relatore:
PROF. PAOLO LUCCI

Correlatore:
DOTT.SSA ANCUTA NARTEA

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Ringrazio infinitamente il prof. Paolo Lucci e la dott.ssa Ancuta Nartea per avermi seguita costantemente in laboratorio e nella stesura della tesi.
Desidero ringraziare i miei genitori e mia sorella per avermi sostenuta durante tutto il percorso universitario.

SOMMARIO

SOMMARIO.....	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE.....	6
RIASSUNTO.....	8
ABSTRACT.....	9
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	10
Informazioni generali.....	10
Valore nutrizionale del <i>C. maritimum</i>	12
Valore funzionale del <i>C. maritimum</i> : composti bioattivi.....	13
Carotenoidi e tocoferoli nel <i>C. maritimum</i>	14
I carotenoidi.....	15
Struttura dei carotenoidi.....	15
Funzioni dei carotenoidi.....	16
I tocoferoli.....	19
Struttura dei tocoferoli.....	19
Funzioni dei tocoferoli.....	20
CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI.....	21
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....	23
Campionamento delle popolazioni selvatiche di <i>C. maritimum</i>	23
Campionamento di <i>C. maritimum</i> da coltivazione.....	24
Determinazione dei carotenoidi in foglie e fiori.....	25
Determinazione dei tocoferoli in foglie e fiori.....	25
Analisi statistica.....	26
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	27
Identificazione dei carotenoidi e tocoferoli.....	27
Quantificazione dei carotenoidi nel <i>C. maritimum</i> spontaneo.....	28

Quantificazione dei tocoferoli nel <i>C. maritimum</i> spontaneo	30
Carotenoidi e tocoferoli nel <i>C. maritimum</i> coltivato e nel sottoprodotto	33
Discussione.....	35
CONCLUSIONI.....	36
BIBLIOGRAFIA	38

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Composizione centesimale del finocchio marino (<i>C. maritimum</i>) e del finocchio comune (<i>Foeniculum vulgare</i>). Dati adattati da Bianco et al. (2018) e dal National Nutrient Database United States Department of Agriculture.	12
Tabella 2. Contenuto medio di sodio, potassio, magnesio e calcio in <i>C. maritimum</i> selvatico e coltivato. Dati adattati da Bianco et al. (2018).....	13
Tabella 3. Carotenoidi nelle foglie e nei fiori di popolazioni di <i>C. maritimum</i> selvatiche. I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$). CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.	29
Tabella 4. Carotenoidi nelle foglie e nei fiori di popolazioni di <i>C. maritimum</i> selvatiche. I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$). CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.	31

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Riviera del Conero, Marche.....	10
Figura 2. Foglie di <i>C. maritimum</i> (Nartea et al. 2023) e pianta di <i>C. maritimum</i> coltivato a Camerano (Italia).....	12
Figura 3. Struttura molecolare del β -carotene (Reboul et al. 2019).....	15
Figura 4. Percorsi biosintetici per la formazione di retinolo, zeaxantina, luteina e meso-zeaxantina (Demmig-Adams B. et al. 2020).	16
Figura 5. Confronto tra molecola di β -carotene e xantofilla, Reboul et. al. 2019.....	17
Figura 6. Struttura molecolare della luteina, Reboul et. al. 2019.....	18
Figura 7. Struttura molecolare dei tocoferoli, Shahidi et. al. (2016).....	19
Figura 8. Sette siti di campionamento di foglie (n=7) e fiori (n=6) di <i>C. maritimum</i> di popolazioni selvatiche in diverse regioni d'Italia. Calabria (CAL); Marche, Parco del Conero (CON); Marche, Porto Potenza Picena (MAR); Puglia (APU); Sardegna (SAR); Sicilia (SIC); Toscana (TOS).....	23
Figura 9. Campione di foglie essiccate di <i>C. maritimum</i> coltivate.....	24
Figura 10. Residuo di coltivazione, sottoprodotto del <i>C. maritimum</i>	24
Figura 11. Carotenoidi estratti da campioni di <i>C. maritimum</i>	25
Figura 12. Cromatografia UHPLC dei carotenoidi rilevato a 450 nm con rivelatore PDA.	27
Figure 13. Cromatogramma UHPLC dei tocoferoli rilevati con FLD. Nelle foglie e fiori di <i>C. maritimum</i> selvatico i picchi identificati e quantificati sono: β e γ -tocoferolo (tempo di ritenzione, RT=13.620) e α -tocoferolo (RT=14.082).	28
Figura 14. Luteina e β -carotene nelle foglie di popolazioni selvatiche di <i>C. maritimum</i> . CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.....	29
Figura 15. Luteina e β -carotene nei fiori di popolazioni selvatiche di <i>C. maritimum</i> . CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.	30

Figura 16. α -tocoferolo e γ -tocoferolo nelle foglie di popolazioni selvatiche di *C. maritimum*. CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.32

Figura 17. α -tocoferolo e γ -tocoferolo nei fiori di popolazioni selvatiche di *C. maritimum*. CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.....33

Figure 18. Carotenoidi in foglie e residuo di coltivazione di *C. maritimum*.34

Figura 19. Tocoferoli in foglie e residuo di coltivazione di *C. maritimum*.34

RIASSUNTO

Il *Crithmum maritimum* è una pianta alofita facoltativa della famiglia delle *Apiaceae* (Ombrellifere), conosciuto più comunemente con il nome di finocchio marino. Il *C. maritimum* è una pianta erbacea fortemente aromatica che cresce spontaneamente lungo le coste del Mediterraneo. Recentemente questa alofita è stata descritta come coltura redditizia, quindi come candidata ideale per la promozione dell'agricoltura alofita nel bacino del Mediterraneo grazie al suo riconosciuto adattamento al clima mediterraneo, alla sua resilienza ai rischi/shock legati ai cambiamenti climatici e alla sua applicabilità in prodotti alimentari e nutraceutici.

In questa tesi, sono stati raccolti foglie e fiori da popolazioni di *C. maritimum* selvatico in varie regioni italiane, e confrontati con un campione coltivato di foglie ed un sottoprodotto di coltivazione con l'obiettivo di valutare il contenuto in carotenoidi e tocoferoli in questa matrice. È stata utilizzata l'ultra cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a rivelatori a serie di fotodiodi e fluorimetrico per caratterizzare i carotenoidi e i tocoferoli per la prima volta nelle popolazioni spontanee e coltivate di *C. maritimum* in quanto dall'analisi della letteratura sono stati utilizzati solo metodi spettrofotometrici e non cromatografici per la determinazione dei carotenoidi e tocoferoli nel *C. maritimum*.

Sono stati identificati neoxantina, violaxantina, zeaxantina, β -carotene e α/γ -tocoferolo. Le foglie di *C. maritimum* possono essere considerate un'importante fonte di luteina, beta-carotene e alfa-tocoferolo con valori massimi rispettivamente di: 190,89 mg/kg, 111,05 mg/kg e 528,12 mg/kg peso secco di foglie. Le regioni con un maggior contenuto di composti bioattivi quali carotenoidi (luteina e β -carotene) e tocoferoli (α/γ) sono risultate essere: Toscana, Sardegna e Puglia. Nel *C. maritimum* coltivato osserviamo soprattutto la presenza di luteina, mentre risulta essere carente in α -tocoferolo e β -carotene. I residui di coltivazione sono molto meno ricchi di sostanze bioattive, solo la luteina e α/γ -tocoferolo sono presenti in quantità rilevanti rispetto ad altre sostanze che invece sono presenti solo in tracce (β -carotene).

Il *C. maritimum* quindi potrebbe essere potenzialmente utilizzato nella formulazione di alimenti con elevato potenziale antiossidante per la prevenzione di malattie associate a stress ossidativo.

ABSTRACT

Crithmum maritimum is a facultative halophytic plant of the family *Apiaceae* (Umbelliferae), more commonly known as sea fennel. *C. maritimum* is a highly aromatic herbaceous plant that grows spontaneously along the Mediterranean coasts. Recently, this halophyte has been described as a profitable crop, therefore as an ideal candidate for the promotion of halophyte agriculture in the Mediterranean basin due to its recognized adaptation to the Mediterranean climate, its resilience to climate change-related risks/shocks and its applicability in food and nutraceutical products.

In this thesis, leaves and flowers were collected from wild *C. maritimum* populations in various Italian regions and compared with a cultivated sample of leaves and a cultivation by-product with the aim of evaluating the carotenoid and tocopherol content in this matrix. High-performance ultra liquid chromatography coupled with photodiode array detectors and fluorimetric was used to characterize carotenoids and tocopherols for the first time in wild and cultured populations of *C. maritimum* as from the literature review only spectrophotometric and non-chromatographic methods were used for the determination of carotenoids and tocopherols in *C. maritimum*.

Neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin, β -carotene and α/γ -tocopherol have been identified. *C. maritimum* leaves can be considered an important source of lutein, beta-carotene and alpha tocopherol with maximum values of 190.89 mg/kg, 111.05 mg/kg and 528.12 mg/kg dry leaf weight respectively. The regions with a higher content of bioactive compounds such as carotenoids (lutein and β -carotene) and tocopherols (α/γ) were Tuscany, Sardinia and Puglia. In *cultivated C. maritimum* we observe mainly the presence of lutein, while it is deficient in α -tocopherol and β -carotene. Cultivation residues are much less rich in bioactive substances, only lutein and α/γ -tocopherol are present in significant quantities compared to other substances that are present only in trace amounts (β -carotene).

C. maritimum could therefore potentially be used in the formulation of foods with high antioxidant potential for the prevention of diseases associated with oxidative stress.

Capitolo 1 INTRODUZIONE

Informazioni generali

Il *Crithmum maritimum* è una pianta alofita facoltativa della famiglia delle *Apiaceae* (Ombrellifere), conosciuto più comunemente con il nome di finocchio marino.

Il *C. maritimum* è una pianta erbacea fortemente aromatica che cresce spontaneamente lungo le coste del Mediterraneo, nelle aree costiere dei paesi dell'Europa meridionale e occidentale, in Nord America, Asia centrale e occidentale (figura 1). Il termine *Crithmum* deriva dal greco “krithe” ossia farro o orzo, probabilmente per la somiglianza del frutto con un chicco di orzo; il termine *maritimum* è riferito al suo habitat, indicando la crescita di questa pianta vicino al mare. In italiano viene volgarmente chiamato: spaccasassi, erba di San Pietro, basiggia o finocchio di mare (Nartea et al. 2023). Cresce spontaneamente su scogliere, spiagge di ghiaia, coste rocciose, ed è in grado di sopravvivere in terreni impregnati di acqua salata o zone regolarmente esposte agli spruzzi delle onde del mare (Atia et al. 2011).



Figura 1. Riviera del Conero, Marche.

Il *Crithmum maritimum* è altamente apprezzato per le sue foglie edibili, ampiamente utilizzate in ambito culinario, ma trova diverse applicazioni anche nella medicina, cosmesi e nella produzione di oli essenziali (Pacias et al. 2021). Il *C. maritimum* è perciò una buona risorsa di **sostanze bioattive** come: oli essenziali, fenoli, acido ascorbico, acidi grassi essenziali, carotenoidi e tocoferoli. Inoltre, ha mostrato attività antimicrobica contro *E. coli*, *S. aureus* e attività insetticida contro larve di moscerini (D'Agostino et al. 2021). In passato veniva utilizzato nella medicina popolare per prevenire lo scorbuto, come rimedio vermifugo e diuretico (Anestis et. al. 2022).

Oggi, il *C. maritimum* gode di una buona reputazione come rimedio tradizionale in alcune regioni mediterranee. Ad esempio, in Spagna, le foglie vengono mangiate in salamoia come digestivo. Nelle regioni settentrionali, il decotto di *C. maritimum* è utilizzato nella medicina popolare per curare l'apparato urogenitale e il fegato, mentre nel sud Italia lo stesso decotto è considerato utile per trattare la pertosse e il raffreddore. Allo stesso modo, per gli abitanti del centro Italia, il succo fogliare è tradizionalmente utilizzato per il suo effetto depurativo, diuretico e carminativo, mentre l'infuso di frutta viene utilizzato per le sue proprietà stomachiche, digestive e carminative (Renna et al. 2018). In diversi paesi le foglie fresche vengono invece lavorate come capperi sott'aceto, infatti il *C. maritimum* in barattolo è registrato nella "Lista dei prodotti agroalimentari tradizionali" del ministero italiano dell'Agricoltura (Decreto politiche agricole, 2022).

