



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare ed Applicata

**Tepali di *Crocus Sativus* L.: un nuovo ingrediente per
bevande funzionali?**

***Crocus Sativus* L. Tepals: a new ingredient for functional
beverages?**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Tiziana Bacchetti

Tesi di Laurea Magistrale di:

Valeria Graziano

Correlatore:

Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Damiani

Sessione di Luglio 2021

A.A. 2020/2021

Scopo	5
Introduzione	8
1 Economia Circolare	8
2 Crocus Sativus: un fiore dalle numerose proprietà	12
2.1 Storia, Origine e Diffusione	12
2.2 Caratteristiche Botaniche	17
2.2.1 <i>Bulbo</i>	21
2.2.2 <i>Foglie</i>	22
2.2.3 <i>Fiore</i>	23
2.2.4 <i>Ciclo biologico</i>	25
2.3 Tecniche Di Coltura	28
2.3.1 <i>Esigenze ambientali</i>	28
2.3.2 <i>Coltivazione annuale</i>	30
2.3.3 <i>Coltivazione pluriennale</i>	31
2.4 Composizione Biochimica	33
2.4.1 <i>Polifenoli</i>	36
2.4.2 <i>Carotenoidi e Apocarotenoidi</i>	48
2.5 Proprietà Terapeutiche	53
2.5.1 <i>Attività antiossidante</i>	53
2.5.2 <i>Attività antidepressiva</i>	58
2.5.3 <i>Attività antinfiammatoria e antinocicettiva</i>	60
2.5.4 <i>Attività cardioprotettiva</i>	62
2.5.5 <i>Attività epatoprotettiva</i>	64
2.5.6 <i>Attività antimicrobica</i>	67
2.6 Infusi e loro potenziali ruoli funzionali	70

3	Materiali e Metodi	74
3.1	Preparazione degli infusi	74
3.2	Analisi fitochimiche	76
3.2.1	<i>Determinazione dei polifenoli totali degli infusi</i>	76
3.2.2	<i>Determinazione dei flavonoidi totali</i>	77
3.3	Capacità antiossidante <i>in vitro</i> degli infusi	78
3.3.1	<i>ORAC assay</i>	78
3.3.2	<i>DPPH scavenging assay</i>	80
3.3.3	<i>FRAP assay</i>	82
3.4	Analisi metabolomica mediante UHPLC-ESI-QTOF-MS	84
3.5	Analisi sensoriale	86
3.6	Analisi statistica	87
4	Risultati	89
4.1	Livelli di polifenoli e flavonoidi totali di infusi di Stami e Tepali di Crocus Sativus	89
4.2	Proprietà antiossidanti degli infusi ottenuti da Stami e Tepali di Crocus sativus	91
4.3	Analisi metabolomica dei composti bioattivi degli infusi ottenuti da Stami e Tepali di Crocus Sativus	94
4.4	Confronto dei livelli di polifenoli totali e proprietà antiossidanti tra gli infusi ottenuti da parti floreali di Crocus sativus e Rooibos e tè nero	104
4.5	Analisi sensoriale	105
5	Conclusioni	108
6	Riferimenti	114

Scopo

Lo zafferano, ottenuto dagli stimmi essiccati rosso-arancio del fiore di *Crocus sativus*, è la spezia più costosa al mondo poiché la sua coltivazione, raccolta e lavorazione richiedono molta manodopera [1]. Dalla sua lavorazione, si generano grandi quantità di bioresidui floreali, tra cui tepali e stami. Recenti studi hanno dimostrato che sia i tepali che gli stami di *Crocus sativus*, sono ricchi di molecole bioattive, principalmente polifenoli [2] [3] [4] [5] [6] [7]. La caratterizzazione di campioni di tepali e stami provenienti da diverse regioni d'Italia, ha riportato che gli antociani, quali cianidina, delphinidina 3-O-glucoside e malvidina 3-O-glucoside, rappresentano i principali costituenti di questi bioresidui floreali. Inoltre i tepali di zafferano sono una delle fonti più ricche di kaempferolo e dei suoi glicosidi [2] [3] [4] [5] [6] [7]. Gli estratti di tepali hanno anche dimostrato di possedere diverse proprietà biologiche [8] tra cui, attività antiossidante [9] [4] [10] [11] [12] [13], proprietà antidiabetiche [3], effetti epatoprotettivi [14] e attività antidepressiva [15]. Gli stami e il perianzio hanno anche mostrato importanti attività antimicotiche, citotossiche ed antiossidanti [13]. Le infusioni di erbe sono state utilizzate da tempo come veicoli terapeutici e potrebbero fornire il mezzo ideale per il rilascio di sostanze fitochimiche idrosolubili [16]. La tisana è definita come un'infusione acquosa

in acqua calda o fredda per un periodo di tempo indefinito, per estrarre i costituenti fitochimici presenti nei materiali vegetali. Il consumo di infusi di erbe è molto diffuso nella regione mediterranea e nel mondo ed il tè, ottenuto dalle foglie della pianta *Camellia sinensis*, rappresenta la bevanda più popolare. Tuttavia si possono ottenere tisane anche da altre parti di piante appartenenti a specie diverse come radici (es. zenzero, liquirizia), foglie (ortica -*Urtica dioica* L.; menta verde) fiori (lavanda, camomilla, ibisco) e semi (fieno greco *Trigonella foenum-graecum* L.). Recenti studi hanno dimostrato che le tisane rappresentano un'ottima fonte alimentare di composti bioattivi o fitochimici come fenoli e flavonoidi. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno analizzato un'ampia gamma di tisane che hanno dimostrato proprietà antiossidanti e potenziali benefici clinici in condizioni croniche tra cui diabete, ipertensione, obesità [17] [16] e cancro [18]. Tuttavia, la composizione di questi infusi varia a seconda della specie vegetale ed è influenzata dai diversi parametri di estrazione (tempo, temperatura) [19] [20] [21]. Studi recenti hanno dimostrato che le condizioni di preparazione degli infusi di *Camellia sinensis* (tè comune) e *Aspalathus linearis* (tè Rooibos) ne influenzano il contenuto di polifenoli e la capacità antiossidante e che gli infusi a freddo mostrano un contenuto di polifenoli e capacità antiossidanti simili o superiori rispetto alla bevanda calda preparata tradizionalmente [20] [21]. A questo proposito, lo scopo del presente studio è

stato quello di indagare il profilo fenolico di tisane a base di tepali e stami di fiori di *Crocus sativus* ottenuti utilizzando quattro diversi metodi di estrazione. La valutazione completa dei vari costituenti fenolici è stata eseguita anche utilizzando un approccio metabolomico non mirato per annotare i composti fenolici rilasciati dai tepali e dagli stami durante i diversi metodi di estrazione. Sono state inoltre analizzate le correlazioni tra la loro composizione fitochimica e la loro capacità antiossidante *in vitro*. Infine, è stata condotta un'analisi sensoriale per una valutazione di preferenza per sapore, gusto, colore e accettabilità complessiva delle infusioni di tepali. I risultati ottenuti forniscono un duplice interesse: per i coltivatori di zafferano, tepali e stami potrebbero avere un valore commerciale per l'industria delle tisane e portare alla valorizzazione di questi sottoprodotti, mentre per i consumatori le tisane preparate con queste diverse parti dei fiori potrebbe rappresentare bevande innovative con potenziali effetti benefici per la salute.

Introduzione

1 Economia Circolare

Il settore delle piante officinali è in forte crescita in termini di consumi, innovazioni tecniche e investimenti, per la particolare attenzione per quei prodotti caratterizzati da peculiari sapori, aromi e valore alimentare funzionale [22]. Le fasi di raccolta e lavorazione di queste piante, generano un enorme quantità di biomassa, fonte ricchissima di composti e molecole bioattive ad alto valore aggiunto che può essere utilmente recuperata come sottoprodotto in nuovi cicli produttivi [22]. Il recupero di biomassa può essere considerato come un efficiente esempio di economia circolare, un'alternativa alla convenzionale "economia lineare", in cui i rifiuti vengono scartati [23].

L'idea di base dell'economia circolare è quella di imitare la circolarità dei processi biologici (*Fig. 1*), per fare in modo che le materie prime utilizzate nei processi di produzione vengano riciclate al termine della loro vita e valorizzate attraverso la reintroduzione nell'ambiente o nel contesto di un nuovo processo produttivo come materie prime secondarie [24]. Ciò può essere vantaggioso dal punto di vista sociale, ambientale (riduzione delle emissioni) ed economico (riduzione delle perdite).

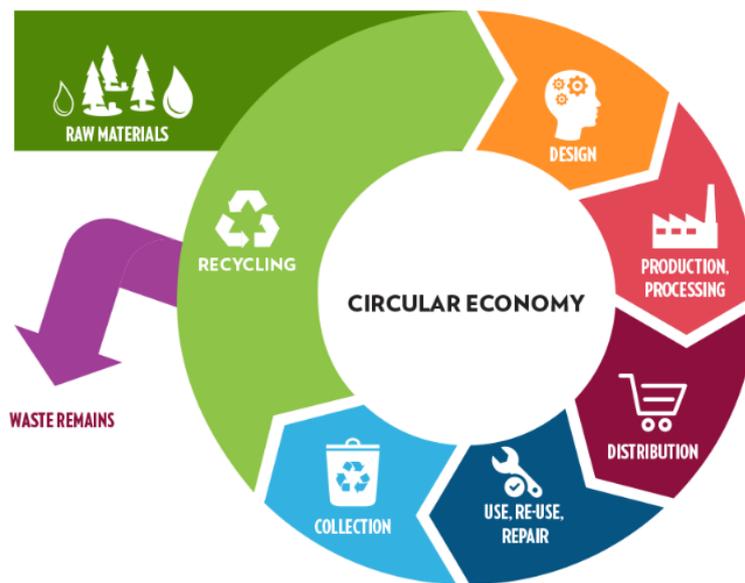


Figura 1: Immagine rappresentativa dell'economia circolare come modello di sviluppo a circuito chiuso [25].

Vengono riportati alcuni dei tanti esempi di economia circolare:

Gli scarti di frantoio, la sansa di oliva (polpa esausta, nocciolo e semi) e l'acqua di vegetazione sono i principali sottoprodotti della produzione dell'olio d'oliva, che hanno un elevato impatto ambientale se non adeguatamente trattati [26]. Questi rifiuti sono ricchi di composti bioattivi, che possono essere utilizzati come ingredienti per diverse applicazioni, ad esempio come integratori alimentari, nutraceutici, cosmeceutici e mangimi per animali [26].

Nella produzione del vino, si ottiene una enorme quantità di vinacce. Questo sottoprodotto, costituito dalle bucce e semi d'uva, è una fonte ricca di composti fenolici (principalmente flavonoidi, acidi fenolici, stilbeni e antociani), fibre alimentari, proteine, lipidi e minerali [27]. Molti di questi mostrano potenziali di applicazione come ingredienti in campo alimentare, nutraceutico, farmaceutico e cosmetico, altri possono essere sfruttati come coloranti, agenti antiossidanti o antimicrobici [28]. D'altra parte, diverse cantine stanno applicando questi sottoprodotti nella produzione di farine e pasta (sostituzione della farina di frumento con la farina d'uva), con attività biologiche annesse [27].

Anche il consumo di caffè genera enormi quantità di fondi di caffè esauriti (SCG), una risorsa ricca di acidi grassi, amminoacidi, polifenoli, minerali e polisaccaridi che può essere utilizzata per la produzione di metano, additivi alimentari, prodotti farmaceutici e cosmetici ma anche nella produzione di materiali di imballaggio e plastiche biodegradabili [29].

Nel processo di produzione dello zafferano (*Crocus sativus* L.) soltanto gli stimmi vengono recuperati mentre il resto del fiore, rappresentato da tepali, stami e stili, viene scartato. I tepali sono le parti che contribuiscono maggiormente alla massa del fiore (78,4%) seguito dagli stami (13,4%) dagli stimmi (7,4%) e dagli stili (0,7%) [8]. Per la produzione di un 1 kg di spezia

occorrono quasi 150.000 fiori [30], pertanto, una volta separati gli stimmi, si ottiene una grande quantità di bioresidui floreali, che rappresenta il 92,6% della massa dei fiori di *Crocus sativus* [8]. Questo rende la coltura dello zafferano meno redditizia in termini di biomassa e dunque sta crescendo l'interesse nel cercare di minimizzare le perdite e garantire una migliore gestione della coltura, al fine di utilizzare in modo proficuo queste parti della pianta grazie alle loro proprietà organolettiche e attività biologiche [9]. L'alto contenuto di composti bioattivi li rende una preziosa fonte di recupero per formulazioni cosmetiche, farmaceutiche e per lo sviluppo di nuovi alimenti funzionali e bevande infusionali (tè e tisane).

2 Crocus Sativus: un fiore dalle numerose proprietà

2.1 Storia, Origine e Diffusione

Il *Crocus sativus* comunemente noto come zafferano, è una pianta conosciuta sin dall'antichità. Il nome scientifico deriva dal greco 'kroke' che significa filo di tessuto in riferimento agli stimmi del fiore e dal latino *sativus* che significa coltivato [31]. Il termine zafferano, deriva dal latino 'Saffranum' che a sua volta deriva dall'arabo 'Za'feràn' che significa 'giallo' [32] come il colore della spezia che si ricava dagli stimmi essiccati.

Nel corso dei secoli lo zafferano è stato impiegato in vari modi: profumare, tingere tessuti, dipingere, curare, cucinare ed insaporire vivande. Il fiore dello zafferano, viene spesso menzionato nelle opere di Omero, Virgilio e Ovidio. Ad esempio Omero nei libri XI e XII dell'Iliade narra di come Isocrate profumasse i suoi guanciali prima di coricarsi e di come le donne troiane lo utilizzassero per profumare i pavimenti nei templi. Virgilio cita lo zafferano nell'Eneide ma soprattutto nelle Georgiche, infatti, nel IV libro di quest'opera, egli descrive il lavoro delle giovani api che si nutrono del croco rossastro [33]. Scano narra che i Sidoni e gli Stiri lo utilizzavano per colorare i veli delle spose e i sacerdoti, durante i riti propiziatori e le cerimonie religiose, erano soliti avvolgersi il capo con i fiori dello zafferano.

Nell'antica Roma lo zafferano era utilizzato nella cosmesi, nella pittura, per la colorazione delle stoffe ed era uno degli ingredienti base per le preparazioni mediche contro la peste, la tosse e il dolore toracico [34]. Nelle Domus più ricche, i commensali sedevano su cuscini ricoperti di tepali e facevano il bagno in acque profumate allo zafferano [34]. Assiri e Babilonesi lo utilizzavano per il trattamento di dispnea, mal di testa e ciclo mestruale [34].

Il più antico documento che ne attesta l'uso terapeutico sin dall'antichità, è l'antico papiro egizio di Ebers del XV secolo aC [34], inoltre il fiore è anche citato nel Cantico dei Cantici contenuto nel Vecchio Testamento.

La prima rappresentazione risale al 1600 a.C., ritrovata su un affresco nel palazzo minoico di Cnosso nell'isola di Creta, raffigurante un piccolo primate in un campo di fiori di zafferano (*fig. 2*). Altro esempio di pittura parietale, risalente al 1700 a.C., ci è fornito dagli affreschi di Akrotiri nell'isola di Santorini raffiguranti delle fanciulle intente alla raccolta dello zafferano [35].



Figura 2: Affresco de 'il raccoglitore di croco' pittura da Cnosso nell'isola di Creta (1700 a.C.) [36]

Nella mitologia greca la nascita dello zafferano è attribuita all'amore passionale di un giovane di nome Croco per la ninfa Smilacea, amore non condiviso dalla Dea Era che per gelosia trasformò lei nell'edera spinosa (*Smilax aspera*), lui nel fiore che porta il suo nome [37]. Altre volte l'origine dello zafferano è stata attribuita al Dio Mercurio che, avendo colpito con un lancio sbagliato del suo disco l'amico Croco, per ricordare la sua memoria tinse con il suo sangue questa prodigiosa pianta.