Crescendo spontaneamente lungo le coste, è adatto a vivere in suoli con bassa fertilità e alta salinità. Sistemi di produzione innovativi stanno cercando di addomesticare il *C. maritimum* rendendolo coltivabile a livello industriale. L'obiettivo è ottenere raccolti sostenibili di *C. maritimum* con le stesse caratteristiche compositive di quello che cresce spontaneamente lungo le coste (Renna et al. 2018).

La pianta possiede una robusta radice rizomata, che può allungarsi fino a cinque metri dentro il terreno, un fusto ramificato con base lignificata. Le foglie sono glabre, con contorno triangolare, bi o tri-pennate con segmenti lanceolati carnososi (figura 2). Il periodo di fioritura si estende da giugno a settembre, mentre la maturazione del frutto inizia in novembre-dicembre (Atia et. al. 2011).



Figura 2. Foglie di *C. maritimum* (Nartea et al. 2023) e pianta di *C. maritimum* coltivato a Camerano (Italia).

Valore nutrizionale del *C. maritimum*

Il *C. maritimum* è considerato una buona fonte di proteine, fibre, acidi grassi, tra cui acidi grassi polinsaturi (acido linoleico e linolenico), vitamine (C, B6, A, E) e minerali (Na, Ca, Fe, Mn, Zn) (Krouia et al., 2023). Le attuali conoscenze dei profili nutrizionali delle piante alofite sono ancora scarse, ed è stato dimostrato che le condizioni ambientali, compresa la tessitura del suolo, conducibilità elettrica e pH influenzano notevolmente la composizione elementare della pianta (Janet et al. 2018).

Renna et al. (2018) hanno confrontato il valore nutrizionale del finocchio comune con il profilo nutrizionale di *C. maritimum*. Risulta che *C. maritimum* possiede un minor contenuto in acqua e un maggior contenuto totale di lipidi e proteine, mentre il contenuto totale di carboidrati sembra essere lo stesso per entrambi.

Tabella 1. Composizione centesimale del finocchio marino (*C. maritimum*) e del finocchio comune (*Foeniculum vulgare*). Dati adattati da Bianco et al. (2018) e dal National Nutrient Database United States Department of Agriculture.

g 100g peso fresco	Acqua	Lipidi totali	Proteine	Carboidrati totali	Zuccheri totali	Fibra dietetica	Ceneri
<i>Finocchio marino</i>	87.60	0.73	1.57	7.33	0.65	3.74	2.78
<i>Finocchio comune</i>	90.21	0.20	1.24	7.30	3.93	3.01	1.05

Per quanto riguarda il contenuto dei macro-minerali, Bianco et al. (2018), hanno riscontrato nel *C. maritimum* un maggior contenuto di calcio e sodio, con un minor contenuto di potassio e magnesio, quando i frutti erano maturi. Questo perché, nell'ambito marino costiero, le piante selvatiche di finocchio sono più esposte a ioni come sodio e calcio rispetto al potassio. È noto che il potassio, pur non facendo parte di strutture o composti vegetali, rappresenta l'elemento richiesto nelle quantità più elevate dalle piante, sia per i ruoli biofisici che biochimici. Pertanto, soprattutto la maggior quantità di sodio in *C. maritimum*, potrebbe essere la risposta della pianta per alleviare gli effetti negativi di un livello di disponibilità di potassio non ottimale per i tessuti vegetali. Questo, considerando il ruolo del sodio nella sostituzione del potassio sia per funzioni biochimiche che fisiologiche non specifiche della pianta.

Tabella 2. Contenuto medio di sodio, potassio, magnesio e calcio in *C. maritimum* selvatico e coltivato. Dati adattati da Bianco et al. (2018)

<i>mg 100 g peso fresco</i>	SODIO	POTASSIO	MAGNESIO	CALCIO
<i>C. maritimum spontaneo</i>	291	335	28	310
<i>C. maritimum coltivato</i>	168	558	41	250

Valore funzionale del *C. maritimum*: composti bioattivi

Oltre a fibre, proteine, acidi grassi polinsaturi, minerali, il *C. maritimum* rappresenta una ricca fonte di composti bioattivi: *idrofilo* (polifenoli, vitamina C) e *lipofilo* tra cui oli essenziali, tocoferoli e carotenoidi con attività vitaminica E ed A, rispettivamente (Castillo et al. 2022). Le piante di *C. maritimum* sintetizzano questi metaboliti secondari con note proprietà antiossidanti, come risposta al danno ossidativo salino (Raquel et al. 2022). Quindi, il *C. maritimum* produce e accumula questi composti come difesa o attrattivo in condizioni avverse riguardo condizioni climatiche, nutrienti, salinità, attacchi di parassiti/predatori (Castillo et al. 2022).

I polifenoli ritrovati in *C. maritimum* sono acidi idrossicinnamici come l'acido clorogenico, neoclorogenico e crytochlorogenico e i flavonoidi come la rutina e la quercetina (Piatti et. al. 2021 e 2023, Politeo et. al. 2023).

L'**olio essenziale** di *C. maritimum* contiene diversi composti volatili come limonene, alfa-pirene, sabinene, p-cimene, beta-terpene, beta-mircene, timolo, terpinene, carvacrolo, p-cymol, beta-ionone, dillapiolo, anisaldeide, cariofillene, carvone e miristica (Atia et. al. 2011). Questi composti volatili sono responsabili di alcune note aromatiche di sedano, finocchio comune e buccia di agrumi verdi (Renna et. al. 2018).

Come studiato da Renna et al. (2018), i composti bioattivi sono distribuiti in modo diverso nella pianta e possono trovare applicazione in vari settori: alimentare, medico, cosmetico ecc. In foglie, steli, fiori e semi vengono perciò osservate varie concentrazioni di questi **composti bioattivi**, che principalmente sono metaboliti secondari per la pianta (Martins-Noguel et al. 2022). Come riportato da Mekinic et al. (2018), la composizione molecolare varia a seconda del genotipo, habitat e stadio vegetativo della pianta. Le foglie in generale contengono una quantità significativa di composti come acido ascorbico, **carotenoidi**, tannini e flavonoidi. È interessante sottolineare che questa alofita presenta un elevato contenuto fenolico rispetto ad altre specie vegetali; anch'esso può variare notevolmente in base al periodo di vegetazione (Jallali et al. 2012). Le parti aeree contengono un numero elevato di composti volatili e le condizioni di crescita della pianta influiscono sulla composizione in oli essenziali, alterando il contenuto dei costituenti: frutti e semi contengono **oli essenziali**, lipidi e **tocoferoli**.

Inoltre, l'ottimizzazione di pratiche agronomiche come l'uso di acqua salmastra o di acqua marina per l'irrigazione, potrebbe consentire un aumento del contenuto di composti bioattivi in piante coltivate per il commercio. L'obiettivo è migliorare il valore del prodotto finale attraverso la creazione di alimenti funzionali o incorporare composti bioattivi nell'integrazione alimentare (Buhmann et al. 2013).

Quindi, grazie alla presenza di composti bioattivi, il *C. maritimum* presenta diversi effetti bioattivi. Infatti, recentemente Souid et al. (2020) hanno riferito che gli estratti idro-metanolici da foglie di finocchio marino possiedono una significativa attività antiossidante *in vitro* (DPPH e ORAC). Mentre gli stessi estratti hanno esibito *in vivo* effetti protettivi nel fegato dei ratti contro la tossicità indotta del tetracloruro di carbonio. Nello stesso studio, è stato riscontrato che la somministrazione delle foglie di *C. maritimum* in sospensione d'acqua, ai ratti con tossicità epatica, ha ridotto le attività degli enzimi utilizzati come marcatori di danni al fegato, come ad esempio, alanina e aminotransferasi e aspartato aminotransferasi, così come i livelli di creatina (riduzione del 41,3%).

Carotenoidi e tocoferoli nel C. maritimum

I **carotenoidi** e i **tocoferoli** partecipano al ruolo funzionale del *C. maritimum* come potenti antiossidanti grazie all'attività di vitamine E dei tocoferoli e di precursori della vitamina A di alcuni carotenoidi (Krouia et al., 2023).

Ad oggi, i carotenoidi in *C. maritimum* contengono la vitamina A e sono stati determinati solo con metodi spettrofotometrici (Nabet et al. 2017, Sousa et al. 2022). Questo metodo consente di quantificare la quantità totale di carotenoidi senza indentificare i composti chimici specifici. Tardio et al. (2022) hanno riportato nel *C. maritimum* un contenuto totale di

carotenoidi di 33,0-56,0 mg/kg di foglie fresche, con un valore medio di 41,6 mg/kg. Mentre Nabet et. al. (2017) hanno riferito un valore di 62,2 mg/kg su peso secco, circa 7,5 volte inferiore a quello trovato da Sousa et. al. (2022). Inoltre, l'estrazione con metanolo ha permesso di rilevare una concentrazione totale di carotenoidi di circa 2,43 mg/kg peso secco nelle foglie di *C. maritimum* (Labiad et. al. 2021).

I carotenoidi

Struttura dei carotenoidi

I carotenoidi sono **pigmenti vegetali** di natura lipidica, deputati alla cattura della luce non assorbita dalla clorofilla e di quella presente in eccesso giocando il ruolo di agenti foto protettivi. Queste importanti molecole, molto abbondanti in natura, si trovano in tutte le parti della pianta, compresi frutti, semi, foglie e radici. Esistono oltre 621 tipi di carotenoidi conosciuti; vengono normalmente suddivisi in due classi: i caroteni (idrocarburi privi di ossigeno) e le xantofille (contengono ossigeno). Sono pigmenti accessori che durante la fotosintesi consentono di assorbire lunghezze d'onda diverse rispetto alla clorofilla e che proteggono quest'ultima dalla foto ossidazione (Grigelmo-Miguel et. al. 2009).

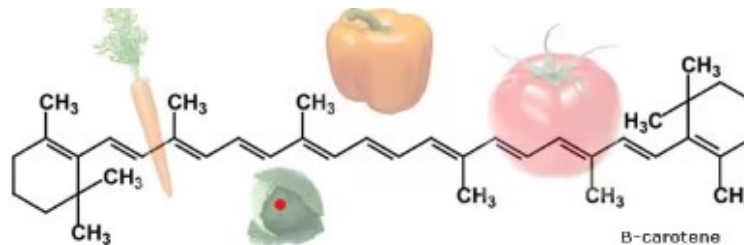


Figura 3. Struttura molecolare del β -carotene (Reboul et al. 2019).

La degradazione ossidativa dei carotenoidi produce una particolare specie di alcheni chiamati apocarotenoidi. Sono polieni contenenti gruppi OH, CHO e COOH e la **vitamina A** (retinolo), per esempio, è un apocarotene con 20 atomi di carbonio che si origina per ossidazione del β -carotene (figura 3). Dal punto di vista chimico, i carotenoidi sono formati generalmente da 8 unità isopreniche, collegate testa-coda, eccetto al centro dove il legame è coda-coda; la catena centrale è costituita da 22 atomi di carbonio, mentre quelle terminali, cicliche o meno, sono formate da 9 atomi di carbonio ciascuna. Le unità terminali cicliche possono presentare un'ampia varietà di gruppi funzionali, per esempio alcolici, chetonici, epossidici ecc.

I carotenoidi, quindi, si dividono in **due gruppi**: i **caroteni** e le **xantofille**. I caroteni sono abbondanti in arance, albicocche, carote, pomodori, peperoni e cachi. I più diffusi sono il licopene e il β -carotene. Le xantofille sono derivate ossigenate dei caroteni; sono abbondanti nel mondo vegetale e in alcuni organismi animali. I pigmenti più importanti sono la luteina e la zeaxantina, entrambe di colore arancione.

Negli organismi fotosintetici i carotenoidi giocano un **ruolo centrale nel processo di fotosintesi**: infatti, da una parte prendono parte alla catena di trasporto dell'energia e dall'altra proteggono il centro di reazione dall'ossidazione. Negli organismi non fotosintetici, invece, queste molecole sembrano avere un ruolo importante nei meccanismi **anti-ossidativi**.

I carotenoidi possiedono molte proprietà fisiologiche e hanno importanti effetti sia nelle piante che in altri organismi. A causa della loro particolare struttura molecolare, sono capaci di legare ed **eliminare radicali liberi** (radical scavenging), giocando un ruolo importante nel sistema immunitario dei vertebrati.

Funzioni dei carotenoidi

Per molti anni l'importanza nutrizionale dei carotenoidi è stata quasi esclusivamente correlata alla capacità di fungere da **precursori della vitamina A** (o retinolo), sostanza tipica del regno animale (figura 4). Si tratta in effetti di una caratteristica molto importante, tipica di alcuni carotenoidi ed in modo particolare del **β -carotene** (nel caso specifico, per fornire all'organismo 1 mg di retinolo ne occorrono circa 6 mg di β -carotene, mentre per gli altri carotenoidi il rapporto è di 12:1). L'alfa-carotene, invece, genera vitamina A meno facilmente, ma ha un'attività antiossidante maggiore del 38%; ed è proprio quest'attività protettiva a suscitare l'interesse dei ricercatori (Eggersdorfer et al. 2018).

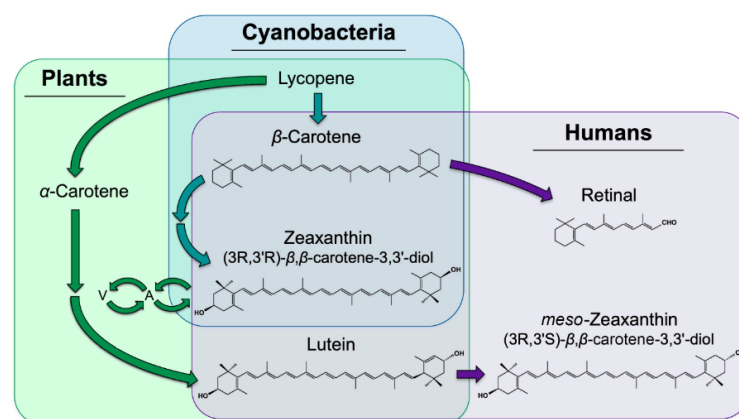


Figura 4. Percorsi biosintetici per la formazione di retinolo, zeaxantina, luteina e meso-zeaxantina (Demmig-Adams B. et al. 2020).

Oltre alla funzione pro vitaminica, infatti, occorre sottolineare come diversi carotenoidi esercitino effetti protettivi nei confronti di svariate patologie; il tutto grazie alla neutralizzazione dei radicali liberi. Queste molecole si formano normalmente nell'organismo, soprattutto in risposta ad eventi di stress, quali radiazioni, fumo, agenti inquinanti, esposizione a raggi UV, stress emotivo e fisico, additivi chimici, attacchi di virus e batteri ecc. (Bohn et al. 2021)

Le **xantofille** (dal greco ξανθός/xanthos, che significa giallo e φύλλα/fylla, foglie) sono una serie di sostanze naturali appartenenti chimicamente alla famiglia dei carotenoidi, di colore variabile tra il giallo, l'arancione e il rosso, largamente diffuse nel regno animale e vegetale (Amegual et al. 2019) (figura 5).

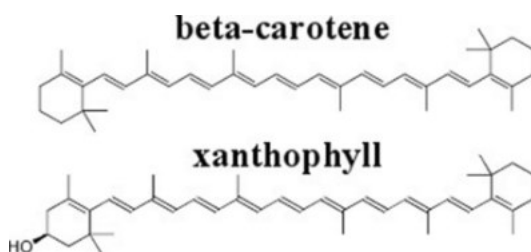


Figura 5. Confronto tra molecola di β -carotene e xantofilla, Reboul et. al. 2019.

Le principali xantofille presenti in natura, sono, la luteina, la criptoxantina, la zeaxantina, la violaxantina e la rubixantina. Si trovano nelle foglie verdi di tutte le piante, nel mais, nell'erba medica, in molti altri vegetali e anche in animali (crostacei e volatili) (Amegual et al. 2019).

Le xantofille sono in genere liposolubili, ma sono meno sensibili dei carotenoidi all'ossidazione. Anche le xantofille, come gli altri derivati del carotene, sono di grande importanza biologica. I carotenoidi vengono prodotti in natura solamente in conseguenza di processi di fotosintesi, e quindi gli animali devono assumerli con la dieta. Le xantofille non sono, come il carotene, precursori della vitamina A, ma tuttavia la loro importanza è notevole in quanto intervengono come protettori dell'ossidazione in molti processi biochimici. La **luteina** e la zeaxantina sono le xantofille presenti in misura maggiore nel corpo umano, in particolare nel plasma, nei tessuti grassi, in alcune ghiandole (Reboul et al. 2019).

La luteina può avere effetti positivi sul colesterolo presente nel plasma. La luteina e la zeaxantina sono i maggiori costituenti della macula lutea della retina umana. Alcuni studi hanno inoltre mostrato l'attività della luteina nell'inibire alcuni tipi di tumore (Li et al. 2023).

Le xantofille trovano largo impiego nell'industria alimentare per i prodotti della pasticceria da forno, gelati, budini, dessert, salse, maionese, frutta candita, bevande e prodotti dietetici, snack. La luteina può essere impiegata come colorante anche in cosmetica in sostituzione del carotene, rispetto al quale mostra una maggior resistenza alla luce e all'ossidazione (Eggersdorfer et al. 2018).

L'impiego come semplice colorante è tuttavia, limitante, infatti l'attività biologica e fisiologica della luteina può essere adeguatamente sfruttata negli integratori e nei complementi alimentari, soprattutto in associazione al carotene ed al tocoferolo. Recentemente la luteina è entrata in alcune farmacopee ed è stata utilizzata come principio farmacologicamente attivo (Hu et. al. 2018).

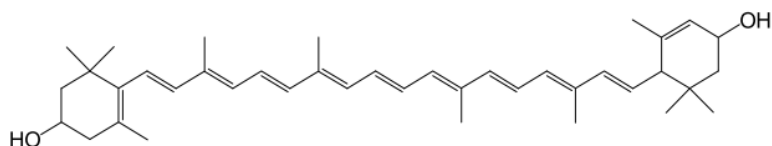


Figura 6. Struttura molecolare della luteina, Reboul et. al. 2019.

La luteina è una sostanza di origine naturale, nota per le sue proprietà antiossidanti e protettive sulla vista (figura 6). Dal punto di vista chimico, la luteina appartiene al gruppo delle xantofille, pigmenti naturali liposolubili contenuti in molti alimenti, di origine animale. Similmente agli altri animali, l'uomo non è in grado di sintetizzare la luteina. Una volta assunta tramite la dieta, questa sostanza si concentra nella macula, cioè nell'area centrale della retina dell'occhio, dove va ad assorbire la luce azzurra naturale (effetto protettivo contro i raggi UV nocivi). Non è quindi un caso che in alcuni studi la luteina si sia dimostrata efficace nel prevenire la degenerazione maculare senile, che riconosce proprio nell'eccessiva esposizione alla luce abbagliante del sole uno dei suoi principali fattori di rischio (insieme al fumo di sigaretta, fattori genetici e agli squilibri nutrizionali) (Li et. al. 2023).

La degenerazione maculare legata all'età e l'Alzheimer sono entrambe malattie pro-infiammatorie che coinvolgono la disfunzione del sistema immunitario e l'infiammazione incontrollata. Esistono prove sostanziali di correlazione tra livelli più elevati di luteina e un rischio inferiore di malattie pro-infiammatorie. Demmig-Adams B. et al. 2020, sostiene che soggetti giovani e sani che hanno ricevuto un supplemento con zeaxantina e luteina per sei mesi, presentano livelli significativamente più bassi di ormoni pro-infiammatori e prestazioni cognitive migliorate su una varietà di complessi compiti.

I tocoferoli

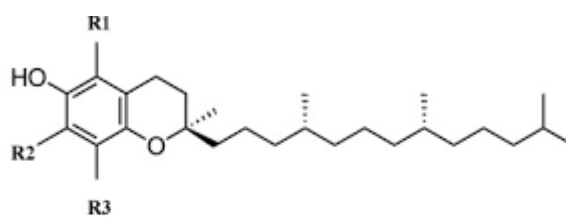
Struttura dei tocoferoli

I tocoferoli sono potenti liposolubili, presente in molti vegetali, ad esempio nella frutta, nell'olio di canapa, nell'olio d'oliva e soprattutto nell'olio di germe di grano. I tocoferoli esplicano attività vitaminica E, maggioritaria nella forma di alfa-tocoferolo. Per questo ne **alfa-tocoferolo** (figura 7) e **vitamina E** sono termini comunemente interscambiabili (Azzi et al. 2018).

Esistono, in natura, otto composti, derivati del 6-cromanolo con quattro gruppi metilici legati all'anello aromatico e con una catena laterale isoprenoide a 16 atomi di carbonio, satura o insatura, in posizione 2, dotati di struttura chimica comune, aventi l'attività biologica della vitamina E. A seconda della presenza di una catena satura o insatura, questi composti vengono divisi in due gruppi: i tocoferoli (α , β , γ , δ) e i tocotrienoli (α , β , γ , δ). Questi ultimi, infatti, presentano tre doppi legami sulla catena isoprenoide. La disposizione dei gruppi metilici permette di distinguere i singoli composti delle due classi. I tocoferoli presentano tre centri stereogenici (su C2, C4 e C8) e i tocotrienoli uno solo (C2) (Azzi et al. 2018).

Biologicamente l'alfa-tocoferolo è la forma vitaminica più potente e attiva. Gli altri tocoferoli hanno attività vitaminica minore, anche se l'attività ossidante aumenta passando dall'alfa al delta, inversamente all'attività vitaminica (Shahidi et al. 2016).

Come affermato da Kiyose et al. (2021), i tocoferoli sono composti oleosi, insolubili in acqua e solubili nei solventi apolari. Sono facilmente degradati dall'ossigeno e dai raggi UV e sono abbastanza resistenti al calore.



Name	R1	R2	R3
α -tocopherol	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
β -tocopherol	-CH ₃	-H	-CH ₃
γ -tocopherol	-H	-CH ₃	-CH ₃
δ -tocopherol	-H	-H	-CH ₃

Figura 7. Struttura molecolare dei tocoferoli, Shahidi et. al. (2016).

Funzioni dei tocoferoli

Come riportato da Kiyose et al. (2021), la **vitamina E** ha un ruolo importante, quale fattore antiossidante (radical scavenging), nella prevenzione dell'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, evento chiave nello sviluppo del processo di perossidazione lipidica. Tale evento, scatenato dall'azione di radicali liberi, si sviluppa attraverso delle reazioni a catena che continuano il processo. La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando un atomo di idrogeno ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno reattivi e bloccando di fatto la perossidazione lipidica. Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la vitamina C o con il glutatione o con il coenzima Q10 per riformare l' α -tocoferolo.

Poiché lo sviluppo della perossidazione lipidica può determinare profonde alterazioni delle membrane cellulari, si comprende il motivo per cui alla vitamina E è riconosciuto un ruolo importante nel mantenere tali strutture indenni. Ciò è verificato anche dal fatto che gli eritrociti, che sono particolarmente sottoposti a stress ossidativo, risentono abbastanza presto di stati carenziali di vitamina E divenendo più sensibili all'emolisi.

Sono ricchi di vitamina E gli alimenti di origine vegetale *in primis* semi (e di conseguenza gli oli da essi derivati, fra i quali l'olio di canapa), seguiti da cereali, frutta e ortaggi. Molto ricche ne sono le nocciole, la noce (frutto) e le mandorle (Lu et al. 2015). Il contenuto vitaminico viene ridotto dai processi di cottura, soprattutto dalla frittura e dalla cottura al forno. La vitamina E può degradarsi anche stando a contatto con l'ossigeno; tale fenomeno viene accentuato dalla contemporanea presenza di metalli e acidi grassi polinsaturi e ridotto dalla presenza di antiossidanti (Lu et al. 2015).

Poiché la vitamina E è presente in otto forme, per poter effettuare valutazioni comparative tra esse si ricorre all'uso dei *Tocoferolo Equivalenti* o delle *Unità internazionali* (UI).

1 Tocoferolo Equivalente = 1 mg RRR-tocoferolo = 1,5 UI = 2 mg β -tocoferolo = 3 mg γ -tocotrienolo = 10 mg γ -tocoferolo (Kiyose et al. 2021).

Al momento non si è in grado di stabilire un valore preciso di assunzione giornaliera di vitamina E, in quanto esso dipende dallo stato delle difese antiossidanti dell'organismo e dalla quantità di acidi grassi polinsaturi presenti nella dieta. Al momento, per la popolazione italiana, si consiglia un'assunzione di 8 mg/die o comunque un apporto non inferiore ai 3 mg/die per le donne e 4 mg/die per gli uomini (Rondanelli et al. 2015).

CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questa di tesi consiste nel caratterizzare tramite la cromatografia liquida i carotenoidi e i tocoferoli in popolazioni spontanee e coltivate di *C. maritimum* in quanto dalla letteratura solo metodi spettrofotometrici sono stati utilizzati su questa pianta alofita emergente. I carotenoidi ed i tocoferoli possono conferire alle formulazioni alimentari un valore funzionale come potenti antiossidanti lipofili e con attività vitaminica. In particolare, i tocoferoli possiedono attività vitaminica E mentre i carotenoidi come il beta-carotene hanno funzione di provitamina A. L'obiettivo è descrivere il valore funzionale di foglie e fiori di popolazioni spontanee di *C. maritimum* raccolte in diverse regioni dell'Italia ed il valore funzionale delle foglie e scarti della coltivazione di *C. maritimum* in termini di carotenoidi e tocoferoli.

Infatti, il *C. maritimum* sta acquisendo rilevanza scientifica come ingrediente, ma solo poche applicazioni alimentari sono disponibili. Un valore funzionale elevato potrebbe così dare più importanza e valore a questo prodotto come nuova coltura sostenibile. In più la raccolta indiscriminata di *C. maritimum* in natura, ha portato alla scomparsa di questa specie da alcuni habitat europei. Per questo motivo, in alcune regioni come l'Inghilterra e il Parco Naturale del Conero (regione Marche, Italia centrale), la pianta è ora protetta e il suo raccolto selvaggio in natura è proibito, per cui la coltura risultata la soluzione più sostenibile al suo consumo.

Finora il *C. maritimum* è sottoutilizzato in Europa e nel bacino del Mediterraneo, anche se alcune piccole e medie aziende sfruttano sempre di più questa risorsa naturale per la produzione agricola. Questa tesi si colloca negli obiettivi del progetto SEAFENNEL4MED che vuole diversificare le abitudini di produzione e di consumo nella dieta mediterranea includendo una gamma più ampia di specie vegetali sottovalutate. Tali piante potrebbero contribuire in modo significativo al miglioramento della salute umana e della nutrizione, aumentando allo stesso tempo i mezzi di sussistenza e la sostenibilità ambientale nel Mediterraneo. Le erbe selvatiche commestibili hanno tradizionalmente svolto un ruolo molto importante nell'integrare alimenti di base e potrebbero farlo di nuovo in futuro. L'agricoltura alofita risulta una valida alternativa agronomica. Si sta accumulando una consistente quantità

di informazioni sulle alofite e lo sforzo per sviluppare ecotipi utili è solo all'inizio. Le alofite selvatiche, o parzialmente addomesticate, esistono già in quasi tutti gli ecosistemi regionali, in particolare nel Mediterraneo.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

È stata determinata la composizione dei carotenoidi e dei tocoferoli nei fiori e foglie da popolazioni selvatiche di *C. maritimum*, provenienti da varie regioni italiane. Inoltre, si è analizzato un campione di foglie di *C. maritimum* coltivato e comparato con il residuo di coltivazione dal campo.

Campionamento delle popolazioni selvatiche di *C. maritimum*

Foglie (n=7) e fiori (n=6) sono stati raccolti nel periodo di fioritura della pianta in agosto-settembre 2023 da popolazioni di *C. maritimum* selvatico (n=7) che crescono spontaneamente nelle zone costiere italiane: Calabria (CAL); Marche, Parco Regionale del Conero (CON); Marche, Porto Potenza Picena (MAR); Puglia (APU); Sardegna (SAR); Sicilia (SIC), Toscana (TUS) come in figura 8.



Figura 8. Sette siti di campionamento di foglie (n=7) e fiori (n=6) di *C. maritimum* di popolazioni selvatiche in diverse regioni d'Italia. Calabria (CAL); Marche, Parco del Conero (CON); Marche, Porto Potenza Picena (MAR); Puglia (APU); Sardegna (SAR); Sicilia (SIC); Toscana (TOS).

Le specie vegetali delle piante di *C. maritimum* sono state identificate dai botanici del Dipartimento di Scienze Agricole, Alimentari e Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche, utilizzando tratti morfologici e distribuzione geografica di *C. maritimum*. Circa 500g di giovani foglie fresche sono state campionate mescolandole con germogli di diversi individui della stessa popolazione; successivamente sono stati campionati circa 500g di fiori da ogni

popolazione. I campioni di foglie e fiori sono stati conservati separatamente in sacchetti di plastica sterili, trasportati in laboratorio in condizioni di refrigerazione e conservate a -20°C fino alla stabilizzazione con liofilizzazione. L'obiettivo era di conservarli nelle migliori condizioni a lungo termine fino ad ulteriori analisi.

Campionamento di *C. maritimum* da coltivazione

È stato raccolto un campione di *C. maritimum* coltivato in campo aperto nella regione delle Marche (Italia centrale), per confrontare le colture selvatiche con quelle coltivate in termini di potenziale fitochimico. Le foglie di *C. maritimum* coltivato sono state raccolte manualmente, essiccate all'aria in un essiccatore De Clot a $<40^{\circ}\text{C}$, fino a raggiungere la percentuale di $\text{RH}\% < 15$ e successivamente macinate per ottenere una polvere e conservate a 20°C (figura 9).



Figura 9. Campione di foglie essiccate di *C. maritimum* coltivate

Inoltre, è stato raccolto un campione di residuo di coltivazione (figura 10) corrispondente alla biomassa residua dal ciclo di coltivazione contenente parti aeree, semi, fiori e sfalciio autunnale.



Figura 10. Residuo di coltivazione, sottoprodotto del *C. maritimum*

Determinazione dei carotenoidi in foglie e fiori

In 100 mg di campioni secco sono stati aggiunti 5 ml di acetone a 4°C, poi refrigerati a 4 +/- 1°C per 15 minuti, agitati per 5 minuti e centrifugati a 1370 rpm per 10 min a 4°C. Successivamente abbiamo ripetuto l'estrazione in acetone una seconda volta. Il surnatante una volta filtrato su "Sartorius Regenerated Cellulose Membrane", è stato portato a secco con il Rotavapor e risospeso in 0,5 ml in una miscela di solvente composta da acetonitrile al 75%, diclorometano al 10% e metanolo al 15% (figura 11). Il tutto è stato iniettato in un sistema cromatografico liquido (UPLC) "Acquity Ultra Pressure" (Waters Corporation, Milford, USA); dotato di rilevatori a fotodi (PDA=photo diode array detector) e del fluorimetro (FLD=fluorometric detector) e di una colonna Ascentis UPLC C18. Le condizioni cromatografiche sono state riportate in Narrea et al. 2023. La fase mobile era composta dalla fase A, costituita da acetonitrile (75%), diclorometano (10%) e metanolo (15%) e dalla fase B, costituita da acetato di ammonio in acqua (0,05 M). Il gradiente è iniziato al 75% A, mantenuto per 10 minuti, fino al 98% in 1 minuto e mantenuto in modalità isocratica fino a 20 minuti. La portata è stata di 0,4 ml/min, il forno a colonna è stato impostato a 35 °C e il caricamento del campione è stato effettuato a 20 °C. L'analisi PDA è stata eseguita a una lunghezza d'onda di 450 nm dopo una scansione dello spettro nell'intervallo 210-500 nm.

I carotenoidi sono stati identificati confrontando il tempo di ritenzione e lo spettro di assorbimento con gli standard puri. La loro quantificazione è stata effettuata mediante calibrazione esterna. Buoni coefficienti di correlazione (R^2) di 0,999 sono stati ottenuti nell'intervallo 1-100 µg/ml per la luteina e 0,05-100 µg/ml per il beta-carotene.



Figura 11. Carotenoidi estratti da campioni di *C. maritimum*.

Determinazione dei tocoferoli in foglie e fiori

I tocoferoli sono stati determinati simultaneamente ai carotenoidi, quindi nella stessa preparazione del campione e separazione cromatografica. Diversamente, per i tocoferoli è stato utilizzato un rivelatore fluorimetrico (FLD) impostato su una lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 290 e 330 nm. I tocoferoli sono stati identificati

confrontando il tempo di ritenzione con gli standard puri e quantificati con la calibrazione esterna. Le soluzioni madre standard di ciascun tocoferolo sono state preparate nell'intervallo 0-100 µg/ml e sono stati ottenuti buoni coefficienti di correlazione per la curva di calibrazione ($R^2 = 0,9836-0,9965$).

Analisi statistica

I dati chimici sono riportati come valori medi \pm deviazione standard (SD) di tre repliche. I dati sono stati analizzati dall'ANOVA unidirezionale e dal test di confronto medio di Tukey a un livello di significatività di $p < 0,05$ utilizzando la versione 3.5.0 del software R.

CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE

Identificazione dei carotenoidi e tocoferoli

Nelle foglie e nei fiori di popolazioni spontanee di *C. maritimum*, l'analisi simultanea di carotenoidi e tocoferoli eseguita utilizzando la cromatografia liquida UPLC-PDA/FLD ha permesso di identificare quattro xantofille (neoxantina, violaxantina, zeaxantina e luteina), un carotene (β -carotene) riportato in figura 12, e β/γ -tocoferolo e α -tocoferolo come riportato in figura 13.

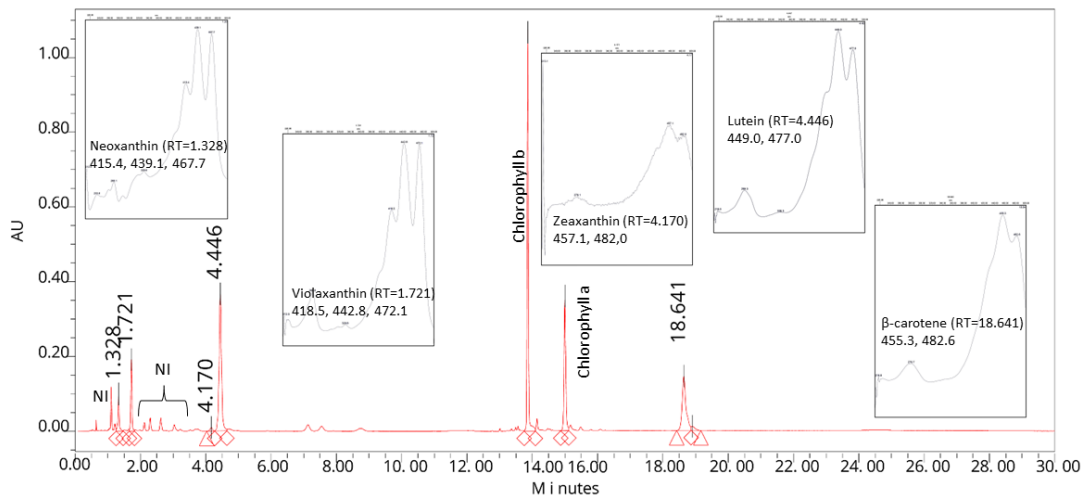


Figura 12. Cromatografia UHPLC dei carotenoidi rilevato a 450 nm con rivelatore PDA.

Nelle foglie e fiori di *C. maritimum* selvatico i picchi identificati e quantificati sono: neoxantina, violaxantina, zeaxantina, luteina, β -carotene. Le clorofille a e b sono state identificate, ma non quantificate.

Per i tocoferoli, la forma principale è l' α -tocoferolo, seguito da β/γ -tocoferolo, poiché la fase inversa non consente la separazione tra β e γ -tocoferolo (figura 13).

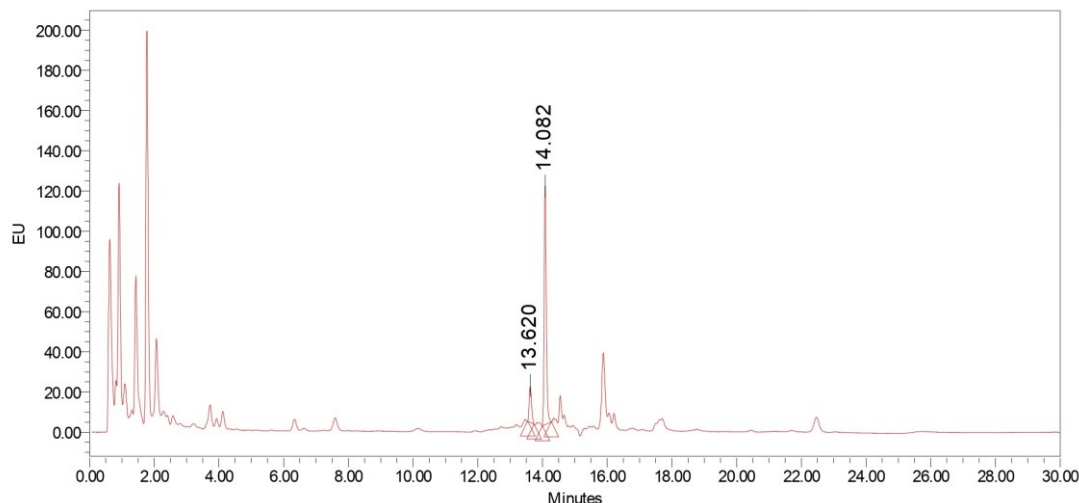


Figure 13. Cromatogramma UHPLC dei tocoferoli rilevati con FLD. Nelle foglie e fiori di *C. maritimum* selvatico i picchi identificati e quantificati sono: β e γ -tocoferolo (tempo di ritenzione, RT=13.620) e α -tocoferolo (RT=14.082).