Sebbene la provenienza dello zafferano sia incerta, sembra che sia originario dell'Asia Minore. Da questa zona primaria si sarebbe poi diffuso rapidamente in India, Cina, Medio Oriente e successivamente in tutto il bacino mediterraneo

grazie al commercio degli arabi [31]. La sua introduzione in Italia è da attribuirsi al frate domenicano Santucci di Navelli che intorno al XIV secolo trasportò alcuni bulbi di zafferano dalla Spagna alla sua terra abruzzese [38]. Da qui la produzione di zafferano ha iniziato a espandersi in altre regioni italiane come Sicilia, Sardegna, Umbria e Toscana.

La coltivazione dello zafferano differisce da una zona all'altra a seconda delle condizioni climatiche, delle condizioni fisiche e chimiche del terreno e delle tecniche di coltura. Oltre alla sua importanza economica, dovuta al suo elevato prezzo, lo zafferano ha anche un certo impatto nel campo agronomico, ambientale e sociale [31]. Questa coltivazione infatti, richiede una grande mole di lavoro durante il periodo di raccolta e di mondatura in quanto effettuata manualmente. È ampiamente coltivato in Iran, India, Afghanistan, Grecia, Marocco, Spagna e Italia (*fig. 3*). La produzione totale mondiale di zafferano è stimata intorno alle 300 tonnellate l'anno [32]. L'Iran è oggi considerato il più grande produttore di zafferano del mondo, con il 90% della produzione mondiale. In Italia la produzione annua è strettamente legata all'andamento climatico e si può stimare una produttività compresa tra i 450 kg e i 600 kg, occupando una superficie di circa 50-55 ettari [39].

Le regioni maggiormente interessate sono Sardegna, Abruzzo e Sicilia, ma piccole coltivazioni si possono ritrovare anche in Umbria, Toscana e altre regioni del Sud Italia.

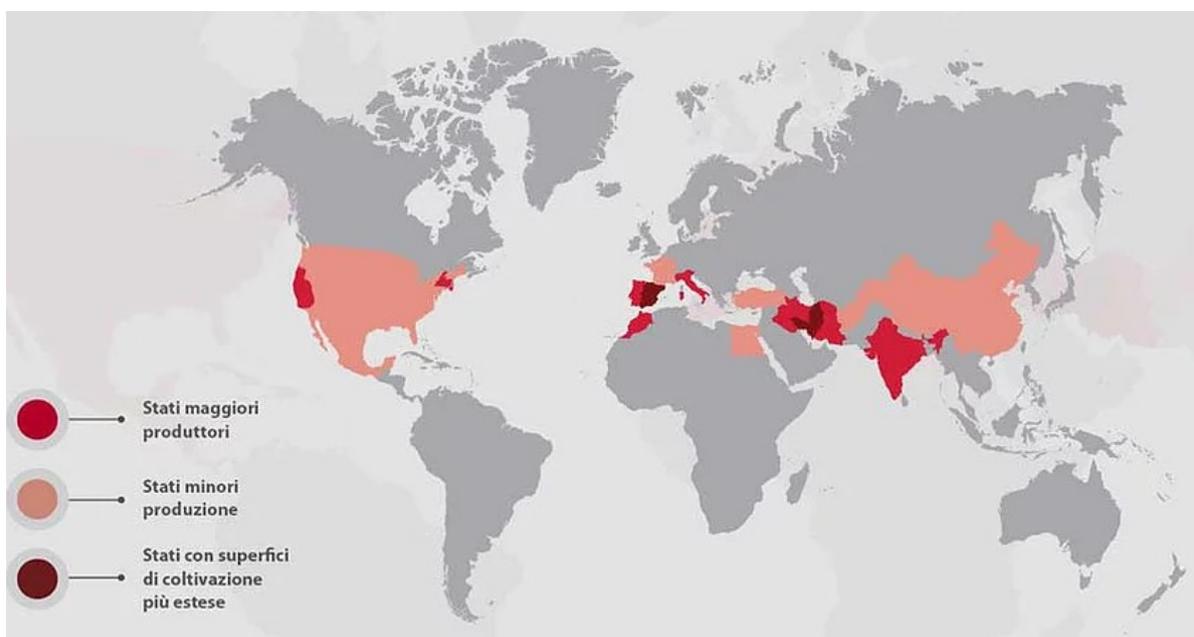


Figura 3: mappa delle principali nazioni produttori di zafferano [40]

2.2 Caratteristiche Botaniche

Il *Crocus sativus* è una pianta erbacea geofita appartenente alla famiglia delle Iridaceae e al genere *Crocus* [41]. Il genere *Crocus* comprende circa 80 specie distribuite tra l'Europa mediterranea e l'Asia occidentale [41] di cui ben 14 presenti nella flora italiana, tra cui la più importante è il *Crocus sativus* Linn. (*Fig. 4 A*).

Le specie *Crocus* più affini allo zafferano sono [33]:

- *Crocus cartwrightianus* (o *C. graetus* Chapp.) (*Fig. 4 B*), diffuso nella Grecia meridionale ed insulare;
- *Crocus pallasii*, diffuso nell'Europa sud orientale;
- *Crocus thomasi* (zafferano di Thomas) (*Fig. 4 C*), diffuso nell'Europa sud orientale e in Italia;
- *Crocus hadriaticus* (*Fig. 4 D*), diffuso in Grecia e nelle Cicladi.

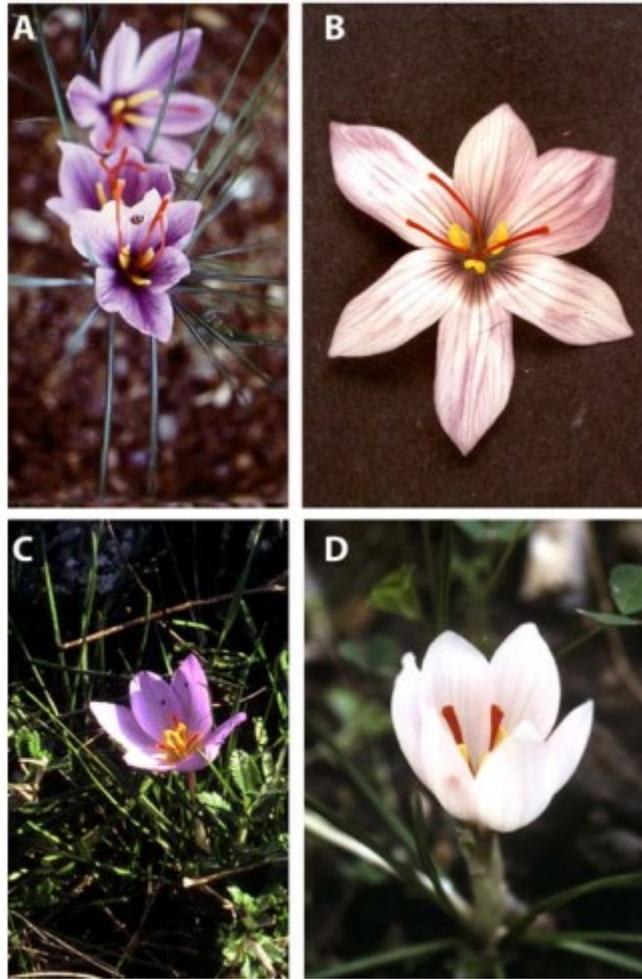


Figura 4: Fiori di Crocus a confronto: (A) *Crocus sativus*; (B) *Crocus cartwrightianus* (C) *Crocus thomasii* (D) *C. hadriaticus* [37].

Altre specie simili sono: il *Crocus albiflorus* Kit. (zafferano alpino) e il *Crocus vernus* Auct. (zafferano maggiore o selvatico) e *Crocus imperati* Ten. (zafferano d'imperato) caratterizzate da una fioritura primaverile, il *Crocus longiflorus* Rafin. (zafferano autunnale) caratterizzato da una fioritura autunnale e infine il *Crocus suaveolens* Bertol. (zafferano profumato) [41].

Il *Crocus sativus* L., è anche detto zafferano domestico, in quanto la sua produzione e diffusione dipende unicamente dall'uomo a causa della sua incapacità di produrre semi. Si suppone derivi dalla differenziazione del *C. cartwrightianus*, specie originaria dell'isola di Creta, in seguito ad una intensa selezione artificiale da parte di agricoltori che volevano ottenere una pianta caratterizzata da stimmi più lunghi e dimensioni maggiori [42]. Ne risultò dunque una pianta sterile, capace di riprodursi solamente per via agamica attraverso la moltiplicazione dei bulbi. Altre due teorie sono state formulate per spiegare la sua origine:

1. **Incrocio.** In seguito all'incrocio di due piante fertili ($2n=16$ cromosomi) si sarebbe formato uno zigote triploide. L'ibridazione potrebbe essere avvenuta tra *C. cartwrightianus* e il *C. pallasii* oppure tra *C. pallasii* e il *C. thomasi* [33].
2. **Autopoliploidia.** Come ipotizza Chichiricco, lo zafferano potrebbe derivare dalla specie *C. cartwrightianus* o dalla specie *C. thomasi*, ambedue a $2n = 16$ cromosomi, in seguito ad una normale fecondazione di un uovo non ridotto [33].

Come già accennato il *Crocus sativus* si propaga vegetativamente per mezzo di un bulbo [41]. Il bulbo esternamente è rivestito da tuniche fibrose brune, mentre internamente è carnoso e biancastro. L'ovario all'interno del bulbo possiede

gemme principali dal quale si origineranno fiori e foglie. Le foglie sono lunghe e sottili. Nel fiore i petali e i sepali non sono differenziati e vengono chiamati tepali [8]. Ogni fiore è composto da un perianzio di sei tepali di colore violaceo, tre antere ed uno stilo filiforme che termina con uno stigma di colore rosso suddiviso in tre filamenti [43] (*fig. 5*). Questi ultimi una volta essiccati generano la spezia, motivo per cui il *Crocus sativus* viene coltivato.

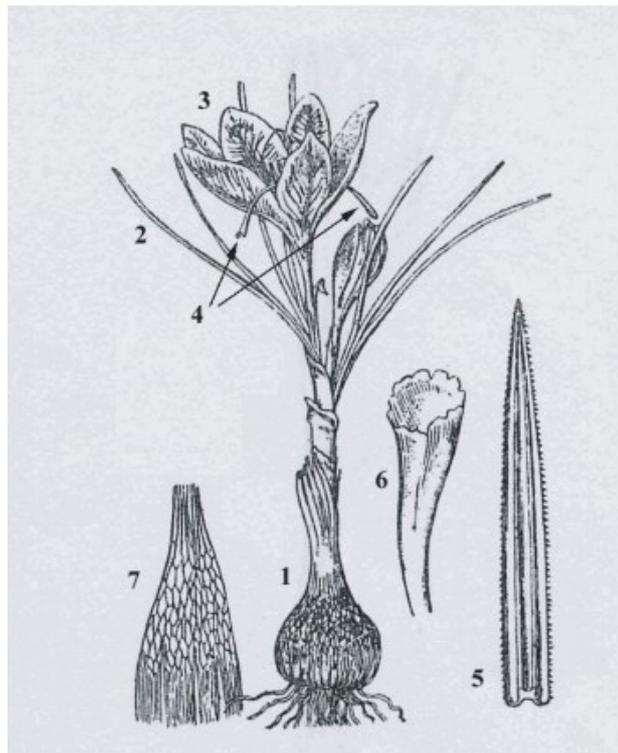


Figura 5: Principali caratteristiche morfologiche del *Crocus sativus* L. **1.** Cormo; **2.** Foglie; **3.** Tepali; **4.** Stimmi; **5.** Primo piano della foglia; **6.** Primo piano della parte terminale degli stimmi; **7.** Tunica reticolata del corno [44].

2.2.1 *Bulbo*

Il bulbo detto anche corno ha una forma sub-ovoidale compressa alla base ed è rivestito da uno strato fibroso che prende il nome di tunica. La tunica svolge una funzione protettiva delle parti più interne del bulbo e si unisce alla sommità di esso formando un caratteristico ciuffo (*fig. 6*). È un organo sotterraneo capace di accumulare, durante la stasi vegetativa, sostanze di riserva che saranno necessarie per la crescita e la fioritura successiva [45]. Ha un diametro di 3- 4 cm e un'altezza di 1-2 cm; i bulbi di dimensioni inferiori sono definiti 'bulbilli' e contribuiscono esclusivamente alla riproduzione vegetativa. L'ovario, contenuto nel bulbo, può contenere 20 gemme indifferenziate, di cui solo tre (gemme principali) daranno origine ai fiori e alle foglie mentre le altre più piccole produrranno bulbi secondari che potranno essere utilizzati nella stagione susseguente.

Nella parte basale del bulbo, si sviluppano 2 tipi di radici che differiscono per funzione e struttura [1]: radici fibrose (o assorbenti) e radici contrattili. Le radici fibrose sono diritte, sottili (circa 1 mm di spessore), lunghe 15-20 cm e assorbono acqua e sostanze nutritive [34]. Le radici contrattili al contrario, sono molto grandi e spesse. Si sviluppano in risposta alle fluttuazioni della temperatura del suolo e dei livelli di luce e la loro funzione è quella di spingere

il bulbo alla profondità più appropriata alle esigenze fisiologiche della pianta [33].



Figura 6: Nella foto viene mostrato un bulbo di *Crocus sativus*. Si può notare la parte interna biancastra dal quale dipartono le radici, nella parte basale, e lo stilo, nella parte apicale. È rivestito da tuniche di colore marrone che si uniscono alla sommità del bulbo.

2.2.2 Foglie

Le foglie di *Crocus sativus* sono filamentose, lunghe e strette. Hanno un diametro di 1,5 – 2,5 mm [45] e possono raggiungere i 60 cm di lunghezza. Sono di un colore verde scuro e presentano una nervatura longitudinale al centro biancastra (*fig. 7*). Il numero di foglie prodotte da un bulbo-tubero,

dipende dalla dimensione di quest'ultimo e dalla vitalità delle sue gemme. Generalmente il numero varia da 6 a 9 ma quando il bulbo-tubero ha un diametro di 1,0 - 1,5 cm non supera le 2 – 3 foglie [33]. Le foglie sono in uno stato verticale (ortotopico) durante l'emergenza e in posizione orizzontale (plagiotopico) durante la fase di sviluppo [34]. L'attività di fotosintesi fogliare è particolarmente necessaria per la moltiplicazione dei bulbi figli. Crescono dal momento in cui si apre il getto fino alla moltiplicazione dei bulbi, in seguito si seccano segnalando l'inizio della fase di senescenza della pianta [34].

2.2.3 Fiore

Il fiore è molto vistoso poiché dotato di un perigonio formato da sei tepali di colore violaceo intenso (*fig. 7*) uniti ad un lungo tubulo che emerge dall'estremità superiore dell'ovario chiamato tubulo perigoniale. La fioritura ha inizio in autunno, solitamente prima della comparsa delle foglie (isteranzia), in un numero variabile da uno a cinque per pianta [33]. Il fiore è ermafrodita in quanto possiede entrambi gli organi riproduttivi. L'organo riproduttivo femminile è rappresentato dal gineceo formato da ovario, stilo e stimma [1]. L'ovario è racchiuso nel bulbo e da esso si origina lo stilo il quale attraversa il tubulo perigoniale e termina con un unico stimma suddiviso in tre filamenti di colore rosso intenso dal quale si ricava la spezia. In antesi gli stimmi sono eretti,

più lunghi delle antere, e spesso anche dei tepali e si piegano verso il basso non appena il fiore si apre. L'organo riproduttivo maschile è rappresentato dall'androceo formato da tre stami [1]. Gli stami sono di colore giallo, lunghi fino a 15 cm e sorretti da propri filamenti che originano dal perigonio [1]. Sono provvisti di antere costituite da una parete di quattro tessuti monostratificati che racchiudono due teche contenenti ciascuna due sacche polliniche da cui si produce il polline [46].