Quantificazione dei carotenoidi nel *C. maritimum* spontaneo

Dalla tabella 4, nelle foglie di *C. maritimum*, la neoxantina, la violaxantina, la luteina e il β -carotene sono stati trovati a livelli più bassi nella popolazione selvatica siciliana (SIC), seguita dal campione di *C. maritimum* delle Marche (MAR). I valori più alti invece, sono stati riscontrati nella popolazione selvatica Sarda (SAR).

Considerando i principali carotenoidi presenti nelle foglie, luteina e carotene variano rispettivamente da $190,89 \pm 12,19$ (SAR) a $106,41 \pm 10,37$ (SIC) mg/kg peso secco e da $111,05 \pm 14,04$ (SAR) a $44,37 \pm 9,18$ (SIC) mg/kg peso secco. Il contenuto totale di carotenoidi è il seguente: SAR>TOS>PUG>MAR>CON>CAL>SIC>MAR.

Nei fiori di popolazione selvatiche, il contenuto totale di carotenoidi è: MAR>TOS>PUG>CAL>SIC. La luteina varia da $48,25 \pm 4,12$ (MAR) a $32,59 \pm 2,84$ (SIC) mg/kg peso secco. Il β -carotene varia da $20,39 \pm 5,44$ (MAR) a $10,29 \pm 0,88$ (SIC) mg/kg peso secco (tabella 4).

I metodi spettrofotometrici finora applicati al *C. maritimum*, hanno rivelato un'ampia gamma di carotenoidi totali contenuti da un massimo di 470 mg/kg peso secco dell'intera pianta (Sousa et al., 2022), 338 mg/kg di foglie commestibili (Guil-Guerrero e Rodriguez-Garcia, 1999), 62,2 mg/kg peso secco nelle parti aeree (Nabet et al., 2017), e un minimo di 2,43-4,25 mg/kg peso secco di tessuto fogliare di *C. maritimum* cresciuto idroponicamente sotto stress da sale (Labiad et al., 2021). Altre specie di *Apiaceae*, come *Hydrocotyle asiatica*, *Daucus carota* e *Coriandolo sativum* hanno mostrato rispettivamente: 90, 121 e 675 mg di β -carotene/kg DW (Raju et al., 2007).

Tabella 3. Carotenoidi nelle foglie e nei fiori di popolazioni di *C. maritimum* selvatiche. I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$). CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.

Foglie mg/kg secco	Neoxantina	Violaxantina	Zeaxantina	Luteina	β -carotene	Tot carotenoidi
CAL	12,86 \pm 0,86 ^{abc}	29,55 \pm 4,52 ^{ab}	1,88 \pm 0,16 ^d	152,10 \pm 8,91 ^{ab}	82,37 \pm 10,76 ^a	278,76 \pm 19,30 ^b
CON	14,95 \pm 2,98 ^{abc}	37,88 \pm 3,01 ^a	2,43 \pm 0,23 ^d	140,07 \pm 10,43 ^{ab}	85,50 \pm 8,95 ^a	280,83 \pm 18,47 ^{ab}
MAR	17,96 \pm 1,68 ^{ab}	41,75 \pm 6,01 ^a	4,94 \pm 0,59 ^{bc}	156,16 \pm 3,34 ^{ab}	88,43 \pm 10,42 ^a	309,24 \pm 20,90 ^{ab}
PUG	19,57 \pm 1,64 ^{ab}	18,33 \pm 3,78 ^b	1,65 \pm 0,16 ^d	187,31 \pm 15,96 ^a	87,69 \pm 10,53 ^a	314,01 \pm 17,99 ^{ab}
SAR	21,29 \pm 4,66 ^a	41,04 \pm 4,48 ^a	4,21 \pm 0,69 ^c	190,89 \pm 12,19 ^a	111,05 \pm 14,04 ^a	368,49 \pm 12,60 ^a
SIC	6,12 \pm 2,93 ^c	2,35 \pm 0,78 ^c	6,33 \pm 0,50 ^a	106,41 \pm 10,37 ^b	44,37 \pm 9,18 ^b	165,58 \pm 23,17 ^c
TOS	18,99 \pm 5,95 ^{ab}	30,98 \pm 11,78 ^{ab}	1,60 \pm 0,37 ^d	186,32 \pm 51,64 ^a	84,28 \pm 12,40 ^a	322,18 \pm 74,86 ^{ab}
Fiori mg/kg secco	Neoxantina	Violaxantina	Zeaxantina	Luteina	β -carotene	Tot carotenoidi
CAL	1,45 \pm 1,17 ^a	2,41 \pm 3,07 ^b	1,99 \pm 0,27 ^{cd}	37,93 \pm 4,93 ^{ab}	17,02 \pm 5,26 ^a	60,80 \pm 14,39 ^a
MAR	1,41 \pm 1,19 ^a	3,80 \pm 4,25 ^b	2,26 \pm 0,26 ^{cd}	48,25 \pm 4,12 ^a	20,39 \pm 5,44 ^a	76,11 \pm 15,02 ^a
PUG	2,27 \pm 1,11 ^a	4,14 \pm 1,64 ^b	1,57 \pm 0,10 ^d	41,65 \pm 2,51 ^{ab}	15,42 \pm 1,20 ^a	65,04 \pm 6,54 ^a
SAR	1,40 \pm 0,32 ^a	1,85 \pm 1,96 ^b	2,69 \pm 0,21 ^{bc}	41,87 \pm 2,98 ^{ab}	19,86 \pm 4,89 ^a	67,68 \pm 10,13 ^a
SIC	1,00 \pm 0,58 ^a	1,04 \pm 0,56 ^b	4,32 \pm 0,41 ^a	32,59 \pm 2,84 ^b	10,29 \pm 0,88 ^a	49,25 \pm 4,95 ^a
TOS	2,23 \pm 0,89 ^a	3,61 \pm 1,19 ^b	3,28 \pm 0,41 ^b	47,07 \pm 5,76 ^a	19,73 \pm 1,47 ^a	75,93 \pm 8,17 ^a

Dalla figura 14, nelle foglie di *C. maritimum* delle varie regioni, la luteina è il principale metabolita prodotto rispetto al β -carotene. In media 159,89 mg/kg peso secco di luteina è stata rilevata in tutti i campioni di foglie, quasi il doppio rispetto al β -carotene che invece mediamente è 83,38 mg/kg peso secco. Statisticamente ogni campione, eccetto quello della Sicilia (SIC), presenta una stessa quantità di luteina e β -carotene nelle foglie.

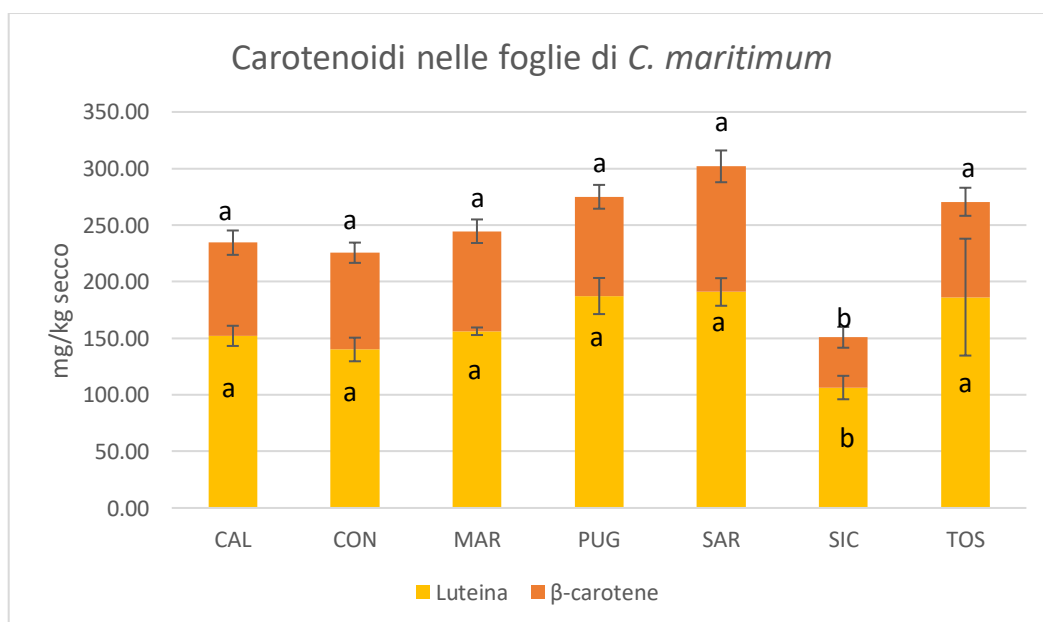


Figura 14. Luteina e β -carotene nelle foglie di popolazioni selvatiche di *C. maritimum*. CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.

I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Come in figura 15, i carotenoidi nei fiori di *C. maritimum*, arrivano ad un massimo di 68,64 mg/kg peso secco per MAR, mentre SIC con solo 42,88 mg/kg peso secco rimane la regione con i campioni più poveri in carotenoidi. Statisticamente: CAL, PUG e SAR, presentano una stessa quantità di luteina e β -carotene in campioni di fiori.

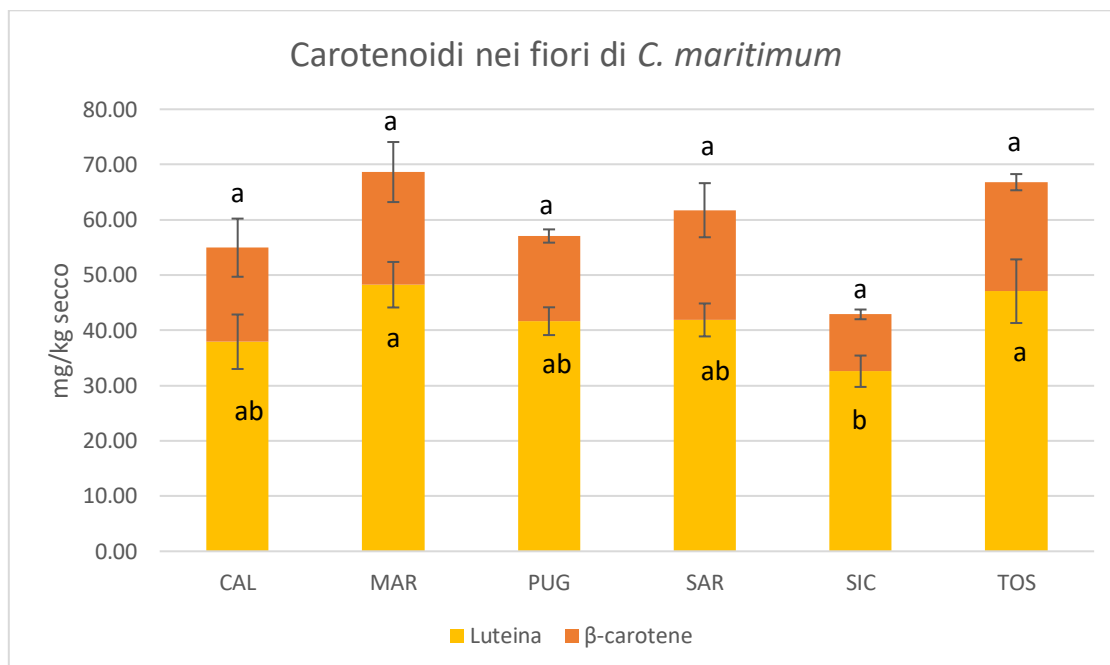


Figura 15. Luteina e β -carotene nei fiori di popolazioni selvatiche di *C. maritimum*. CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.

I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Quantificazione dei tocoferoli nel *C. maritimum* spontaneo

Per quanto riguarda le foglie delle popolazioni selvatiche (tabella 5), il valore più elevato di α -tocoferolo è stato riscontrato nella popolazione selvatica campionata in Calabria (CAL, $528,12 \pm 51,37$ mg/kg peso secco), contro il valore più basso registrato in CON ($270,58 \pm 15,26$ mg/kg peso secco). Le foglie di *C. maritimum* sono un'ottima fonte di α -tocoferolo, quindi di vitamina E, con $528,12$ mg/kg peso secco.