Figura 7: Nella foto viene mostrato un primo piano del fiore di *Crocus sativus*. Si possono osservare gli stami gialli, gli stimmi di un rosso intenso, i sei tepali violacei con tipiche striature più scure e le foglie verdi filamentose con nervatura centrale biancastra [47]

2.2.4 Ciclo biologico

Il *Crocus sativus* L., al contrario di altre piante, fiorisce in autunno rallentando la sua attività durante la stagione primaverile.

Il suo ciclo biologico si suddivide in due fasi: una fase attiva, che si estende da settembre a maggio, ed una fase passiva o di riposo, che va da giugno ad agosto (*fig.8*). Nella fase attiva, vi è una prima fase di attecchimento: Il bulbo riprende la sua attività metabolica [35] grazie alle sostanze nutritive che ha accumulato nella stagione precedente, e inizia a germogliare. Dalle gemme principali si sviluppano i getti o spate che emergono dal terreno avvolti da una guaina bianca protettiva, che permette alla pianta di perforare la superficie del terreno. Dalle guaine protettive iniziano ad emergere le foglie e poco dopo, a partire da ottobre, ha inizio la fioritura ma possono verificarsi casi in cui i fiori si sviluppano prima o contemporaneamente alle foglie.

La fioritura si protrae fino alla metà di novembre, periodo che coincide con la raccolta, con una durata media di circa 15-25 giorni (i cosiddetti ‘giorni del manto’) in funzione dell’andamento climatico [35]. La raccolta dei fiori richiede particolare attenzione e un intenso lavoro manuale. Data l'elevata sensibilità della coltura viene eseguita la mattina presto, prima del sorgere del sole quando i fiori sono ancora chiusi [48]. Dopo la fioritura, tra dicembre e

febbraio, subentra una fase vegetativa in cui si avrà un'intensa attività di crescita della pianta con produzione di foglie e radici, che permetteranno l'accumulo di sostanze nutritive necessarie per lo sviluppo di nuovi bulbi.

All'inizio della primavera, tra i mesi di marzo ed aprile, avvengono nella pianta importanti processi generativi che portano alla trasformazione dei meristemi apicali in gemme radicali o gemme a fiore [49]. In questa fase la pianta necessita di un elevato fabbisogno energetico e idrico, in quanto l'acqua, favorisce la crescita dei bulbi neoformati.

Nei mesi successivi, tra maggio e giugno, l'attività della pianta si riduce portando al disseccamento completo dell'apparato fogliare e alla quiescenza dei bulbi. Con la fase di riposo, la pianta riesce a superare la siccità e le alte temperature della stagione estiva [35].

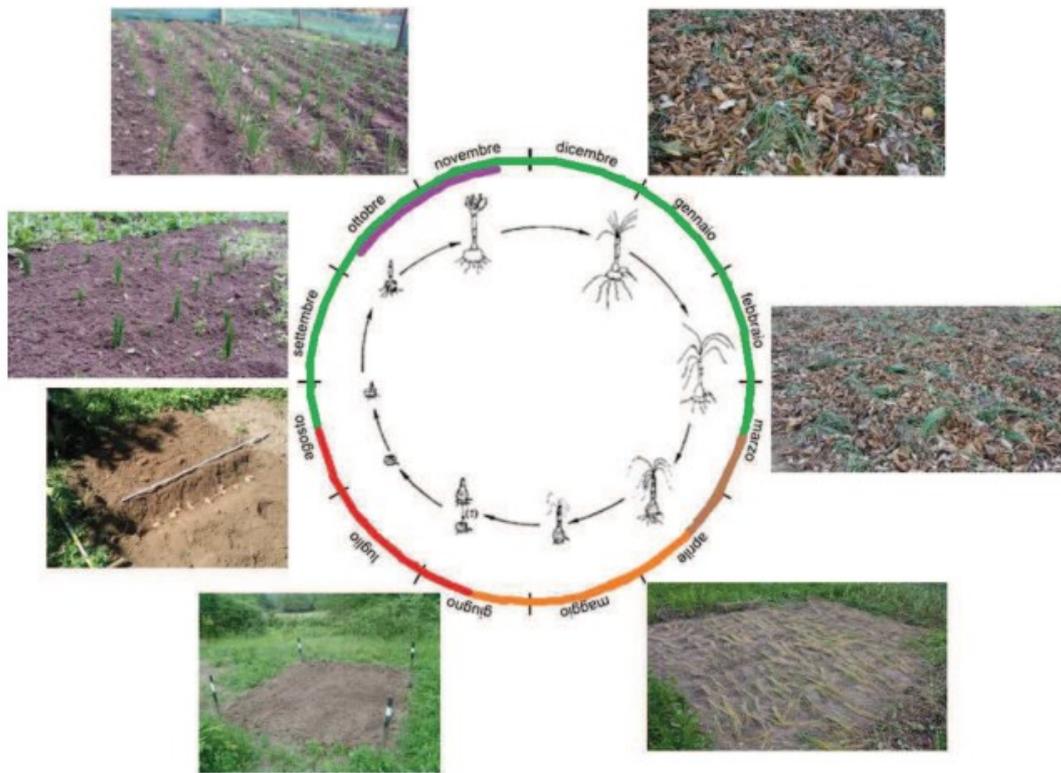


Figura 8: L'immagine mostra le varie fasi del ciclo biologico del *Crocus sativus* L. [49]

Nel caso di coltivazione a ciclo annuale si procede alla raccolta dei bulbi mentre nel caso si attui la coltivazione poliennale essi rimarranno in campo fino ai primi giorni di settembre, quando riprenderanno la loro attività [49].

2.3 Tecniche Di Coltura

2.3.1 *Esigenze ambientali*

La coltivazione del *Crocus sativus* è diffusa in diverse parti del mondo e in condizioni ambientali molto diverse. Si adatta sia ad un clima continentale-temperato che ad un clima continentale-mediterraneo caratterizzato da inverni freddi ed estati caldi e secche [42] con piovosità media annua non elevata (400-600 mm). La temperatura è il parametro ambientale più importante, in quanto regola la fioritura e la crescita [31]. Grazie alla stasi vegetativa, riesce a tollerare temperature fino a 35-40°C in estate [38], mentre in inverno la temperatura non deve scendere al di sotto dei -20 °C. in quanto temperature invernali troppo rigide, potrebbero compromettere la fioritura con conseguente diminuzione del numero di fiori e dimensioni degli stimmi.

I bulbi possono crescere in differenti tipologie di terreno (*Tab. 1*), ma generalmente prediligono quelli con valori di pH da neutri a leggermente alcalini [31]. Si adattano bene al suolo argilloso-calcareo ma anche su suoli ferruginosi, sedimentosi e sabbiosi ben drenati e arricchiti con materiale organico [36]. Può crescere anche su terreni salini, ma la carenza di carbonato di calcio in questi terreni può essere un fattore limitante [31].

LOCALITA'	SUOLO
Abruzzo	Suoli argillosi, ben strutturati e permeabili aventi un pH subalcalino. Sono ricchi di sostanza organica, N e P.
Sardegna	Suoli argillosi, ben strutturati e permeabili aventi un pH subalcalino. Sono ricchi di sostanza organica, N e P.
Spagna	Suoli argillosi con un pH subalcalino
Grecia	Suoli argillosi, profondi, ben drenati e ben strutturati. pH compreso tra 7.4-7.6. Contenuto medio di sostanza organica ma ricco di P.
India	Suoli argillosi, profondi, ben drenati e ben strutturati. pH compreso tra 7.4-7.6. Contenuto medio di sostanza organica ma ricco di P.

Tabella 1: La tabella mostra le caratteristiche dei terreni dei principali paesi produttori dello zafferano [33].

È consigliato l'impianto dei bulbi in un terreno vergine, non coltivato per almeno 4 anni, al fine di evitare infezioni fungine e batteriche. Inoltre è preferibile eseguire la coltivazione su terreni leggermente scoscesi piuttosto che pianeggianti per evitare il fenomeno del ristagno idrico [50], che può causare marciume radicale compromettendone lo sviluppo.

La coltivazione dello zafferano può essere di due tipi: coltivazione a ciclo annuale e coltivazione a ciclo pluriennale.

2.3.2 *Coltivazione annuale*

La coltivazione dello zafferano viene eseguita principalmente a ciclo pluriennale, ma nell'altopiano di Navelli (Abruzzo) viene adottato un sistema a coltura annuale in cui i bulbi vengono estratti dal terreno al termine di ogni ciclo vegetativo per poi essere reimpiantati in un altro terreno precedentemente lavorato e concimato. Questa tecnica prevede l'adozione delle 'porche' (*fig. 9*): aiuole rialzate di terreno larghe circa 80 cm ed intervallate da un vialetto largo 30 cm [38] su cui vengono realizzati da uno a quattro solchi per la messa a dimora dei bulbi, con una profondità di 15-20 cm e distanza di 20-25 cm l'uno dall'altro. Questo sistema è utile per favorire lo sgorgo delle acque e per facilitare le operazioni di raccolta [38]. I bulbi prima di essere reimpiantati vengono selezionati per dimensione (diametro maggiore di 2,5 cm), e controllati per eventuali difetti, come marciume o infezioni fungine. Questa tecnica risulta essere più laboriosa ed impegnativa in termini di manodopera, ma permette di ottenere una migliore qualità del prodotto ed un maggior controllo sulla salute dei bulbi [50].



Figura 9: Nella foto a sinistra è rappresentata la costruzione delle porche prima dell’impianto dei bulbi [38]. Nella foto a destra è possibile osservare la piantagione di zafferano nell’altopiano di Navelli a coltivazione annuale con sistema a porche.

2.3.3 Coltivazione pluriennale

La coltivazione pluriennale è la tecnica di coltivazione più diffusa. Prevede l’espianto dei bulbi dal terreno, dopo un periodo di tempo più o meno lungo a seconda del luogo: da 3-4 anni in Spagna e in Sardegna, da 6-8 anni in India e Grecia e fino a 12 in Marocco [44]. Non prevede il sistema a porche come per la coltivazione annuale e i bulbi vengono impiantati in pieno campo (*fig. 10*). I solchi avranno una profondità di 15-20 cm con distanza di 25-30 cm l’uno dall’altro in modo da lasciare lo spazio sufficiente per lo sviluppo di nuovi bulbi nel corso degli anni.



Figura 10: Piantagione di zafferano a coltivazione pluriennale in Sardegna [51]

Questa tecnica risulta più vantaggiosa rispetto alla coltivazione annuale, sia in termini di manodopera che di costi di produzione, ma può incidere negativamente sulla qualità e quantità del prodotto; infatti dopo 4-5 anni, con l'invecchiamento del terreno, la produzione della spezia diminuisce a causa della crescente competizione per acqua e sostanze nutritive, rischio di insorgenza di infezioni fungine dovute al sovraffollamento dei bulbi e loro ridotta dimensione e capacità di produzione [44].

2.4 Composizione Biochimica

La composizione biochimica dei tepali (*Fig. 11*) consiste in:

- Acqua 87%
- Carboidrati 13%
- Lipidi 10,20%
- Proteine 8,3%
- Fibre 11,39%
- Ceneri 5,70%

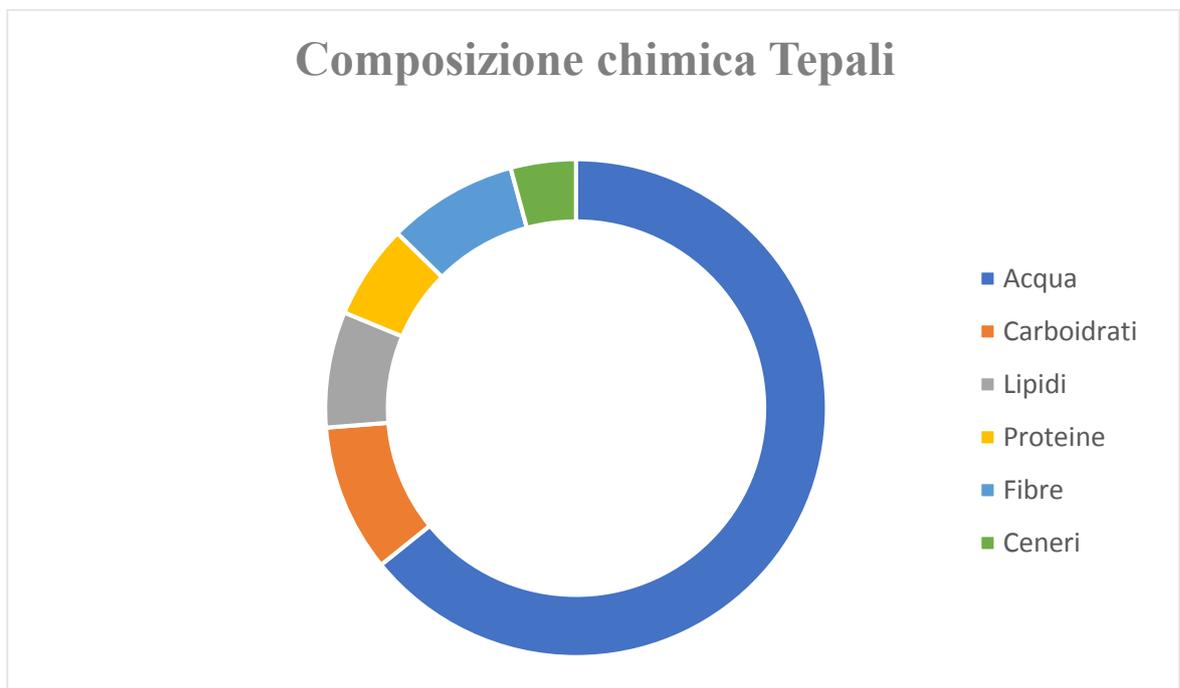


Figura 11: Diagramma ad anello che mostra la composizione fitochimica dei tepali di *Crocus sativus* le cui concentrazioni sono espresse come g/L [52].

La composizione biochimica degli stami (*Fig. 12*) consiste di:

- Acqua 70%
- Carboidrati 34 %
- Lipidi 11%
- Proteine 24,05 %
- Fibre 32,2%
- Ceneri 11,43%

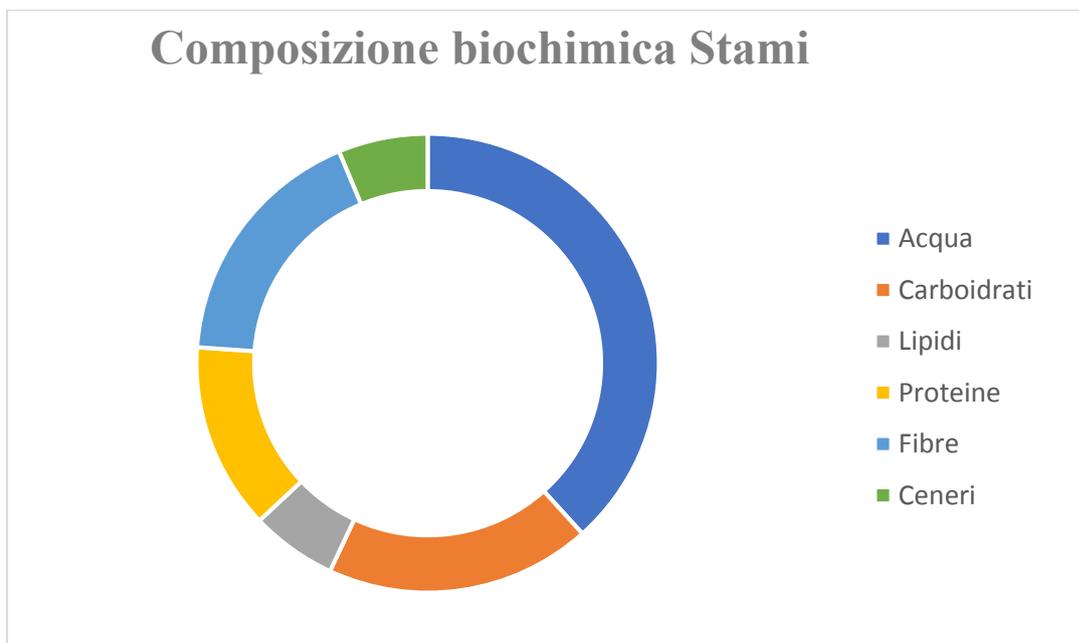


Figura 12: Diagramma ad anello che mostra la composizione biochimica degli stami di *Crocus sativus* le cui concentrazioni sono espresse in g/L [43]

Inoltre i fiori di *Crocus sativus* sono una fonte ricca di minerali essenziali fondamentali per molte funzioni fisiologiche e metaboliche. Gli stami sono

caratterizzati dal più alto contenuto di P, Mg e K. Contenuti significativamente maggiori di Ca, Fe e Na sono stati ritrovati negli stili. L'elevata quantità di calcio presente negli stili probabilmente è legata al suo ruolo nella riproduzione della pianta, in quanto il Ca influenza la germinazione del polline e la crescita del tubo pollinico [43]. Tepali e stimmi sono le parti del fiore con la composizione minerale più bassa come mostrato in *tabella 2*.

Minerali	Stami	Tepali	Stimmi	Stili
Fosforo	0.589 ± 0.022	0.232 ± 0.006	0.327 ± 00.03	0.296 ± 0.003
Magnesio	0.309 ± 0.032	0.098 ± 0.010	0.135 ± 0.013	0.178 ± 0.012
Calcio	0.216 ± 0.004	0.125 ± 0.008	0.107 ± 0.012	0.345 ± 0.016
Ferro	0.024 ± 0.001	0.028 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.035 ± 0.001
Potassio	3.796 ± 0.031	1.353 ± 0.010	1.486 ± 0.037	1.816 ± 0.078
Sodio	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.019 ± 0.001

Tabella 2: Composizione minerale delle singole parti del fiore di *Crocus sativus* le cui quantità sono espresse come DS media in g per 100 g su peso secco [43].

I principali studi su *Crocus sativus* si sono concentrati prevalentemente sulla composizione chimica degli stimmi, ovvero picrocrocina, safranale e crocine che contribuiscono ai parametri di qualità della spezia [53] nonché alle

proprietà organolettiche. Dopo la raccolta dei fiori, solo gli stimmi vengono recuperati e le restanti parti (tepali e stami) scartate oppure utilizzate come mangime o ancora per il compostaggio [54].

Tuttavia, recenti studi sulla loro composizione fitochimica, ha suscitato particolare interesse nella comunità scientifica grazie al loro potenziale utilizzo non solo in campo alimentare ma anche in campo sanitario [6]. Infatti sia i tepali che gli stami potrebbero rappresentare un importante fonte di composti fenolici con capacità antiossidanti, il che suggerisce una possibile valorizzazione di questi sottoprodotti attraverso la promozione della riciclabilità e considerare tepali e degli stami come ingredienti attivi negli integratori alimentari, negli alimenti funzionali [55], nelle preparazioni farmaceutiche, nelle formulazioni cosmetiche [8] o nella preparazione di bevande infusionali.

2.4.1 Polifenoli

I polifenoli rappresentano un vasto ed eterogeneo gruppo di sostanze fitochimiche note per la loro azione benefica sulla salute umana [56]. Dal punto di vista chimico sono caratterizzati dalla presenza di uno o più anelli aromatici a cui sono associati uno o più gruppi idrossilici. La loro funzione più importante è quella di proteggere le piante dal rischio ossidativo rappresentato dalla luce solare e da altri agenti ambientali [56]. Inoltre sono responsabili di alcune

vivaci pigmentazioni che attraggono gli insetti impollinatori permettendo così la riproduzione e la dispersione dei semi. I polifenoli, come è già noto, sono potenti antiossidanti che completano e si aggiungono alle funzioni di vitamine ed enzimi antiossidanti come difesa contro lo stress ossidativo [57] un processo dannoso causato dall'eccesso di specie reattive all'ossigeno (ROS) che può portare all'ossidazione di importanti biomolecole come proteine, lipidi, carboidrati e DNA. La ricerca degli ultimi anni sostiene fortemente il ruolo dei polifenoli nella prevenzione di alcune malattie croniche, in particolare tumori, malattie cardiovascolari e malattie neurodegenerative [58].

Dal punto di vista strutturale i polifenoli possono essere suddivisi in due grandi gruppi: flavonoidi e non flavonoidi [56] [59].

Sebbene lo scheletro strutturale dei polifenoli contenga diversi gruppi idrossidrilici sugli anelli aromatici, la struttura di base dei non flavonoidi è un singolo anello aromatico [59]. Essi comprendono diverse classi: acidi fenolici, stilbeni, lignani, cumarine e tannini.

- ❖ **Acidi fenolici:** possono essere classificati principalmente in due gruppi, acido idrossibenzoico e acido idrossicinnamico [58]. Gli acidi idrossibenzoici includono gli acidi gallico, p-idrossibenzoico, vanillico, siringico e protocatecuico, sono presenti in poche piante commestibili e non sono considerati di elevato interesse nutrizionale [60]. Al contrario

l'acido idrossicinnamico è presente in molti alimenti come mirtilli, kiwi, ciliegie, carciofi, lattuga, grano e caffè.

- ❖ **Stilbeni:** il principale componente di questa classe è rappresentato dal resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene), che è prodotto da diverse piante come uva, arachidi e bacche [59].
- ❖ **Lignani:** i più noti sono il secoisolariciresinolo e il matairesinolo che sono facilmente convertiti in enterodiolo ed enterolattone, rispettivamente, dalla microflora intestinale e sono noti per esercitare una forte attività antiossidante ed estrogenica [17]. I semi di lino sono particolarmente ricchi di lignani ma si possono ritrovare anche in altri cereali, frutta e alcuni ortaggi.
- ❖ **Cumarine:** sono lattoni di derivati dell'acido cis-O-idrossicinnamico ed esistono sia in forma libera che come glicosidi [17]. Sono contenute in diverse parti della pianta, soprattutto nelle foglie, nei frutti, nei semi e nelle radici.
- ❖ **Tannini:** gruppo di composti con ampia diversità strutturale classificati in tre gruppi: tannini condensati, tannini idrolizzabili e tannini complessi [61]. Sono responsabili del gusto amaro di alcune bevande come il tè, il caffè e il vino a cui conferiscono caratteristiche astringenti grazie alla loro capacità di precipitare le proteine [61].

I flavonodi detti anche bioflavonoidi rappresentano il gruppo più vasto dei polifenoli [62]. Sono presenti in molti alimenti consumati abitualmente come vari tipi di frutta e verdura (in particolare negli agrumi, nelle mele e nell'uva), nei semi, nelle noci, nei cereali, nelle spezie, nelle erbe aromatiche (rosmarino, timo e prezzemolo), nei legumi, ed in varie piante medicinali; inoltre diverse bevande come il vino, il thè nero ed il thè verde, contengono quantità apprezzabili di flavonoidi [63]. Nelle piante, oltre alle loro importanti funzioni legate alle strategie riproduttive e alla protezione dai raggi UV [56], i flavonoidi contribuiscono alla pigmentazione di fiori e frutti. Sono oggi considerati un componente indispensabile in una varietà di applicazioni nutraceutiche, farmaceutiche, medicinali e cosmetiche grazie alle loro proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antimutagene e anticancerogene [64]. Chimicamente sono costituiti da uno scheletro centrale composto di 15 atomi di carbonio [62] e, più precisamente, due anelli benzenici legati mediante una catena a tre atomi di carbonio costituenti un anello piranico [59] (anello eterociclico contenente ossigeno) (*Fig. 13*).

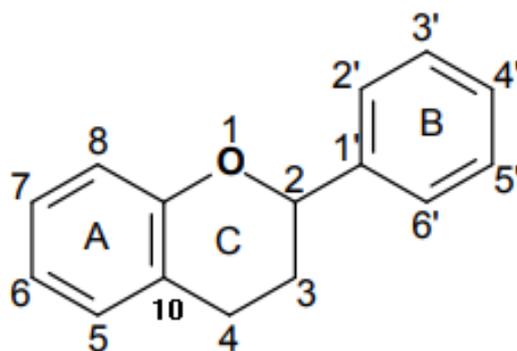


Figura 13: Struttura base dei flavonoidi. Due anelli benzilici (A e B) legati all'anello piranico eterociclico (C). L'atomo di ossigeno è numerato come prima posizione e gli atomi di carbonio rimanenti sono numerati da C2 a C10. L'anello B mostra sei posizioni da C1' a C6' [59]

I flavonoidi possono essere suddivisi in diversi sottogruppi a seconda del carbonio dell'anello C su cui è legato l'anello B e del grado di insaturazione e ossidazione dell'anello C [64]. I sottogruppi di maggior interesse sono rappresentati da: flavonoli, flavoni, flavanoli, flavanoni, antocianine e isoflavonoidi [64].

- ❖ **Flavonoli:** sono probabilmente i flavonoidi più ampiamente distribuiti negli alimenti, ma di solito sono presenti a concentrazioni relativamente basse [60] Si trovano abbondantemente in una varietà di frutta e verdura [64] ma anche in altri alimenti come cioccolato, tè e vino [62]. I flavonoli più studiati sono kaempferolo, quercetina e miricetina e isoramnetina [64].

- ❖ **Flavoni:** sono ampiamente presenti in foglie, fiori e frutti come glucosidi [64]. Appartengono a questa sottoclasse di flavonoidi la luteolina, l'apigenina e la crisina [65].
- ❖ **Flavanoli:** includono monomeri come catechina, gallocatechina, epicatechina e oligomeri [62]. I monomeri di catechina si trovano in mele, pere, cacao, tè e prodotti a base di uva sotto forma di agliconi (parte di un glicoside senza contenuto di carboidrati) [66]
- ❖ **Flavanoni:** conferiscono il sapore amaro al succo e alla buccia degli agrumi e sono presenti anche nell'uva. I principali rappresentanti di questa classe sono l'esperidina, naringenina [67] e l'erodictiolo [17].
- ❖ **Antocianine:** sono i pigmenti responsabili della colorazione di molti frutti in particolare mirtilli rossi, ribes nero, uva rossa, lamponi, fragole, mirtilli e more [64]. Il colore dell'antocianina dipende dalle variazioni di pH e dalla metilazione o acilazione dei gruppi ossidrilici sugli anelli A e B [64]. cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina e peonidina sono gli antociani più comunemente studiati [62].
- ❖ **Isoflavonoidi:** si trovano prevalentemente nei semi di soia e nelle leguminose. Strutturalmente sono simili agli estrogeni dei mammiferi quindi si suppone agiscano come agonisti del recettore degli estrogeni

[67]. I principali componenti di questa classe sono la genisteina, la daidzeina e la gliciteina [67].

È stato intrapreso uno studio fitochimico con l'obiettivo di identificare e determinare quantitativamente i principali composti fenolici presenti nei tepali e negli stami di *Crocus sativus*.

Utilizzando la tecnica di cromatografia liquida ad elevata prestazione (HPLC), sono stati isolati nei tepali diversi composti flavonoidi quali antociani, flavonoli, flavanoli e flavoni e composti non flavonoidi come gli acidi fenolici.

Le antocianine presenti nei tepali di *Crocus sativus* sono mostrati nella seguente tabella:

<i>Antocianine tepali</i>	<i>Autore</i>
Delfinidina 3,5-di-O- β -glucoside	[8]
Delfinidina 3-O- β -glucoside	[8]
Petunidina 3,5-di-O- β -glucoside	[8]
Petunidina 3-O- β -glucoside	[8]
Malvidina 3,5 -di-O- β -glucoside	[8]
Delfinidina 3,7-O-diglucoside	[53]
Petunidina 3,7-di-O- diglucoside	[53]
Petunidina	[68]

Pelargonidina	[68]
Callistefina	[68]
Malvidina 3-O- β -glucoside	[6]

Tabella 3: Tabella delle principali antocianine presenti nei tepali di *Crocus sativus*.

Le antocianine Delfinidina, Petunidina ed i glicosidi della Malvidina sono i pigmenti responsabili della colorazione cianotica (viola, lilla, malva e blu) tipica dei tepali di *Crocus sativus* e rappresentano il 30% del contenuto totale di composti fenolici del perigonio [8]. Di questi la Delfinidina 3,5-di-O- β -glucoside è quella più abbondante, seguita dalla Petunidina 3,7-di-O- β -glucoside, dalla Petunidina 3-O- β -glucoside e dalla Malvidina 3-O-glucoside [6]. Questa materia prima, grazie alla notevole quantità di antociani, potrebbe essere utilizzata come sostituto ai coloranti chimici nell'industria farmaceutica, nell'industria alimentare e nella cosmesi.

I flavonoli, i flavoni e i flavanoni identificati nei tepali di *Crocus sativus* sono mostrati nella seguente tabella:

<i>Flavonoli tepali</i>	<i>Autore</i>
Kaempferolo3-O-soforoside-7-O-glucoside	[53]
Kaempferolo 3,7-O-diglucoside	[53]

Quercetina 3,7-O-diglucoside	[53]
Isoramnetina 3,7-O-diglucoside	[53]
Kaempferolo 3-O-soforoside	[53]
Isoramnetina 3-O-soforoside	[53]
Quercetina 3-O-glucoside	[53]
Quercetina 3,4 -di-O-b-glucoside	[69]
Kaempferolo 3,4 -di-O-b-glucoside	[69]
Isoramnetina 3,4'-di-O- glucoside	[70]
Kaempferolo 3,7,4'-tri-O- glucoside	[70]
Quercetina 3-O-soforoside	[70]
Kaempferolo 7-O-glucoside	[70]
Kaempferolo 3-O soforoside-7-O- glucoside	[70]
Kaempferolo	[53]
Kaempferolo 3-O-rutinoside	[53]
Isoramnetina 3-O-rutinoside	[53]
Kaempferolo 3-O-glucoside	[53]
Kaempferolo3-O-(6-acetil-glicoside)7-O-glicoside	[53]
Kaempferolo 3-O-(6-acetil-glicoside)7-O-glicoside	[53]
Isoramnetina 3-O-glucoside	[53]
Kaempferolo 3-O-soforoside-7-O-ramnoside	[53]
Kaempferolo 3-O-(6-acetilglucoside)	[53]
Quercetina 3-O-glucoside 7-O-ramnoside	[53]
Isoramnetina 3-O-glucoside 7-O-ramnoside	[53]

Kaempferolo 3-O-glucoside 7-O-ramnoside	[53]
Ramnetina	[68]
Isoramnetina	[68]
<i>Flavanoni tepali</i>	
Diidrokaempferolo 3-O-esoside	[68]
Taxifolina 7-O-esoside	[68]
Diidrokaempferolo 3-O-esoside	[4]
Naringenina 7-O-esoside	[4]
Naringenina	[4]
Esperidina	[4]
<i>Flavoni tepali</i>	
luteolina	[68]
Apigenina 7-O-b-glucoside	[69]

Tabella 4: Tabella dei principali flavonoli, flavanoni e flavoni presenti nei tepali di *Crocus sativus*.