Inoltre, CON ha anche mostrato il valore più basso di γ -tocoferolo, contrariamente alla popolazione selvatica campionata in Toscana (TOS), che ha presentato il valore più elevato ($31,62 \pm 7,38$ mg/kg peso secco). Per il contenuto totale di tocoferolo, l'ordine è CAL > TOS > PUG > SIC > MAR > SAR > CON.

Nei fiori delle popolazioni selvatiche, il contenuto totale di tocoferoli è TOS>PUG>SAR>CAL>MAR>SIC. In dettaglio, i tocoferoli α e γ variano da 6,18±0,00 a 33,17±2,28 mg/kg peso secco e da 17,36±1,30 a 36,73±2,55 mg/kg peso secco (tabella 5).

Per quanto riguarda altre alofite, *A. macrostachyum* ha mostrato 87,4 mg/kg di peso secco (Barreira et al., 2017), mentre valori fino a 176 mg/kg di peso secco sono stati trovati nelle *Salicorniaceae* (Castaneda-Loaiza et al., 2020; Lima et al., 2020).

Tabella 4. Carotenoidi nelle foglie e nei fiori di popolazioni di *C. maritimum* selvatiche. I risultati rappresentano i valori medi ± la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$). CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana

Foglie mg/kg secco	γ -T	α -T		Tot tocoferoli	
CAL	26,20 ± 1,05 ^{ab}	528,12 ±	51,37 ^a	554,32 ±	51,77 ^a
CON	14,85 ± 1,06 ^c	270,58 ±	15,26 ^c	285,43 ±	16,00 ^c
MAR	18,00 ± 2,06 ^{bc}	322,72 ±	41,54 ^{bc}	340,72 ±	43,44 ^{bc}
PUG	23,81 ± 0,66 ^{abc}	500,25 ±	24,19 ^{ab}	524,07 ±	24,29 ^{ab}
SAR	28,31 ± 2,05 ^a	282,60 ±	27,94 ^c	310,91 ±	29,96 ^c
SIC	25,26 ± 3,60 ^{ab}	315,87 ±	60,97 ^c	341,13 ±	64,50 ^{bc}
TOS	31,62 ± 7,38 ^a	521,26 ±	153,40 ^a	552,87 ±	160,27 ^a
Fiori mg/kg secco	γ -T	α -T		Tot tocoferoli	
CAL	17,36 ± 1,30 ^c	33,17 ±	2,28 ^a	50,54 ±	3,58 ^a
MAR	25,11 ± 0,93 ^b	23,42 ±	3,33 ^b	48,53 ±	3,37 ^a
PUG	30,36 ± 0,98 ^b	24,80 ±	2,55 ^b	55,15 ±	2,79 ^a
SAR	28,23 ± 1,57 ^b	23,27 ±	1,58 ^b	51,51 ±	2,33 ^a
SIC	30,52 ± 3,33 ^b	6,18 ±	0,00 ^c	32,58 ±	3,33 ^b
TOS	36,73 ± 2,55 ^a	22,47 ±	4,73 ^b	59,20 ±	7,28 ^a

I campioni di foglie CAL, PUG e TOS presentano valori di α e γ -tocoferolo simili con rispettivamente 554,32 mg/kg peso secco, 524,06 mg/kg peso secco e 552,88 mg/kg peso secco (figura 16).

L' α -tocoferolo è il più abbondante in tutti i campioni rispetto all' γ -tocoferolo, che risulta essere di quantità simile per tutti i campioni (media 24,00 mg/kg peso secco); mentre α -tocoferolo presenta una quantità variabile da un massimo di 528,12 mg/kg peso secco (CAL) ad un minimo di 270,58 mg/kg peso secco (CON).

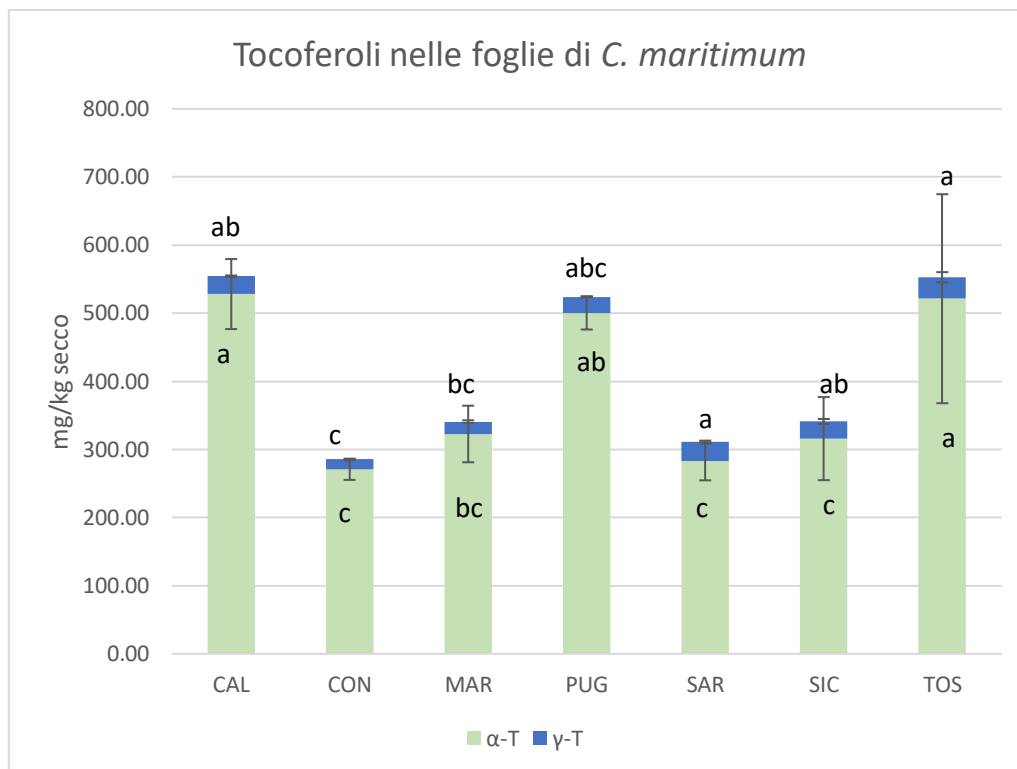


Figura 16. α -tocoferolo e γ -tocoferolo nelle foglie di popolazioni selvatiche di *C. maritimum*. CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.

I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nei fiori invece dalla figura 17, possiamo notare una maggiore quantità di γ -tocoferolo rispetto alle foglie di *C. maritimum*; i campioni MAR e SAR risultano avere una quantità simile di α / γ -tocoferolo rispettivamente 23,42 e 25,11 mg/kg peso secco (MAR) e 23,27 e 28,23 mg/kg peso secco (SAR). Per il campione dalla Calabria (CAL), l' α -tocoferolo (33,17 mg/kg peso secco) è maggiore del γ (17,36 mg/kg peso secco), ma per PUG, SIC e TOS il γ -tocoferolo è maggiore rispetto all' α -tocoferolo.

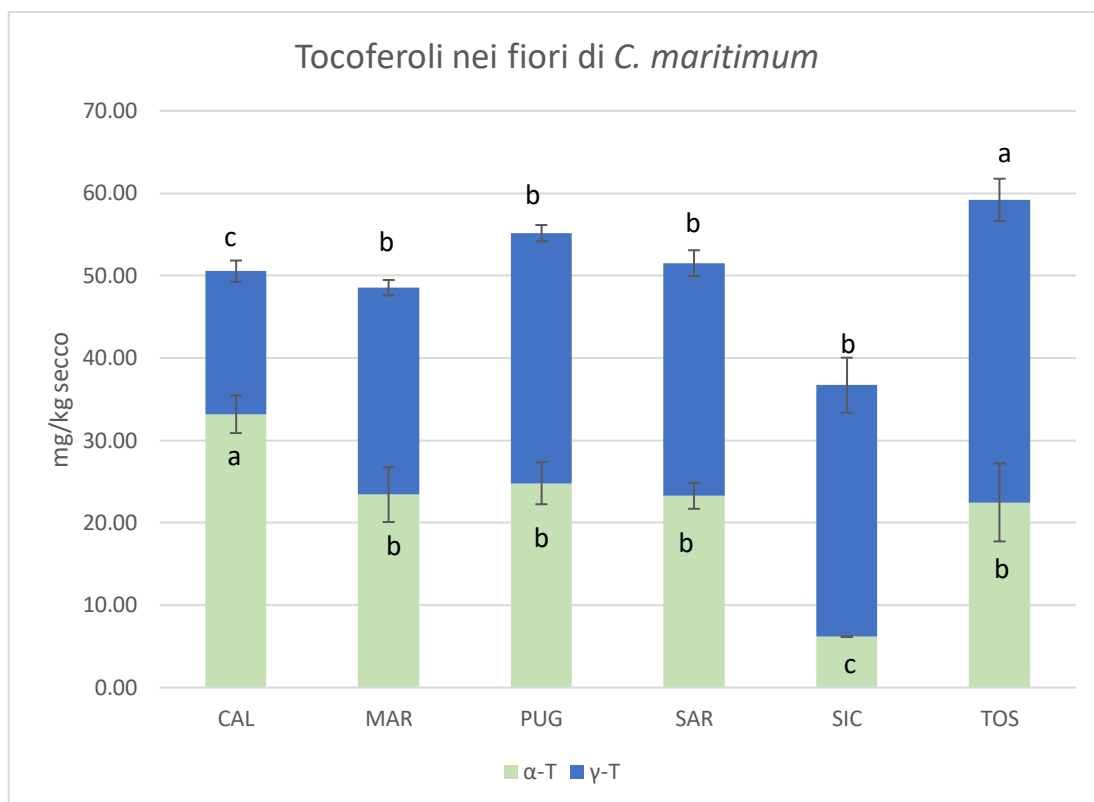


Figura 17. α-tocoferolo e γ-tocoferolo nei fiori di popolazioni selvatiche di *C. maritimum*. CAL= Calabria; CON = Conero, Regione Marche; MAR = Porto Potenza, Marche; PUG = Puglia; SAR= Sardegna; SIC= Sicilia; TOS= Toscana.

I risultati rappresentano i valori medi ± la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Carotenoidi e tocoferoli nel *C. maritimum* coltivato e nel sottoprodotto

In figura 18, possiamo notare che dal residuo di coltivazione i maggiori composti quali luteina e β-carotene permangono, anche se in quantità molto minore rispetto alle foglie coltivate (rispettivamente da 102,54 a 19,99 mg/kg peso secco e da 26,59 a 2,80 mg/kg peso secco).

La neoxantina è quasi del tutto assente nei residui di coltivazione, mentre la violaxantina risulta praticamente assente (0,01 mg/kg peso secco). Nel residuo il β-carotene (2,80 mg/kg peso secco), è poco superiore alla zeaxantina (2,04 mg/kg peso secco), mentre nelle foglie coltivate il β-carotene (26,59 mg/kg peso secco) è più del doppio rispetto a zeaxantina (6,11 mg/kg peso secco) e neoxantina (11,80 mg/kg peso secco).

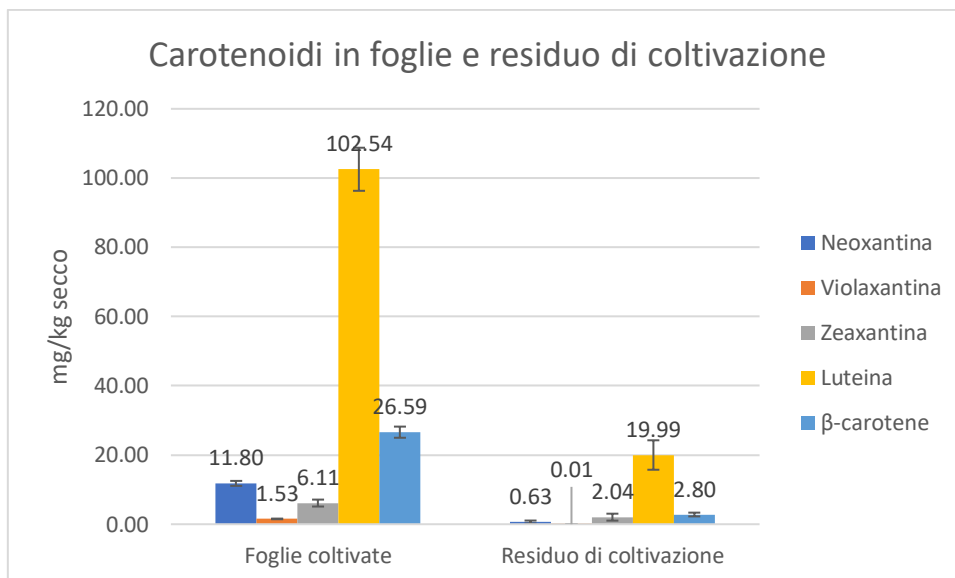


Figure 18. Carotenoidi in foglie e residuo di coltivazione di *C. maritimum*. I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nel residuo di coltivazione l' α -tocoferolo è, come mostrato in figura 19, di quantità molto minore rispetto al contenuto in foglie coltivate (da 194,29 a 19,04 mg/kg peso secco). Mentre il γ -tocoferolo si trova in quantità simile sia in foglie coltivate che nel residuo, rispettivamente 23,65 e 14,94 mg/kg peso secco.