I flavonoidi si possono accumulare in diverse parti della pianta di *Crocus sativus* [68]; tuttavia una maggior concentrazione è stata ritrovata nei tepali. Questi composti sono rappresentati principalmente da derivati glicosilati e metossilati di Kaempferolo, Quercetina, Isoramnetina, e glicosidi come mono, di- o triglicosidi. I glicosidi di Kaempferolo risultano essere i principali

flavonoli (rappresentando l'84% del contenuto totale di flavonoli) con il Kaempferolo 3-O-soforoside come principale composto. I Kaempferoli stanno guadagnando sempre più interesse grazie alla loro attività antiossidante come integratore alimentare, negli alimenti funzionali, nelle preparazioni farmaceutiche e nelle formulazioni cosmetiche [8]. Pertanto, l'alto contenuto di flavonoidi glicosilati nei tepali di *Crocus sativus* potrebbe portare ad una maggiore valorizzazione di questo prodotto.

Gli acidi fenolici e in particolare gli acidi idrossibenzoici, sono i precursori nella biosintesi dei flavonoidi e si possono spesso ritrovare nelle specie *Crocus*. Gli acidi idrossibenzoici isolati ed identificati dai tepali di *Crocus sativus* vengono riportati nella seguente tabella:

<i>Acidi fenolici tepali</i>	<i>Autore</i>
Acido p-cumarico	[68]
Acido protocatecuico	[68]
Acido vanillico	[68]
Acido p-idrossibenzoico	[68]
Acido 3-idrossi-4-metossibenzoico	[68]

Tabella 5: Tabella dei principali acidi fenolici presenti nei tepali di *Crocus sativus*.

Anche i composti fenolici identificati negli stami sono stati rilevati mediante cromatografia liquida ad elevata prestazione (*HPLC*). I risultati hanno indicato che la componente fenolica degli stami è rappresentata dai flavonoidi principalmente flavonoli e flavanoni ma presenti in quantità inferiori rispetto ai tepali. Tra i flavonoli il principale composto è rappresentato dal Kaempferolo-3-O-soforoside seguito dalla Quercetina. Inoltre, sono stati rilevate quantità piuttosto elevate di derivati della metilquercetina [71].

I flavonoidi e flavanoni identificati negli stami vengono riportati nella seguente tabella:

<i>Flavonoli stami</i>	<i>Autore</i>
Kaempferolo-3-O-soforoside	[71]
Kaempferolo-3-soforoside-7-glucoside	[71]
Kaempferolo diglucoside	[71]
Quercetina diglucoside	[71]
Metil quercetina diglucoside	[71]
Metil quercetina glucoside	[71]
Quercetina p-cumaroil glucoside	[71]
Kaempferol p-cumaroil glucoside	[71]
Metil quercetina p-cumaroil glucoside	[71]
Kaempferolo 3,7-di-O- β -D-glucopiranoside	[68]
Tamarixetina 3-O-bihexoside	[68]

Quercetina-3,7-di-O- β -D-glucopiranoside	[68]
Ramnetina	[68]
Isoramnetina 3,7-di-O- β -D-glucopiranoside	[68]
Isoramnetina-3-O- β -D-glucopiranoside	[68]
<i>Flavanoni stami</i>	
Naringenina	[68]
Taxifolina 7-O-esoside	[68]

Tabella 6: Tabella dei principali flavonoli e flavanoni identificati negli stami di *Crocus sativus*.

2.4.2 Carotenoidi e Apocarotenoidi

I carotenoidi sono una classe di pigmenti vegetali di natura lipidica biosintetizzati da tutti gli organismi fotosintetici come piante ed alghe e da alcuni organismi non fotosintetici come alcune specie di batteri [72]. Nel processo di fotosintesi assorbono energia a lunghezze d'onda differenti rispetto alla clorofilla e proteggono quest'ultima dalla fotoossidazione [73]; inoltre sono responsabili dei colori rosso, giallo e arancio di molti fiori e frutti [74]. Carotenoidi specifici possono contribuire al fabbisogno di vitamina A, supportando la vista, la rigenerazione delle cellule epiteliali e controllando

l'espressione genica attraverso l'acido retinoico, un metabolita della vitamina A [75].

Studi epidemiologici hanno suggerito altri ruoli dei carotenoidi legati alla riduzione del rischio di malattie cardiovascolari, degenerazione maculare senile, miglioramento delle funzioni cognitive, visive [75] e cancro [76]. Alimenti particolarmente ricchi di carotenoidi sono la frutta e la verdura, ma anche altri alimenti di origine vegetale, alghe, alimenti di origine animale o altri prodotti come additivi o integratori alimentari [72].

Dal punto di vista chimico i carotenoidi sono molecole costituite da una lunga catena di 35-40 atomi di carbonio definita polienica che trasporta un numero variabile di doppi legami coniugati con diverse stereoconfigurazioni. L'introduzione di strutture ad anello terminale, l'idrossilazione e l'ossigenazione danno origine, insieme alla geometria del poliene, alla diversità strutturale degli oltre 700 carotenoidi noti [73].

I carotenoidi vengono suddivisi in due classi principali: caroteni e xantofille. I caroteni che includono β -carotene, α -carotene e licopene sono terpeni non ossigenati e le xantofille, che includono luteina, zeaxantina e β -criptoxantina, sono terpeni ossigenati [75]. β -carotene, α -carotene, β -criptoxantina, licopene e luteina sono i principali carotenoidi presenti nel plasma umano [77]. Tra

questi, β -carotene, α -carotene e β -criptoxantina sono carotenoidi provitamina A, gli altri sono definiti carotenoidi non provitamina A [78].

Gli apocarotenoidi sono una classe di carotenoidi, contenenti meno di 40 atomi di carbonio derivanti dalla degradazione ossidativa dei doppi legami dei carotenoidi [78]. Questi si possono formare in seguito a reazioni chimiche negli alimenti che contengono carotenoidi o dalla scissione enzimatica di carotenoidi intatti. Ad oggi sono stati individuati numerosi apocarotenoidi con strutture estremamente differenti sia nelle piante che negli animali. Quelli più noti sono rappresentati dalla vitamina A ed i suoi derivati (retinoidi) [77], l'acido abscissico, la bixina e la crocetina [72].

I principali composti carotenoidi presenti nello zafferano sono rappresentati dalla crocina responsabile del colore, dalla picrocrocina responsabile del gusto e dal safranale responsabile dell'aroma e dell'odore. Questi si concentrano prevalentemente negli stimmi di *Crocus sativus*; tuttavia una minor quantità è stata rilevata anche nei tepali. Gli estratti sono stati analizzati mediante *LC-ESI-MS* (liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry).

Nella tabella sottostante vengono riportati i principali carotenoidi e apocarotenoidi identificati nei tepali di *Crocus sativus*.

<i>Apocarotenoidi</i>	<i>Autore</i>
Picrocrocina	[68]
Crocusantina C	[68]
Crocusantina D	[68]
Crocusantina J	[68]
Crocusantina I	[68]
Crocusantina K	[68]
Crocusantina L	[68]
Crocetina	[4]
Crocetina (beta-D-glucosil) estere	[4]
Crocetina di (beta-D-glucosil) estere	[4]
Crocetina (beta-D-gentabiosil) estere	[4]
Crocetina (beta-D-glucosil) -(beta-D-gentiobiosil) estere	[4]
Crocetina di (beta-D-gentabiosil) estere	[4]
Crocetina tri (D-glucosil) -(beta-D-gentiobiosil) estere	[4]
<i>Carotenoidi tepali</i>	
Luteina-O-dilaurato	[53]
Luteina-O-miristato-O-laurato	[53]
Luteina-O-laurato-O-palmitato	[53]

Luteina-O-stearato-O-palmitato	[53]
Luteina-O-stearato-O-miristato	[53]
Luteina-O-stearato-O-laurato	[53]
Luteina-O-dipalmitato	[53]
Luteina-O-distearato	[53]

Tabella 7: Tabella che mostra i principali carotenoidi e apocarotenoidi presenti nei tepali di *Crocus sativus*.

2.5 Proprietà Terapeutiche

I tepali, grazie ai componenti bioattivi in essi presenti, possiedono una varietà di effetti farmacologici, inclusi effetti antiossidanti [9] [4] [10] [11] [12] [13], epatoprotettivi [14], antinocicettivi e antinfiammatori [79] ed effetti cardioprotettivi [80]. Inoltre, è stato condotto uno studio sull'efficacia clinica dei tepali di zafferano per il trattamento della depressione moderata [55]. I pochi studi condotti sull'attività biologica degli stami, hanno mostrato che possiedono anch'essi attività antiossidante [4] ed attività antimicrobica [81].

2.5.1 Attività antiossidante

Gli antiossidanti sono sostanze che aiutano a contrastare gli effetti dannosi dei radicali liberi e di altri ossidanti che si formano in seguito a reazioni di ossidazione nel nostro organismo [82]. Il corpo umano possiede diversi meccanismi di difesa antiossidanti endogeni che agiscono contemporaneamente contro le specie reattive all'ossigeno (ROS). Questi includono enzimi, antiossidanti a basso peso molecolare e alcune vitamine (acido ascorbico, a-tocoferolo) così come i carotenoidi [83].

Una sovrapproduzione di radicali liberi o la diminuzione della concentrazione di antiossidanti può causare lo stress ossidativo (*Fig. 14*) [84], condizione

correlata a numerose patologie croniche quali tumori, malattie cardiovascolari e malattie neurodegenerative tra cui il morbo di Parkinson e l'Alzheimer.

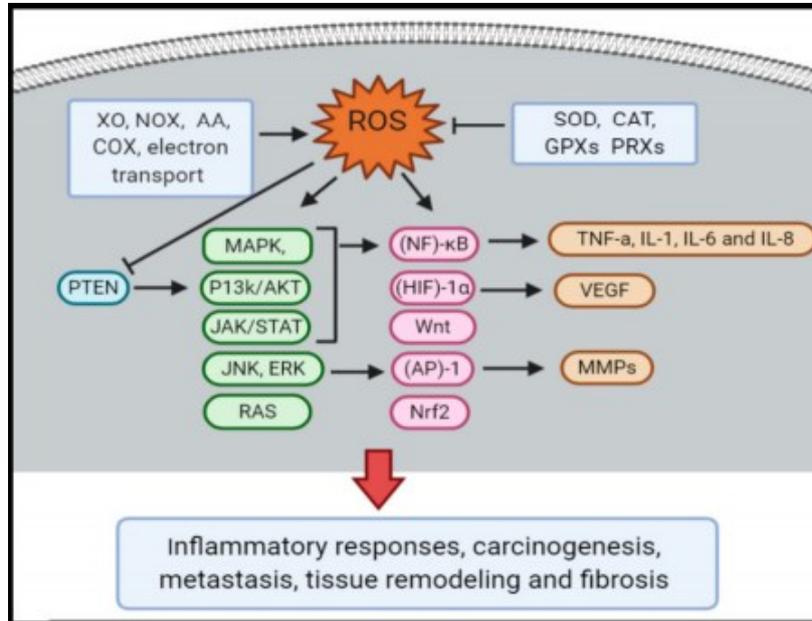


Figura 14: Immagine che mostra l'effetto dello stress ossidativo nelle cellule. I ROS sono generati da enzimi quali xantina ossidasi (XO), NADPH ossidasi (NOX), ossido nitrico sintasi (NOS) e cicloossigenasi (COX) e dalla catena respiratoria mitocondriale. Questa produzione è contrastata dagli enzimi antiossidanti endogeni come il superossido dismutasi (SOD) e la catalasi (CAT). La produzione eccessiva di ROS, in seguito ad uno squilibrio tra i due meccanismi, attiva diversi fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni coinvolti nelle risposte infiammatorie, nella cancerogenesi e metastasi, nel rimodellamento tissutale e fibrosi [18].

Per rafforzare le difese antiossidanti endogene ed evitare dunque la sovrapproduzione di radicali liberi, sono necessarie fonti esterne di

antiossidanti che sono facilmente reperibili in alimenti di origine vegetale [17] quali frutta, verdura ma anche bevande a base di erbe.

La crocina è il principio attivo più studiato per quanto riguarda le proprietà antiossidanti dello zafferano. Tuttavia, non agisce da solo, ma grazie al lavoro in sinergia con altri componenti come safranale, dimetilcrocetina e flavonoidi [85]. Gli effetti protettivi dei flavonoidi sono attribuiti alla loro capacità di trasferire elettroni ai radicali liberi, chelare metalli di transizione, attivare enzimi antiossidanti e inibire le ossidasi [86].

I tepali di zafferano sono una biorisorsa ricca di flavonoidi e potrebbero essere utilizzati come potenziale fonte di flavonoidi alimentari. Utilizzando il metodo di Folin-Ciocalteu è stato osservato che i tepali rispetto agli stami, stili e al fiore intero, hanno un contenuto maggiore di flavonoidi (*Tab.8*). Sono questi ultimi a conferire ai tepali la loro capacità antiossidante, e in particolar modo il Kaempferolo.

Campioni	Contenuto polifenoli totali mg GAE/g	Contenuto flavonoidi totali mg CE/g
Tepali	65.34 ± 1,74	60.64 ± 2.71
Stami	35.69 ± 0,94	14.10 ± 1.08
Stili	25.24 ± 1.09	12.17 ± 1.26
Fiore intero	54.59 ± 0.63	34.23 ± 1.26

Tabella 8: Confronto contenuto di polifenoli totali e flavonoidi degli estratti etanoliche di tepali, stami, stili e fiore intero determinati con metodo Folin-Ciocalteu. [87]

Il potenziale antiossidante dei tepali di zafferano, e le altre parti del fiore (stami, stimmi, stilo e fiore intero), è stato valutato mediante 3 saggi *in vitro*: perossidazione lipidica, saggio del desossiribosio e capacità antiossidante trolox equivalente (TEAC) [11]. Nella *tabella 9* vengono riportati i valori ottenuti da questi tre saggi e confrontati con l'attività antiossidante dell'additivo alimentare gallato di propile i cui valori erano superiori ai campioni testati. I valori elevati di TEAC indicano che tutti i campioni possiedono capacità antiossidanti [11]. Stimmi, stami, e tepali hanno mostrato un valore di TEAC più alto a 6 minuti rispetto agli stili e ai fiori interi. Tranne nel caso di fiori interi, i valori di TEAC a 24 h non erano molto superiori ai valori di TEAC a 6 min. Ciò potrebbe significare che i campioni hanno un

effetto antiossidante immediato [11]. Gli stami e gli stimmi hanno mostrato valori più elevati di inibizione alla perossidazione lipidica e dunque un'attività scavenger maggiore rispetto agli stili e ai tepali [11]. L'inibizione dell'ossidazione del deossiribosio è avvenuta in tutti i campioni ad eccezione degli stimmi.

Campione	Inibizione perossidazione lipidica %	Saggio deossiribosio %	Saggio TEAC 6 minuti	Saggio TEAC 24 ore
Tepali	50.2 ± 4.0	36.4 ± 3.1	12.8 ± 1.3	13.7 ± 1.1
Stami	89.1 ± 3.7	85.3 ± 4.4	12.9 ± 0.3	14.2 ± 0.2
Stimmi	72.7 ± 3.4	-	13.2 ± 0.8	14.3 ± 0.7
Stili	59.4 ± 1.6	41.3 ± 4.4	11.2 ± 0.1	11.2 ± 0.1
Fiore intero	64.8 ± 2.5	48.1 ± 4.5	10.9 ± 1.3	13.3 ± 0.9
Propil gallato	66.6 ± 1.7	-	17.2 ± 0.2	17.4 ± 0.1

Tabella 9: La tabella mostra l'attività antiossidante dei fiori di *Crocus sativus* e delle loro singole parti a confronto con l'attività antiossidante dell'additivo alimentare Gallato di propile [11].

L'interesse per gli antiossidanti naturali è sempre più crescente a causa della preoccupazione dei consumatori sulla sicurezza degli antiossidanti sintetici [11] ampiamente utilizzati nell'industria alimentare per la conservazione degli alimenti. Pertanto, i risultati ottenuti dimostrano che i tepali e gli stami di zafferano potrebbero essere sfruttati come agenti antiossidanti naturali e come conservanti alimentari in sostituzione agli antiossidanti sintetici.