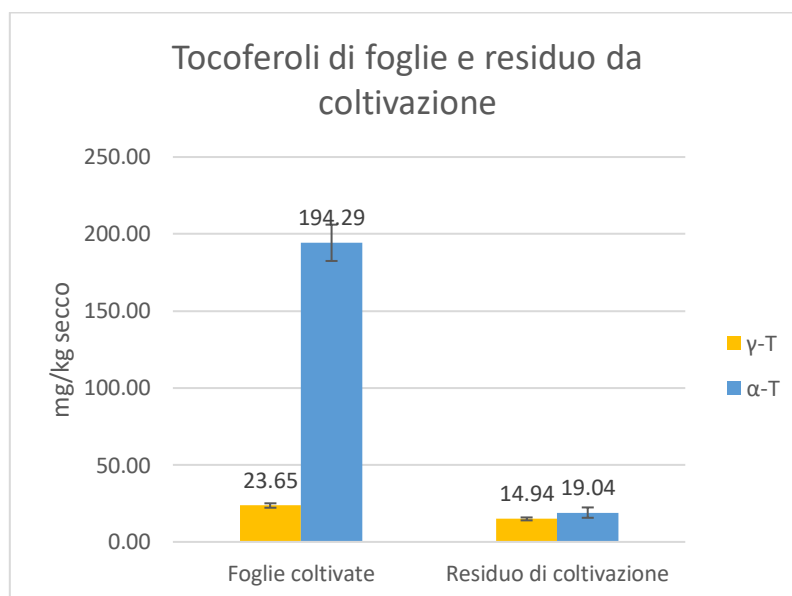


Figure 19. Tocoferoli in foglie e residuo di coltivazione di *C. maritimum*. I risultati rappresentano i valori medi \pm la deviazione standard. Lettere diverse con la stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Discussione

In tutti i campioni, il composto predominante per i carotenoidi è la luteina seguita dal β -carotene. Diversi alofite sono note per essere ricche di carotenoidi (ad esempio, β -carotene, luteina) e tocoferoli (α -tocoferolo) (Castaneda-Loaiza et al., 2020; Lima et al., 2020; Martins-Noguerol et al., 2022), quindi con un alto potenziale per le attività di vitamina A ed E.

Tuttavia, in *C. maritimum* mancava ancora una descrizione approfondita di questi composti. Inoltre, non erano disponibili articoli pubblicati per la determinazione dei carotenoidi in *C. maritimum* e tocoferoli con cromatografia liquida.

Il profilo dei carotenoidi delle verdure a foglie verde usate in medicina, comprese le specie Apiacee come le foglie di coriandolo e i verdi di carota, concordano con i nostri risultati, poiché sono stati identificati anche neoxantina, violaxantina, luteina, zeaxantina e β -carotene (Raju et al. 2007).

Per i tocoferoli, la forma principale è α -tocoferolo, seguito da β/γ -tocoferolo, poiché la fase inversa non consente la separazione tra β e γ -tocoferolo. In accordo, le alofite *Salicorniacee* portoghesi contenevano α -tocoferolo come isomero dominante, seguito da γ -tocoferolo (Barreira et al., 2017) e questa distribuzione è tipica delle alofite (Ksouri et al., 2012).

I metodi spettrofotometrici finora applicati al *C. maritimum* hanno rivelato un'ampia gamma di carotenoidi totali e le foglie di *C. maritimum* sono un'ottima fonte di α -tocoferolo, quindi di vitamina E. I tocoferoli forniscono vitamina E sotto diverse forme, ma dalle linee guida dell'Autorità Europea Per La Sicurezza Alimentari (EFSA), solo α -tocoferolo può essere utilizzato per calcolare la vitamina E (EFSA NDA Panel, 2015). Tuttavia, il γ -tocoferolo è risultato aver maggior effetto antiossidante, antitumorale e antinfiammatorio per le cellule e animali. Pertanto, la sua presenza in *C. maritimum* è potenzialmente rilevante (Jiang et al., 2022). La differenza osservata per il contenuto di carotenoidi o tocoferoli potrebbe essere attribuita all'ecotipo delle popolazioni, alla variazione dello stadio vegetativo, causato principalmente dall'origine geografica dei campioni. Di conseguenza, il profilo fitochimico del *C. maritimum* è dipendente dal suo habitat (Martins-Noguel et al., 2022; Meot-Duros e Magnè et al., 2009) e dallo stato vegetativo (Generalic Mekinic et al., 2012; Jallali et al., 2012).

CONCLUSIONI

I risultati evidenziano che foglie e i fiori delle popolazioni di *C. maritimum* selvatico e coltivato possono essere considerate un'ottima fonte di luteina, β -carotene, α - e γ -tocoferolo, in particolar modo per le foglie sono più ricche in carotenoidi e tocoferoli. Il γ -tocoferolo è maggiormente presente nei fiori. Una grande variabilità è stata osservata nel profilo fitochimico indagato dei campioni provenienti da popolazioni di regione italiane analizzate, quali: Calabria, Toscana, Puglia, Sicilia, Marche, Sardegna e Conero. La regione con un maggior contenuto di luteina e β -carotene nei campioni di foglie risulta essere la Sardegna, mentre nei campioni di fiori risulta essere la regione Marche. La Calabria presenta invece la maggior quantità di α -tocoferolo in campioni di foglie e fiori, mentre il γ -tocoferolo è maggiormente presente nei campioni della regione Toscana.

Nel *C. maritimum* coltivato osserviamo soprattutto la presenza di luteina, β -carotene e α -tocoferolo, perciò risulta essere un buon prodotto. Rispetto al *C. maritimum* selvatico quello coltivato però risulta avere una minor quantità di α -tocoferolo e β -carotene. I residui di coltivazione sono molto meno ricchi di sostanze bioattive, solo la luteina e α/γ -tocoferolo sono presenti in quantità rilevanti rispetto ad altre sostanze che invece risultano solo in tracce.

Si raccomandano ulteriori studi per approfondire la conoscenza di questa coltura emergente e successivamente per incoraggiarne la sua diffusione su larga scala attraverso un aumento della consapevolezza sia del consumatore che degli agricoltori riguardo le caratteristiche nutrizionali e funzionali altamente preziose di *C. maritimum*. A questo proposito “SEAFENNEL4MED”, un progetto emergente di sistemi di coltivazione innovativi per incrementare l'agro biodiversità, la redditività, la circolarità e la resilienza ai cambiamenti climatici nelle piccole aziende agricole del mediterraneo, è stato recentemente finanziato nell'ambito del programma PRIMA (bando 2021). L'obiettivo è introdurre nuovi sistemi di coltivazione sostenibili basati sul *C. maritimum* che saranno in grado di far fronte alle risorse limitate (acque dolci e suoli fertili), vincoli ambientali (perdita di biodiversità e inquinamento chimico) e rischi climatici (salinizzazione del suolo e siccità) per migliorare la stabilità della produzione alimentare nel tempo. A tal fine, prototipi su scala industriale a laboratoriale di

nuovi alimenti di alto valore (pasta, spuntini e bevande), ingredienti alimentari (condimenti) e nutraceutici non ancora disponibili sul mercato saranno formulati e progettati.

BIBLIOGRAFIA

- Alemán, Ailén, Daniel Marín, Diego Taladrid, Pilar Montero, and M. Carmen Gómez-Guillén. 2019. “Encapsulation of Antioxidant Sea Fennel (*Crithmum Maritimum*) Aqueous and Ethanolic Extracts in Freeze-Dried Soy Phosphatidylcholine Liposomes.” *Food Research International* 119:665–74. doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.044.
- Alves-Silva, Jorge M., Inês Guerra, Maria José Gonçalves, Carlos Cavaleiro, Maria Teresa Cruz, Artur Figueirinha, and Lígia Salgueiro. 2020. “Chemical Composition of *Crithmum Maritimum* L. Essential Oil and Hydrodistillation Residual Water by GC-MS and HPLC-DAD-MS/MS, and Their Biological Activities.” *Industrial Crops and Products* 149. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112329.
- Amengual, Jaume. 2019. “Bioactive Properties of Carotenoids in Human Health.” *Nutrients* 11(10).
- Anon. n.d. 2022 *MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI*.
- Atia, Abdallah, Zouhaier Barhoumi, Rabhi Mokded, Chedly Abdelly, and Abderrazak Smaoui. 2011. “Environmental Eco-Physiology and Economical Potential of the Halophyte *Crithmum Maritimum* L. (Apiaceae).” *Journal of Medicinal Plants Research* 5(16):3564–71.
- Atia, Abdallah, Ahmed Debez, Zouhaier Barhoumi, Chedly Abdelly, and Abderrazak Smaoui. 2010. “Localization and Composition of Seed Oils of *Crithmum Maritimum* L. (Apiaceae).” *African Journal of Biotechnology* 9(39):6482–85.
- Azzi, Angelo. 2018. “Many Tocopherols, One Vitamin E.” *Molecular Aspects of Medicine* 61:92–103.
- Bohn, Torsten, M. Luisa Bonet, Patrick Borel, Jaap Keijer, Jean Francois Landrier, Irina Milisav, Joan Ribot, Patrizia Riso, Brigitte Winklhofer-Roob, Yoav Sharoni, Joana Corte-Real, Yvonne Van Helden, Monica Rosa Loizzo, Borut Poljšak, Marisa Porrini, Johannes Roob, Polonca Trebše, Rosa Tundis, Agata Wawrzyniak, Ralph Rühl, and Joanna Dulińska-Litewka. 2021. “Mechanistic Aspects of Carotenoid Health Benefits - Where Are We Now?” *Nutrition Research Reviews* 34(2):276–302.
- Buhmann, Anne, and Jutta Papenbrock. 2013. “An Economic Point of View of Secondary Compounds in Halophytes.” Pp. 952–67 in *Functional Plant Biology*. Vol. 40.

- Castillo, Jesús M., Juan Manuel Mancilla-Leytón, Raquel Martins-Noguerol, Xoaquín Moreira, Antonio Javier Moreno-Pérez, Sara Muñoz-Vallés, Justo J. Pedroche, Manuel Enrique Figueroa, Alberto García-González, Joaquín J. Salas, María C. Millán-Linares, Marta Francisco, and Jesús Cambrollé. 2022. “Interactive Effects between Salinity and Nutrient Deficiency on Biomass Production and Bio-Active Compounds Accumulation in the Halophyte *Crithmum Maritimum*.” *Scientia Horticulturae* 301. doi: 10.1016/j.scienta.2022.111136.
- D’agostino, Giulia, Belinda Giambra, Franco Palla, Maurizio Bruno, and Natale Badalamenti. 2021. “The Application of the Essential Oils of *Thymus Vulgaris* L. And *Crithmum Maritimum* L. as Biocidal on Two Tholu Bommalu Indian Leather Puppets.” *Plants* 10(8). doi: 10.3390/plants10081508.
- Demmig-Adams, B., López-Pozo, M., Stewart, J. J., & Adams III, W. W. (2020). Zeaxanthin and lutein: Photoprotectors, anti-inflammatories, and brain food. *Molecules*, 25(16), 3607.
- Eggersdorfer, Manfred, and Adrian Wyss. 2018. “Carotenoids in Human Nutrition and Health.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 652:18–26.
- Generalić Mekinić, Ivana, Ivica Blažević, Ivana Mudnić, Franko Burčul, Mia Grga, Danijela Skroza, Iva Jerčić, Ivica Ljubenković, Mladen Boban, Mladen Miloš, and Višnja Katalinić. 2016. “Sea Fennel (*Crithmum Maritimum* L.): Phytochemical Profile, Antioxidative, Cholinesterase Inhibitory and Vasodilatory Activity.” *Journal of Food Science and Technology* 53(7):3104–12. doi: 10.1007/s13197-016-2283-z.
- Generalić Mekinić, Ivana, Vida Šimat, Ivica Ljubenković, Franko Burčul, Mia Grga, Marija Mihajlovski, Ružica Lončar, Višnja Katalinić, and Danijela Skroza. 2018. “Influence of the Vegetation Period on Sea Fennel, *Crithmum Maritimum* L. (Apiaceae), Phenolic Composition, Antioxidant and Anticholinesterase Activities.” *Industrial Crops and Products* 124:947–53. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.080.
- Giordano, Rocco, Zeinab Saii, Malthe Fredsgaard, Laura Sini Sofia Hulkko, Thomas Bouet Guldbæk Poulsen, Mikkel Eggert Thomsen, Nanna Henneberg, Silvana Maria Zucolotto, Lars Arendt-Nielsen, Jutta Papenbrock, Mette Hedegaard Thomsen, and Allan Stensballe. 2021. “Pharmacological Insights into Halophyte Bioactive Extract Action on Anti-Inflammatory, Pain Relief and Antibiotics-Type Mechanisms.” *Molecules* 26(11).
- Grigelmo-Miguel, Nuria, Ma Alejandra Rojas-Graü, Robert Soliva-Fortuny, and Olga Martín-Belloso. 2009. “Methods of Analysis of Antioxidant Capacity of Phytochemicals.” Pp. 271–307 in *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*. Wiley-Blackwell.

- Guil-Guerrero, José L., and Ignacio Rodríguez-García. 1999. "Lipids Classes, Fatty Acids and Carotenes of the Leaves of Six Edible Wild Plants." *European Food Research and Technology* 209(5):313–16. doi: 10.1007/s002170050501.
- Houta, Olfa, Ahmed Akrouf, Mohamed Neffati, and Hassen Amri. 2011. *Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of Crithmum Maritimum Cultivated in Tunisia Arid Zones*.
- Hu, Jianjun, Dillirani Nagarajan, Quanguo Zhang, Jo Shu Chang, and Duu Jong Lee. 2018. "Heterotrophic Cultivation of Microalgae for Pigment Production: A Review." *Biotechnology Advances* 36(1):54–67.
- Jallali, Ines, Wided Megdiche, Baya M'Hamdi, Samia Oueslati, Abderrazek Smaoui, Chedly Abdelly, and Riadh Ksouri. 2012. "Changes in Phenolic Composition and Antioxidant Activities of the Edible Halophyte *Crithmum Maritimum* L. With Physiological Stage and Extraction Method." *Acta Physiologiae Plantarum* 34(4):1451–59. doi: 10.1007/s11738-012-0943-9.
- Jallali, Ines, Yosr Zaouali, Ibtissem Missaoui, Abderrazek Smeoui, Chedly Abdelly, and Riadh Ksouri. 2014. "Variability of Antioxidant and Antibacterial Effects of Essential Oils and Acetonic Extracts of Two Edible Halophytes: *Crithmum Maritimum* L. and *Inula Crithmoïdes* L." *Food Chemistry* 145:1031–38. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.034.
- Karkanis, Anestis, Nikolaos Polyzos, Maria Kompocholi, and Spyridon A. Petropoulos. 2022. "Rock Samphire, a Candidate Crop for Saline Agriculture: Cropping Practices, Chemical Composition and Health Effects." *Applied Sciences (Switzerland)* 12(2). doi: 10.3390/app12020737.
- Kiyose, Chikako. 2021. "Absorption, Transportation, and Distribution of Vitamin E Homologs." *Free Radical Biology and Medicine* 177:226–37. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.016.
- Kraouia, Maryem, Ancuta Nartea, Antonietta Maoloni, Andrea Osimani, Cristiana Garofalo, Benedetta Fanesi, Lama Ismaiel, Lucia Aquilanti, and Deborah Pacetti. 2023. "Sea Fennel (*Crithmum Maritimum* L.) as an Emerging Crop for the Manufacturing of Innovative Foods and Nutraceuticals." *Molecules* 28(12).
- Labiad, M. Hatim, Almudena Giménez, Hafise Varol, Yüksel Tüzel, Catalina Egea-Gilabert, Juan A. Fernández, and María Del Carmen Martínez-Ballesta. 2021. "Effect of Exogenously Applied Methyl Jasmonate on Yield and Quality of Salt-Stressed Hydroponically Grown Sea Fennel (*Crithmum Maritimum* L.)." *Agronomy* 11(6). doi: 10.3390/agronomy11061083.

- Li, Xiang, Roberta R. Holt, Carl L. Keen, Lawrence S. Morse, Angela M. Zivkovic, Glenn Yiu, and Robert M. Hackman. 2023. "Potential Roles of Dietary Zeaxanthin and Lutein in Macular Health and Function." *Nutrition Reviews* 81(6):670–83.
- Lu, Dan, Yi Yang, Yongxin Li, and Chengjun Sun. 2015. *Send Orders for Reprints to Reprints@benthamscience.Ae Analysis of Tocopherols and Tocotrienols in Pharmaceuticals and Foods: A Critical Review*. Vol. 11.
- Martins-Noguerol, Raquel, Luis Matías, Ignacio Manuel Pérez-Ramos, Xoaquín Moreira, Sara Muñoz-Vallés, Juan Manuel Mancilla-Leytón, Marta Francisco, Alberto García-González, Cristina DeAndrés-Gil, Enrique Martínez-Force, María del Carmen Millán-Linares, Justo Pedroche, Manuel Enrique Figueroa, Antonio Javier Moreno-Pérez, and Jesús Cambrollé. 2022. "Differences in Nutrient Composition of Sea Fennel (*Crithmum Maritimum*) Grown in Different Habitats and Optimally Controlled Growing Conditions." *Journal of Food Composition and Analysis* 106. doi: 10.1016/j.jfca.2021.104266.
- Meot-Duros, Laetitia, and Christian Magné. 2009. "Antioxidant Activity and Phenol Content of *Crithmum Maritimum* L. Leaves." *Plant Physiology and Biochemistry* 47(1):37–41. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.09.006.
- Mercadante, Adriana Zerlotti, Daniele B. Rodrigues, Fabiane C. Petry, and Lilian Regina Barros Mariutti. 2017. "Carotenoid Esters in Foods - A Review and Practical Directions on Analysis and Occurrence." *Food Research International* 99:830–50. doi: 10.1016/j.foodres.2016.12.018.
- Mugao, Lydia G., Bernard M. Gichimu, Phyllis W. Muturi, and Simon T. Mukono. 2020. "Characterization of the Volatile Components of Essential Oils of Selected Plants in Kenya." *Biochemistry Research International* 2020. doi: 10.1155/2020/8861798.
- Nabet, Nacim, Hafid Boudries, Nadia Chougui, Sofía Loupassaki, Samiha Souagui, Francisco Burló, Francisca Hernández, Ángel A. Carbonell-Barrachina, Khodir Madani, and Romain Larbat. 2017. "Biological Activities and Secondary Compound Composition from *Crithmum Maritimum* Aerial Parts." *International Journal of Food Properties* 20(8):1843–55. doi: 10.1080/10942912.2016.1222541.
- Ben Othman, Mahmoud, Mohamed Neffati, and Hiroko Isoda. 2021. "Evaluation of the Anti-Stress Effects of Five Tunisian Aromatic and Medicinal Plants in Vitro." *Journal of Herbal Medicine* 27:100238. doi: 10.1016/J.HERMED.2018.10.003.
- Pasias, Ioannis N., Dimitris D. Ntakoulas, Kalomoira Raptopoulou, Chrysavgi Gardeli, and Charalampos Proestos. 2021. "Chemical Composition of Essential Oils of Aromatic and

- Medicinal Herbs Cultivated in Greece—Benefits and Drawbacks.” *Foods* 10(10). doi: 10.3390/foods10102354.
- Petropoulos, S. A., A. Karkanis, N. Martins, and I. C. F. R. Ferreira. 2018. “Edible Halophytes of the Mediterranean Basin: Potential Candidates for Novel Food Products.” *Trends in Food Science and Technology* 74:69–84.
- Piatti, Diletta, Simone Angeloni, Giovanni Caprioli, Filippo Maggi, Massimo Ricciutelli, Lolita Arnoldi, and Gianni Sagratini. 2022. “Sea Fennel (*Crithmum Maritimum* L.): A Promising Biosaline Crop. Extraction, Purification and Chemical Characterization of Polar Extracts.” P. 61 in. MDPI AG.
- Piatti, Diletta, Simone Angeloni, Filippo Maggi, Giovanni Caprioli, Massimo Ricciutelli, Lolita Arnoldi, Stefania Bosisio, Giacomo Mombelli, Ettore Drenaggi, and Gianni Sagratini. 2023. “Comprehensive Characterization of Phytochemicals in Edible Sea Fennel (*Crithmum Maritimum* L., Apiaceae) Grown in Central Italy.” *Journal of Food Composition and Analysis* 115. doi: 10.1016/j.jfca.2022.104884.
- Politeo, Olivera, Marijana Popović, Maja Veršić Bratinčević, Kristina Kovačević, Branimir Urlić, and Ivana Generalić Mekinić. 2023. “Chemical Profiling of Sea Fennel (*Crithmum Maritimum* L., Apiaceae) Essential Oils and Their Isolation Residual Waste-Waters.” *Plants* 12(1). doi: 10.3390/plants12010214.
- Reboul, Emmanuelle. 2019. “Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do We Stand?” *Nutrients* 11(4). doi: 10.3390/nu11040838.
- Renna, Massimiliano. 2018. “Reviewing the Prospects of Sea Fennel (*Crithmum Maritimum* L.) as Emerging Vegetable Crop.” *Plants* 7(4).
- Rondanelli, Mariangela, Milena Anna Faliva, Gabriella Peroni, Francesca Moncaglieri, Vittoria Infantino, Maurizio Naso, and Simone Perna. 2015. “Focus on Pivotal Role of Dietary Intake (Diet and Supplement) and Blood Levels of Tocopherols and Tocotrienols in Obtaining Successful Aging.” *International Journal of Molecular Sciences* 16(10):23227–49.
- Sánchez-faure, Alicia, Marta María CALVO, Jara Pérez-jiménez, Belén Martín-diana, Daniel Rico, María Pilar MONTERO, María del Carmen, María Elvira LÓPEZ-CABALLERO, Oscar Martínez-, and Novais St. n.d. *EXPLORING THE POTENTIAL OF COMMON ICEPLANT, SEASIDE ARROWGRASS AND SEA FENNEL AS EDIBLE HALOPHYTIC PLANTS 2 Spain*. Vol. 119.
- Shahidi, Fereidoon, and Adriano Costa De Camargo. 2016. “Tocopherols and Tocotrienols in Common and Emerging Dietary Sources: Occurrence, Applications, and Health Benefits.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(10).

- Souid, Aymen, Clara Maria Della Croce, Stefania Frassinetti, Morena Gabriele, Luisa Pozzo, Marco Ciardi, Chedly Abdelly, Karim Ben Hamed, Christian Magné, and Vincenzo Longo. 2021. "Nutraceutical Potential of Leaf Hydro-Ethanollic Extract of the Edible Halophyte *Crithmum Maritimum* L." *Molecules* 26(17). doi: 10.3390/molecules26175380.
- Souid, Aymen, Clara Maria Della Croce, Luisa Pozzo, Marco Ciardi, Lucia Giorgetti, Pier Giovanni Gervasi, Chedly Abdelly, Christian Magné, Karim Ben Hamed, and Vincenzo Longo. 2020. "Antioxidant Properties and Hepatoprotective Effect of the Edible Halophyte *Crithmum Maritimum* L. against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Rats." *European Food Research and Technology* 246(7):1393–1403. doi: 10.1007/s00217-020-03498-9.
- Sousa, Gabriela, Mariana I. Alves, Marta Neves, Carla Tecelão, and Suzana Ferreira-dias. 2022. "Enrichment of Sunflower Oil with Ultrasound-Assisted Extracted Bioactive Compounds from *Crithmum Maritimum* L." *Foods* 11(3). doi: 10.3390/foods11030439.
- Veršić Bratinčević, Maja, Rea Kovačić, Marijana Popović, Sanja Radman, and Ivana Generalić Mekinić. 2023. "Comparison of Conventional and Green Extraction Techniques for the Isolation of Phenolic Antioxidants from Sea Fennel." *Processes* 11(7). doi: 10.3390/pr11072172.