2.5.2 Attività antidepressiva

La depressione è uno dei disturbi psicologici più comunemente diagnosticati che influisce sul pensiero, sul comportamento e sull'umore. Circa 1 adulto su 5 riferisce di aver sperimentato un episodio di depressione nella propria vita, e le donne hanno il doppio delle probabilità di svilupparla [88]. I sintomi più comuni includono eccessiva perdita o aumento del peso, sonnolenza o insonnia, sentimento di inutilità e umore triste persistente che può portare, nei casi più gravi, al suicidio [88]. Esistono diversi metodi per il trattamento della depressione, ma l'uso di farmaci antidepressivi è il più comune. Questi farmaci però possono causare effetti collaterali indesiderati in quanto vanno ad influire sui livelli dei neurotrasmettitori nel cervello; di conseguenza, c'è una crescente propensione all'uso di erbe medicinali tra le persone affette da depressione. I risultati clinici suggeriscono che i tepali di zafferano possono essere utilizzati

per il trattamento della depressione. In uno studio in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo, 30 mg di estratto di tepali di zafferano in capsule somministrate per 6 settimane, hanno mostrato un effetto antidepressivo significativamente migliore rispetto al placebo, senza evidenti effetti collaterali [89].

In un ulteriore lavoro preliminare, l'effetto antidepressivo dei tepali di zafferano è stato confrontato con il farmaco Fluoxetina. In questo studio in doppio cieco e randomizzato, i pazienti sono stati assegnati in modo casuale a ricevere capsule di tepali di zafferano (30 mg/die) o capsule di fluoxetina (20 mg/die) per un periodo di otto settimane [90]. Lo studio non ha riscontrato differenze significative tra i tepali di zafferano e la fluoxetina, ma ha evidenziato il potenziale dello zafferano come antidepressivo naturale, in sostituzione dei farmaci prodotti sinteticamente.

Questi risultati sono stati ulteriormente confermati in un test di nuoto forzato effettuato su topi e ratti. Il Kaempferolo, il principio attivo dei tepali di zafferano, è stato iniettato per via intraperitoneale in entrambi i roditori in dosi di 100 e 200 mg/kg nei topi e 50 mg/kg nei ratti e confrontato con la Fluoxetina come controllo positivo (20 mg/kg) [91]. Sia la Fluoxetina che il Kaempferolo hanno ridotto significativamente i comportamenti di immobilità sia nei topi che

nei ratti (*Fig. 15*), indicando che il kaempferolo può essere un valido agente naturale nel trattamento della depressione [79].

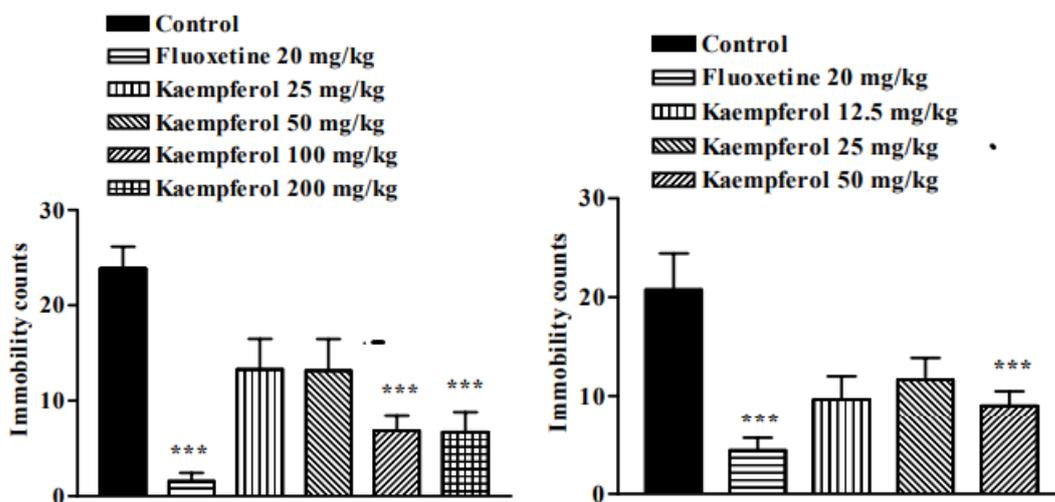


Figura 15 : A sinistra è mostrato l'effetto del Kaempferolo sul comportamento di immobilità nei topi. Gli agenti sono stati somministrati per via intraperitoneale 60 minuti prima del test. A destra è mostrato l'effetto del Kaempferolo sul comportamento di immobilità nei ratti. Gli agenti sono stati somministrati per via intraperitoneale 60 minuti prima del test. I dati sono espressi come media \pm SEM, n = 8 topi, n= 8 ratti rispettivamente. *** P <0.001, rispetto a soluzione fisiologica [92].

2.5.3 Attività antinfiammatoria e antinocicettiva

L'infiammazione o flogosi è una normale difesa biologica contro l'infezione e il danno tissutale [93]. Le infiammazioni si dividono principalmente in infiammazione acuta e cronica in base alla durata nel tempo e a seconda di vari

processi infiammatori e meccanismi cellulari. L'infiammazione acuta ha una durata compresa fra poche ore ed alcuni giorni; l'infiammazione cronica ha una durata variabile di settimane, mesi o anni. L'infiammazione cronica può contribuire all'insorgenza di gravi condizioni patologiche come l'autoimmunità, il diabete e il cancro [94].

Hosseinzadeh et al. hanno indagato l'attività antinfiammatoria di estratti acquosi e di estratti etanoliche di tepali di *Crocus sativus* mediante esperimenti *in vivo* sui topi [79]. Entrambi gli estratti mostrano attività antinfiammatoria: gli estratti etanoliche hanno mostrato un'attività antinfiammatoria significativa nell'infiammazione cronica, al contrario degli estratti acquosi che invece hanno mostrato un'attività antinfiammatoria significativa nell'infiammazione acuta [79].

I risultati ottenuti dall'estratto etanolico di tepali (alla dose di 400 mg/ml) sono stati confrontati con quelli del farmaco Diclofenac (alla dose di 10 mg/ml) ed entrambi hanno mostrato attività antinfiammatorie simili del 63,16% e del 71,05% rispettivamente [95]. Sulla base dei risultati si può concludere che i tepali svolgono un'attività antinfiammatoria nell'infiammazione acuta e/o cronica.

Oltre all'attività antinfiammatoria, è stata valutata anche l'attività antinocicettiva degli estratti di tepali mediante esperimenti *in vivo* sui topi. I

risultati indicano che sia gli estratti acquosi che etanolici svolgono un'attività antinocicettiva contro il dolore indotto da sostanze chimiche nei topi [52]. Gli effetti antinfiammatori e antinocicettivi dei tepali sono stati attribuiti al loro contenuto di flavonoidi, tannini ed antociani [52].

2.5.4 Attività cardioprotettiva

L'obesità è una condizione clinica caratterizzata da eccessivo peso corporeo per accumulo di tessuto adiposo ed è spesso accompagnata da ipertensione, insulino-resistenza e iperlipidemia. L'aterosclerosi è la complicanza più importante delle iperlipidemie che può provocare l'insorgenza di molte patologie tra le quali la più nota è l'infarto miocardico. Alcuni autori sostengono che il consumo di erbe potrebbe essere una strategia efficace per il trattamento dell'obesità grazie alle loro proprietà ipolipemizzanti [65].

Hoshyar et al. hanno studiato gli effetti degli estratti di zafferano sulla dislipidemia, l'aterosclerosi e la resistenza all'insulina su ratti obesi [96]. I ratti sono stati sottoposti ad una dieta ricca di grassi per circa dieci settimane e nutriti con sonda gastrica con estratti di stimmi (40 e 80 mg/kg di peso corporeo), tepali (40 e 80 mg/kg di peso corporeo) o una miscela di questi (80 mg/kg) per una durata di tre settimane [52]. I risultati hanno dimostrato che gli estratti di zafferano, e in particolare l'estratto misto, migliorano la dislipidemia nei ratti

obesi, portando a una diminuzione dell'aterosclerosi e della resistenza all'insulina [95].

Gli estratti infatti hanno ridotto il colesterolo totale, i trigliceridi e le lipoproteine LDL, aumentando i livelli di lipoproteine HDL. Inoltre contribuiscono alla riduzione degli enzimi epatici (AST, ALT e ALP) e alla riduzione dei livelli di leptina, aumentando i livelli di adiponectina [96]. Anche lo stress ossidativo indotto dall'obesità si è notevolmente ridotto dopo somministrazione di estratti di zafferano, grazie alle loro capacità di aumentare i livelli di antiossidanti e inibire la perossidazione lipidica [96]. I risultati ottenuti indicano che gli estratti di zafferano potrebbero essere considerati come potenziali agenti terapeutici nel trattamento dell'obesità, del diabete e dei disturbi cardiovascolari [80] anche se saranno necessarie ulteriori indagini sperimentali.

Studi *in vivo* hanno anche dimostrato che i tepali hanno effetti positivi sull'ipertensione grazie alle sue proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. Nell'esperimento condotto da Fatehi et al. gli estratti etanolic e acquosi di tepali di *Crocus sativus*, hanno ridotto la pressione sanguigna in modo dose-dipendente nei ratti [97]; Inoltre è stato osservato che 50 mg/100 g di estratto acquoso hanno ridotto la pressione sanguigna da 133,5 mmHg a 117 mmHg [95] nei ratti anestetizzati normotesi e ipertesi. Si è ipotizzato che questa

riduzione sia dovuta all'effetto degli estratti di tepali sul cuore stesso o sulla resistenza periferica totale o ad entrambi. Tuttavia, la somministrazione degli estratti non ha modificato significativamente la frequenza cardiaca, pertanto sembra essere più importante l'effetto degli estratti sulla resistenza periferica [97]. I risultati dimostrano che i tepali potrebbero essere utilizzati come agenti terapeutici per il trattamento dell'ipertensione anche se saranno necessari ulteriori indagini per esplorare completamente la potenziale attività protettiva di ciò che fino a poco tempo fa era considerato materiale di scarto [48].

2.5.5 Attività epatoprotettiva

Il fegato è il principale organo disintossicante del corpo e svolge una funzione centrale nell'omeostasi metabolica ed è un importante sito per la sintesi, il metabolismo, l'immagazzinamento e la ridistribuzione di carboidrati, proteine e lipidi. L'epatotossicità o danno epatico, indotto da farmaci, è una delle principali cause di malattie del fegato [14]. L'Acetaminofene noto come paracetamolo (APAP) è un farmaco comunemente utilizzato come analgesico e antipiretico [98]. Il paracetamolo nel fegato viene metabolizzato dagli enzimi del citocromo P450 per formare un metabolita elettrofilo, Nacetil p-benzochinone immina (NAPQI) che viene principalmente inattivato dalla coniugazione con il glutatione [99]. In caso di sovradosaggio di APAP, le vie

di disintossicazione si saturano e il metabolita intermedio si accumula provocando lesioni epatiche e deplezione della produzione di glutatione con conseguente stress ossidativo, principale causa di epatotossicità [100].

Omidi et al. in uno studio *in vivo* hanno indagato gli effetti dell'estratto idroalcolico di tepali di *Crocus sativus* contro l'epatotossicità indotta da APAP [14]. I ratti sono stati pretrattati con estratti di tepali a dosi di 10 e 20 mg/kg per 6 giorni, ed è stato somministrato paracetamolo per via orale alla dose di 600 mg/kg [52]. Ai ratti a cui è stato somministrato solo paracetamolo, si è verificato un aumento significativo dei livelli di AST, ALT e bilirubina, e riduzione delle proteine totali e dell'albumina (*Fig. 16*) [14]. Nei ratti pretrattati con estratti di tepali alla dose di 20 mg/kg si verifica un ripristino della tossicità del paracetamolo e riduzione dei livelli di AST, ALT e bilirubina e miglioramento dei valori di albumina sierica (*Fig. 16*) [14].

Variables (Unit) /Treatment	Healthy Control	Intoxicated (APAP)	APAP+10 mg /kg of CSP	APAP+20 mg /kg of CSP
ALT (U/l)	77±3.96	138.7±8.66**	127.7±7.65*	95±6.48
AST (U/l)	147.7±9.9	281.9±47.2**	193.6±4.4	154.45±5.5
TB (mg/dl)	0.37±0.01	0.54±0.02*	0.47±0.03	0.4±0.02
TP (g/dl)	7.1±0.058	6.67±0.1*	6.92±0.1	7.08±0.09
ALB (g/dl)	3.20±0.03	2.37±0.06**	2.72±0.12*	3.12±0.07

Figura 16: Effetti degli estratti di tepali e APAP sulle concentrazioni di ALT, AST, TB, TP e ALB nel siero di ratti. I valori sono espressi come media ± SEM per sei ratti in ciascun gruppo. *: La differenza è significativa al livello 0,05; **: La differenza è significativa al livello 0,01. [14]

Inoltre dall'esame istopatologico si è osservato che il gruppo ricevente esclusivamente paracetamolo ha subito gravi lesioni agli epatociti quali gonfiore cellulare, infiammazione e necrosi [14]. Mentre nel gruppo pretrattato con alte dosi di estratti di tepali (20mg/kg) sono state osservate lievi alterazioni degenerative (*Fig.17*).

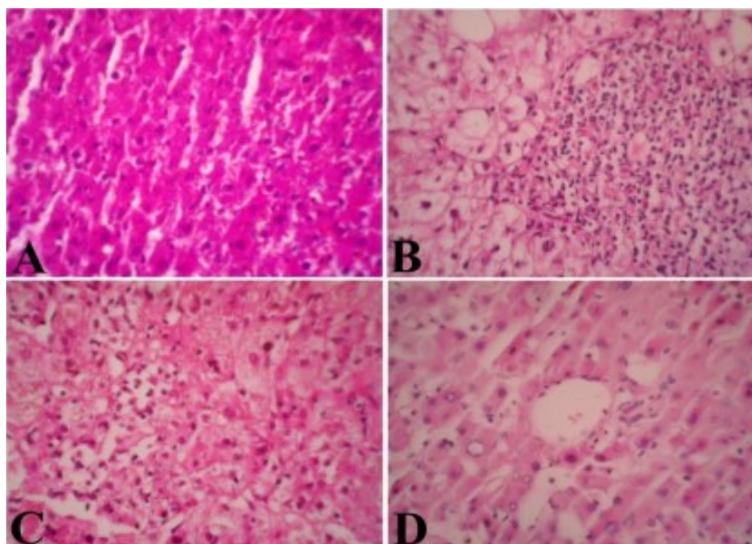


Figura 17: (A) Immagine microscopica di un fegato sano (B) Fegato di ratti intossicati da APAP: si osserva una grave degenerazione e necrosi degli epatociti (C) I ratti intossicati da APAP pretrattati con CSP (10 mg/kg) hanno mostrato degenerazione idropica con lieve necrosi nelle aree centrolobulari del fegato (D) I ratti intossicati da APAP pretrattati con CSP (20 mg/kg) hanno mostrato solo una lieve degenerazione degli epatociti. [14]

Il presente studio *in vivo* ha mostrato che i tepali di zafferano possiedono effetti epatoprotettivi sulla tossicità indotta da APAP. Sebbene il meccanismo di protezione sia ancora sconosciuto, è probabile che l'integrità e la stabilità della

membrana cellulare degli epatociti siano correlate alle attività antiossidanti dei flavonoidi dei tepali [14]. Ulteriori indagini saranno necessarie per capire se i tepali di zafferano possano essere sfruttati per scopi terapeutici nelle patologie epatiche.

2.5.6 Attività antimicrobica

L'attività antimicrobica dell'estratto etero degli stami è stata valutata sia *in vitro*, utilizzando il test di microdiluzione, sia su matrice alimentare contro alcuni microrganismi patogeni [81]. L'attività antibatterica *in vitro* ha mostrato che gli stami esercitano un effetto antibatterico senza mostrare significative differenze tra microrganismi gram+ e microrganismi gram – in termini di concentrazione minima inibente (*Tab. 10*) [81]. Il ceppo più sensibile è risultato essere lo *Staphylococcus aureus* con MIC di 4.5 mg/mL.

BATTERI	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5	9
<i>Listeria monocytogenes</i>	9	9
<i>Salmonella enterica subsp. bongori</i>	9	18
<i>Escherichia coli</i>	9	18

Tabella 10: Tabella che mostra i valori ottenuti *in vitro* ed espressi come concentrazioni minime inibitorie (MIC, mg/mL) e concentrazioni minime battericide (MBC, mg/mL) dell'estratti etero degli stami di zafferano contro i microrganismi testati. [81]

Anche l'analisi microbica su matrice alimentare ha rivelato un'attività antimicrobica degli stami, che hanno portato ad una significativa riduzione del numero di cellule di alcuni ceppi patogeni di origine alimentare e in particolare *E. coli* e *S. aureus* [81].

Questa attività antimicrobica sembra essere correlata al contenuto di polifenoli, terpeni, acidi grassi e in particolare acidi grassi polinsaturi (PUFA) presenti negli stami [81]. Diversi studi hanno dimostrato l'attività antibatterica degli acidi grassi polinsaturi grazie alla loro capacità di alterare l'idrofobicità delle membrane cellulari e la loro integrità portando all'interruzione del sistema di trasporto degli elettroni e conseguente morte cellulare [101].

È stata valutata anche l'attività antimicrobica degli estratti idroalcolici di tepali a differenti concentrazioni (60-90-120 mg/mL) contro alcuni ceppi patogeni. I risultati hanno mostrato una maggiore attività antibatterica su microrganismi Gram-positivi. Inoltre è stato osservato che all'aumento della concentrazione dell'estratto si hanno maggiori effetti antibatterici [102]. Il più alto effetto antibatterico è stato osservato contro *Listeria monocytogenes* alla concentrazione di 120 mg/mL.

Anche in questo caso l'attività antimicrobica è stata attribuita alla loro composizione fenolica di Kaempferolo e dei suoi glicosidi principalmente, quercetina e derivati della miricetina secondariamente [30].

I risultati hanno dunque dimostrato che sia gli estratti di tepali che di stami di zafferano hanno un potenziale come composti antimicrobici, pertanto potrebbero essere sfruttati nel trattamento di malattie infettive in sinergia con gli antibiotici.

2.6 Infusi e loro potenziali ruoli funzionali

La relazione tra alimentazione e malattie croniche è ben documentata [18]. Cambiamenti nella dieta e nello stile di vita possono migliorare la salute vascolare, metabolica e cognitiva [16]. Le piante aromatiche sono una ricca fonte di composti antiossidanti che possiamo ricevere attraverso l'alimentazione per prevenire lo stress ossidativo e le malattie ad esso associate.

In passato venivano tradizionalmente impiegate per la cura di diversi disturbi, oggi si assiste al loro crescente impiego in settori differenti come quello dei biopesticidi, cosmetici bioecologici (cosmoceutica), degli alimenti funzionali (nutraceutica) o delle bevande infusionali (tisane) [103].

Le bevande infusionali, note come tisane, sono penetrate in un mercato di nicchia emergente insieme ad altre bevande popolari come tè, caffè e cacao, anch'esse preparate utilizzando materiali vegetali [17]. Iniziarono ad essere consumati per via del gusto e aroma, e il loro uso si radicò gradualmente nella cultura di diversi paesi. Al giorno d'oggi vengono ampiamente consumati anche per i loro effetti benefici sulla salute grazie ai composti bioattivi in essi contenuti come alcaloidi, carotenoidi, cumarine, flavonoidi, poliacetileni e terpenoidi [104] che conferiscono alle specie erboristiche una vasta gamma di

effetti biologici tra cui antiossidanti, antinfiammatori, antimicrobici, analgesici, neuroprotettivi e anticancerogeni.

Le tisane si ottengono per infusione (infuso) o decozione (decotto) [105] di diverse parti aromatiche delle piante come fiori, frutti, foglie, semi o radici. L'infuso si ottiene lasciando in macerazione il materiale vegetale in acqua bollente per un tempo più o meno lungo affinché i principi attivi e i principi aromatici in esso contenuti vengano estratti. La decozione prevede la bollitura del materiale vegetale (di solito le parti più dure della pianta come cortecce e radici) per un tempo prolungato [105]. Tale procedura facilita l'estrazione di più principi attivi ma allo stesso tempo causa dispersione delle sostanze volatili [105].

Un recente studio ha dimostrato che i parametri di estrazione come la temperatura, il tipo di acqua utilizzata ed il tempo di macerazione possono influenzare gli attributi sensoriali degli infusi [106]. Nonostante sia più diffuso l'utilizzo dell'acqua calda per la preparazione degli infusi, è stato dimostrato che l'estrazione a freddo permette di ottenere una bevanda con una concentrazione più elevata di composti bioattivi [107] nonché caratteristiche organolettiche migliori.

Le piante Officinali utilizzate per la preparazione degli infusi sono numerose e diversificate.

Qui di seguito vengono riportati alcuni esempi:

Dalle foglie e dai germogli della pianta *Camellia sinensis* si possono ricavare diverse tipologie di tè (bianco, verde, nero e oolong), bevande estremamente popolari in tutto il mondo [108]. Gli infusi ricavati dai fiori essiccati e foglie di *Cassia auriculata* e gli infusi a base di *Aegle marmelos* (Bael), hanno guadagnato popolarità in paesi come l'India e lo Sri Lanka. La *C. auriculata* è nota per le sue proprietà ipoglicemicizzanti mentre le foglie, la corteccia e i frutti di *A. marmelos* nella medicina tradizionale sono utilizzati per la cura di vari disturbi intestinali [17]. Il Rooibos ottenuto dalle foglie essiccate di *Aspalathus linearis* è un popolare infuso sudafricano utilizzato per la cura di coliche infantili, allergie, asma e problemi dermatologici [17]. Yerba mate a base di *Ilex paraguariensis* è l'unico infuso a base di erbe contenente caffeina. Viene comunemente consumata in Sud America grazie alle sue proprietà epatoprotettive, diuretiche e stimolanti [17]. La Camomilla è una pianta appartenente alla famiglia delle Compositae a cui appartengono diverse varietà: *Camomilla recutita*, *Matricaria chamomilla* e/o *Chamaemelum nobile* [17]. Da queste si ricava la camomilla una bevanda ampiamente consumata in Europa grazie alle sue proprietà ansiolitiche, antispasmodiche, antiossidanti ed antimicrobiche.

Studi osservazionali suggeriscono che potrebbe esserci una correlazione tra il consumo di infusi a base di erbe e un ridotto rischio di malattie croniche grazie al loro contenuto di antiossidanti [18]. Tuttavia saranno necessarie ulteriori indagini per valutarne la loro efficacia e sicurezza.

3 Materiali e Metodi

3.1 Preparazione degli infusi

I fiori di *Crocus sativus* sono stati gentilmente offerti dall'Azienda Agraria Lorenzini (Ancona, Italia), il tè nero è stato acquistato in un negozio al dettaglio locale mentre il Rooibos rosso è stato ottenuto da Bokkeveld Rooibos (Nieuwoudtville, Northern Cape, Sud Africa).

In laboratorio è stata effettuata la mondatura dello zafferano (*Crocus sativus*) in modo da separare i tepali e gli stami dal resto del fiore (*Fig. 18*).



Figura 18: Tepali e stami ottenuti dopo mondatura e utilizzati per la preparazione degli infusi.

Dopo mondatura, sia i tepali che gli stami sono stati sottoposti a essiccazione in stufa termostatica ad una temperatura di 40 °C per un tempo di 5 ore.

Successivamente sono state preparate quattro diverse infusioni di tepali (T) e stami (S) come illustrato in *figura 19* utilizzando per ciascuna estrazione 0,25 g di materiale vegetale e 25 ml di acqua in una tazza di vetro munita di coperchio.

Gli infusi caldi (H) sono stati preparati versando dell'acqua bollente (100°C) sul materiale vegetale e lasciato riposare per 5 minuti a temperatura ambiente ($\pm 21^\circ\text{C}$) con occasionale agitazione manuale. Gli infusi bolliti (B) sono stati preparati versando acqua bollente sul campione, e lasciato bollire in modo continuo per 5 minuti in bagno termostatico a 100°C sotto agitazione occasionale. Gli infusi a temperatura ambiente (RT), sono stati preparati versando acqua a temperatura ambiente sul campione e portati in agitazione costante per 2 ore a temperatura ambiente ($\pm 21^\circ\text{C}$) su di un agitatore orbitale Biosan a 140 rpm. Infine gli infusi a freddo (C), sono stati preparati nello stesso modo degli infusi a temperatura ambiente, ma mantenuto in continua agitazione in camera fredda alla temperatura di 4°C overnight. I tè Rooibos (R), Stimmi (St) e tè nero (Bt) sono stati preparati con il metodo dell'infusione a caldo (H). Ciascuna infusione è stata poi filtrata attraverso un colino a maglie strette (*Fig. 19*), centrifugata a 1000 rpm per 10 minuti, filtrata su carta da filtro Albet da 12 μm e conservata a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

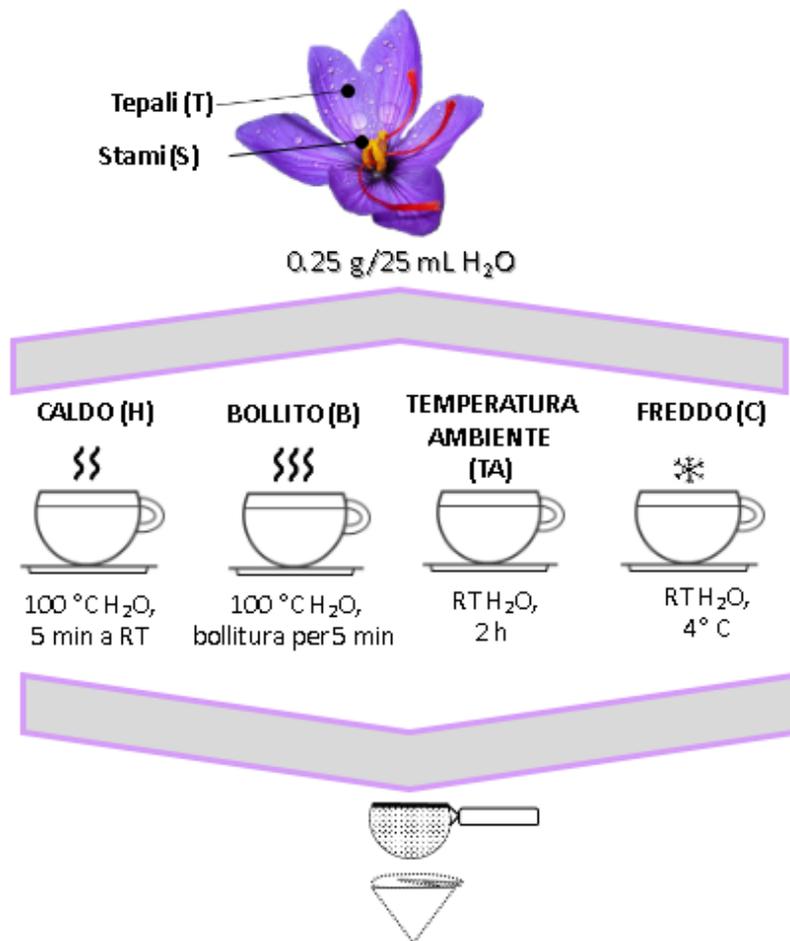


Figura 19: Rappresentazione schematica dei differenti metodi di estrazione utilizzati per la preparazione delle infusioni di tepali (T) e stami (S).

3.2 Analisi fitochimiche

3.2.1 Determinazione dei polifenoli totali degli infusi

Per la valutazione dei polifenoli totali (TPC) degli infusi si è ricorso al saggio di Folin-Ciocalteu (FC) [109] [87]. Si tratta di un metodo colorimetrico che

sfrutta la capacità del reattivo di Folin-Ciocalteu, una miscela in soluzione acquosa di fosfomolibdato e fosfotungstato, di reagire con i fenoli presenti negli estratti vegetali ossidandoli. L'ossidazione porta alla formazione di ossido di molibdeno e ossido di tungsteno rispettivamente, prodotti cromofori che mostrano un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di 750 nm. Per la curva standard viene utilizzato l'acido Gallico, un composto fenolico con attività antiossidante.

A 200 µl di ciascuna infusione sono stati aggiunti 12,5 µl di reattivo di Folin e lasciati incubare per 10 minuti prima dell'aggiunta di 37,5 µl di Na₂CO₃ (20%). Dopo l'aggiunta di carbonato di sodio, la piastra è stata lasciata in incubazione all'interno del lettore per micropiastre per 30 minuti ad una temperatura di 40 °C. Successivamente è stata valutata l'assorbanza a 765 nm, che è direttamente proporzionale alla quantità di polifenoli totali presenti nel campione. I risultati ottenuti vengono espressi come mg di acido gallico equivalenti (GAE) per litro (mg GAE/L).

3.2.2 Determinazione dei flavonoidi totali

Per la quantificazione dei flavonoidi totali (TFC) degli infusi, si è ricorso al saggio colorimetrico del cloruro di alluminio (AlCl₃) [110] utilizzando una micropiastra di 96 pozzetti. Il cloruro di alluminio possiede la capacità di

formare dei complessi con i gruppi chimici dei flavonoidi permettendo la determinazione del loro contenuto totale.

A 50 μL di infusioni di tepali e stami sono stati aggiunti 12 μL di NaNO_2 (5%) e incubati per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 12 μL di AlCl_3 (10%) e dopo 1 minuto la reazione è stata neutralizzata con 80 μL di NaOH alla concentrazione di 1M. Dopo 15 minuti di incubazione, l'assorbanza è stata valutata a 510 nm mediante un lettore di micropiastre. La catechina è stata utilizzata come composto standard ed i risultati ottenuti sono stati espressi come mg di equivalenti di catechina per litro di estratto (mg CE/L).

3.3 Capacità antiossidante *in vitro* degli infusi

La capacità antiossidante degli infusi di tepali (T) e stami (S) è stata valutata mediante tre saggi: **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity), **DPPH** (2,2'-Difenil-1-picrilidrazile) e **FRAP** (Ferric ion reducing antioxidant power).

3.3.1 *ORAC assay*

L'ORAC, acronimo di Oxygen Radical Absorbance Capacity, è un saggio quantitativo che misura la capacità di una sostanza antiossidante di inibire la degradazione ossidativa di una molecola fluorescente indotta da radicali

perossilici (ROO•) [111]. Nel metodo di base un radicale perossilico, nel nostro caso AAPH, reagisce con la sonda fluorescente diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) degradandola con conseguente formazione di un composto non fluorescente. La diminuzione della fluorescenza, proporzionale al prodotto formato nel tempo, permette di determinare la capacità antiossidante dei campioni.

Come standard viene utilizzato il Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) un antiossidante analogo solubile della vitamina E. La reazione è stata condotta in tampone fosfato di sodio 75 mM (pH 7,4) in un volume di reazione finale di 200 μ L in micropiastre di 96 pozzetti di polistirene nero. 25 μ l di campioni diluiti (1:100) sono stati addizionati a 150 μ l di fluoresceina 0,08 μ M. Successivamente poco prima della lettura, sono stati aggiunti 25 μ L di soluzione AAPH (150 mM) come generatore di radicali perossilici. La diminuzione della fluorescenza è stata monitorata per tre ore mediante un lettore di micropiastre con letture ogni 4 minuti utilizzando lunghezze d'onda a 485 nm (eccitazione) e 530 nm (emissione). La protezione antiossidante dei campioni è stata valutata in base alla differenza tra le aree della curva di decadimento della sonda (AUC) e quella del campione. I risultati vengono espressi come μ mol di Trolox equivalenti su litro (μ M TE).

3.3.2 DPPH scavenging assay

Il DPPH scavenging assay è un saggio utilizzato per lo studio dell'attività antiossidante *in vitro* e utilizzato per valutare l'attività scavenger verso i radicali liberi. Il campione da analizzare viene fatto reagire con una soluzione metanolica di DPPH (2,2'-Difenil-1-picrilidrazile). Il DPPH è un radicale azotato, leggermente stabile in quanto possiede sull'atomo di azoto un elettrone spaiato che viene stabilizzato per risonanza sull'anello aromatico.

I composti antiossidanti agiscono trasferendo un atomo di idrogeno al radicale (HAT) e, se presenti nel campione, determinano una diminuzione dell'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione e all'attività antiossidante del campione stesso causando decolorazione della soluzione che vira dal viola al giallo [112] (*Fig.20*). Si analizza quindi la diminuzione del picco alla lunghezza d'onda di 517 nm del radicale (DPPH) dopo un tempo di incubazione prestabilito.

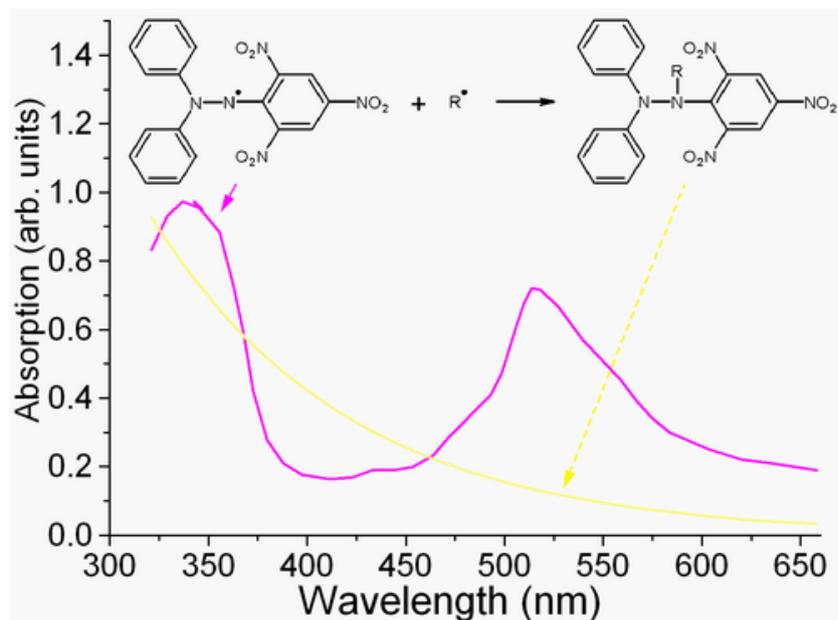


Figura 20: Il grafico mostra il radicale DPPH e la sua forma stabile. Il DPPH essendo un radicale libero è caratterizzato dalla delocalizzazione dell'elettrone che comporta una colorazione viola intensa leggibile alla lunghezza d'onda di 520 nm; quando il radicale viene neutralizzato, in seguito all'aggiunta di un composto antiossidante, esso si stabilizza ed il colore vira dal viola intenso al giallo brillante.

La soluzione DPPH è stata preparata 24 ore prima dell'analisi sciogliendo 0.004g di DPPH in 107 ml di metanolo e portato in agitazione overnight. Il saggio è stato eseguito secondo il seguente protocollo [113]: 12 μL di campione sono stati aggiunti a 235 μL di soluzione DPPH (95 μM) e incubati per 40 min al buio su di una piastra da 96 micropozzetti. L'assorbanza a 517 nm è stata quindi determinata su un lettore di micropiastre. La capacità di eliminare il radicale DPPH è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$\% \text{ Inibizione} = \left(\frac{\mathbf{ABS \text{ CTRL}} - \mathbf{ABS \text{ campione}}}{\mathbf{ABS \text{ CTRL}}} \right) \cdot 100$$

3.3.3 FRAP assay

La capacità antiossidante *in vitro* degli infusi di tepali e stami, è stata valutata anche utilizzando il saggio FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power). Tale saggio è stato introdotto da Benzie e Strain [114] per valutare, a livello clinico, la capacità antiossidante del plasma sanguigno; in seguito è stato sfruttato anche per l'analisi di campioni alimentari.

In questo metodo, il ferro ferrico complessato con 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) agisce sia come ossidante che come cromoforo. La reazione del complesso $\text{Fe}^{3+}\text{-(TPTZ)}_2$ con un antiossidante (RH) genera la forma ridotta $\text{Fe}^{2+}\text{-(TPTZ)}_2$ ed il donatore di elettroni ossidato indicato come $\text{R}\cdot$ (Fig. 21) [115]. Il complesso ridotto è colorato pertanto la reazione può essere monitorata spettrofotometricamente alla lunghezza di massimo assorbimento localizzata intorno a 593 nm.

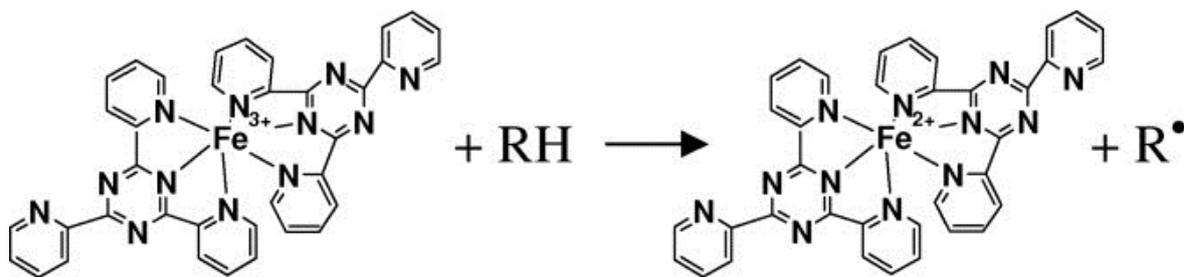


Figura 21: Riduzione del complesso Fe³⁺- (TPTZ)₂ da parte di un generico antiossidante (RH). La reazione genera la forma ridotta (Fe²⁺- (TPTZ)₂) e il donatore di elettroni ossidato (R•).

Il più grande svantaggio di questa metodica è che il valore della capacità antiossidante può risultare maggiore se nel campione analizzato sono presenti altri composti che non sono antiossidanti.

Il saggio FRAP è stato eseguito secondo il protocollo seguente [115]: il reagente FRAP è stato preparato mescolando 2,5 mL di 2,4,6-Tripiridil-s-triazina (TPTZ 10 mM in HCl 40 mM) con 25 mL di tampone acetato di sodio (300 mM, pH 3,6) e 2,5 mL soluzione acquosa di FeCl₃ (20 mM).

10 µL delle infusioni di T e S sono stati aggiunti a 240 µL del reagente FRAP e incubati per 5 minuti a 37 ° C. L'assorbanza dei campioni è stata letta alla lunghezza d'onda di 620 nm mediante un lettore di micropiastre. Per la curva standard è stato utilizzato il Trolox ed i risultati sono stati espressi come mM di Trolox equivalenti su litro (mM TE).

3.4 Analisi metabolomica mediante UHPLC-ESI-QTOF-MS

Ciascun campione liofilizzato è stato estratto in acqua (1:20 p/v) mediante estrazione ultrasuono- assistita. I campioni sono stati centrifugati a 6000 rpm per 10 min a 4 ° C e il surnatante è stato infine trasferito in una fiala per HPLC per la successiva analisi. Il profilo fenolico di ciascun campione è stato studiato attraverso un approccio metabolomico non mirato basato su cromatografia liquida ad ultra prestazione accoppiata a spettrometria di massa quadrupolo-tempo di volo (UHPLC-QTOF-MS), seguendo condizioni analitiche precedentemente ottimizzate [5].

È stata ottenuta una separazione cromatografica in fase inversa utilizzando una colonna C18 Agilent Zorbax eclipse plus (50 mm × 2,1 mm, 1,8 µm) e un gradiente binario acqua-acetonitrile (dal 6% di acetonitrile al 94% di acetonitrile in 32 min). Masse precise nell'intervallo di 100-1200 m/z sono state acquisite dallo spettrometro di massa in modalità full-scan positiva e a una velocità di 0,8 spettri/s (soglia di altezza di picco assoluta 3000 conteggi, soglia di altezza relativa 0,0001%). Gli estratti delle infusioni sono stati analizzati in triplicato, con un volume di iniezione di 6 µL. Inoltre, la sequenza di iniezione è stata randomizzata e sono stati considerati sia il bianco (solo solvente di estrazione) che i campioni di controllo di qualità. È stato utilizzato il software

Agilent Profinder B.07 per l'identificazione presunta da caratteristiche grezze (combinazioni di massa e abbondanza), secondo l'algoritmo "find-by-formula". Il modello isotopico (cioè massa monoisotopica, spaziatura isotopica e rapporto isotopico) è stato utilizzato per l'annotazione rispetto al database Phenol-Explorer 3.6. Pertanto, secondo le condizioni sperimentali, è stato raggiunto un livello 2 di confidenza (cioè composti presumibilmente annotati), considerando una tipica tolleranza di 5 ppm per l'accuratezza della massa. Il set di dati metabolici grezzi è stato ottenuto dopo il filtraggio dei dati post-acquisizione (sono stati conservati solo i composti identificati entro il 100% delle repliche in almeno un trattamento), il basamento e la normalizzazione utilizzando il software Agilent Mass Profiler Professional B.12.06. Per ottenere dati semiquantitativi dalle caratteristiche annotate, i composti isobarici sono stati rimossi dal dataset grezzo e tutti i polifenoli annotati sono stati classificati in classi e sottoclassi. I polifenoli sono stati poi quantificati utilizzando soluzione standard di composti standard puri (> 98%) rappresentativi di ciascuna classe/sottoclasse (es. cianidina per gli antociani, quercetina per i flavonoli, luteolina per i flavoni e altri flavonoidi, catechina per i flavan-3-oli, acido ferulico per gli acidi fenolici, sesamina per i lignani, resveratrolo per gli stilbeni, tirosolo per i tirosoli e altri composti fenolici). I risultati sono stati

espressi come mg equivalenti/g di sostanza secca (DM), considerando tre repliche (n = 3).

3.5 Analisi sensoriale

Una valutazione sensoriale delle infusioni di tepali è stata effettuata da volontari per determinare come le diverse condizioni di infusione influenzino l'aroma, il gusto e il gradimento complessivo delle infusioni calde e fredde di tepali (H e C). Le infusioni sono state preparate come riportato in *Fig. 21* ma raddoppiando il volume e la quantità di materiale vegetale (0,5 g/50 mL H₂O). Nello studio è stato reclutato un gruppo di 12 volontari sani (età 23-50 anni), interessati alla valutazione sensoriale delle bevande di tè. A questi valutatori è stato chiesto di evitare di fumare, lavarsi i denti, usare profumi e mangiare o bere qualsiasi cosa eccetto l'acqua, entro 1 ora prima della sessione di degustazione. Prima della valutazione, è stata condotta una sessione di formazione da un esperto del tè per spiegarne le definizioni degli attributi di qualità in merito all'analisi sensoriale. Successivamente, ad ogni valutatore è stata offerta un'infusione alla volta a cui è stato chiesto di esprimere il proprio parere su di un questionario che è stato suddiviso in tre parti: Identità dei valutatori (età, sesso, condizione fisiologica che può influenzare il test (fumo, allergie, stress, raffreddore, ecc.)); Test per odore, colore, gusto (amaro,

astriigente, dolce, persistenza) e test per aroma utilizzando macro e micro descrittori (tra parentesi): Floreale, Speziato, Vegetale (erba verde, verdure cotte, erbe aromatiche), Sottobosco (legnoso, terroso, minerale) e Fruttato (frutti di bosco, agrumi, tropicali, frutta secca). La scala di intensità è stata espressa da 0 a 5 corrispondente alla percezione 'assente'=0, 'appena'=1, 'abbastanza'=2, 'piuttosto'=3, 'molto'=4 e 'estremamente'=5. La valutazione personale del gradimento complessivo è stata espressa su una scala verbale: molto buono, buono, giusto e spiacevole. I dati sono stati poi raccolti ed elaborati statisticamente al fine di ottenere i risultati per ciascun descrittore.

3.6 Analisi statistica

I test sono stati eseguiti almeno tre volte in modo indipendente, in cui ogni campione/standard/controllo è stato incluso in triplicato e i risultati sono riportati come medie \pm S.D.

I dati di metabolomica sono stati elaborati utilizzando il software Agilent Mass Profiler Professional B.12.06 come descritto in precedenza [5]. In particolare, il dataset metabolomico è stato esportato in SIMCA 13 (Umetrics, Malmo, Svezia) e quindi è stata effettuata una proiezione ortogonale supervisionata all'analisi discriminante su strutture latenti (OPLS-DA). Inoltre, sono stati utilizzati anche i test T2 e di permutazione di Hotelling per escludere la

presenza di forti valori anomali ($p > 0,05$) e un possibile overfitting. L'importanza della variabile nell'approccio di proiezione (VIP) è stata quindi utilizzata per rappresentare i composti più discriminanti (punteggio VIP > 1) consentendo la discriminazione tra i diversi metodi di infusione. Inoltre, per ogni composto di marcatori VIP, sono state estrapolate le variazioni Log Fold-Change (FC) per ogni possibile confronto. Infine, è stata effettuata un'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) con il software GRAPHPAD PRISM 8.2. Per confrontare le medie è stata utilizzata l'analisi post-hoc del test di confronto multiplo di Tukey ($p < 0,01$). Anche le correlazioni di Pearson ($p = 0,01$, a due code) sono state calcolate utilizzando il software IBM SPSS (versione 25.0).

4 Risultati

4.1 Livelli di polifenoli e flavonoidi totali di infusi di Stami e Tepali di *Crocus Sativus*

Per caratterizzare i componenti bioattivi presenti negli infusi di Stami e Tepali di zafferano sono stati valutati i livelli dei principali fitocomposti: polifenoli totali e flavonoidi.

La valutazione dei polifenoli totali è stata eseguita utilizzando il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu e i dati sono espressi come acido gallico equivalenti (GAE). Per la valutazione dei flavonoidi si è ricorso al saggio colorimetrico del cloruro di alluminio e i risultati sono espressi come mg di catechina equivalente (CE).

Nella *tabella 11* vengono riportati i valori di polifenoli totali (TPC) e flavonoidi (TFC) ottenuti dall'analisi fitochimica delle infusioni di tepali e stami in base alle diverse tipologie di estrazione.

		Polifenoli	Flavonoidi
		mg GAE/L	mg CE/L
Tepali	C	83 ± 22 ^a	34 ± 17 ^a
	B	159 ± 12 ^b	74 ± 22 ^b
	TA	186 ± 55 ^b	89 ± 17 ^b
	F	186 ± 36 ^b	91 ± 17 ^b
Stami	C	105 ± 20 ^a	28 ± 17 ^a
	B	80 ± 15 ^a	55 ± 16 ^a
	TA	94 ± 29 ^a	45 ± 25 ^a
	F	99 ± 24 ^a	46 ± 24 ^a

Tabella 11: Livelli di polifenoli totali e flavonoidi negli infusi di stami e tepali tramite diverse condizioni di infusione: Caldo (C), Bollito (B), Temperatura ambiente (TA) e Freddo (F). I dati sono espressi come media ± DS, n = 6. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra campioni tra ciascuna colonna (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey p < 0,05).

Dai risultati si può osservare che tutte le infusioni di tepali mostrano un contenuto complessivo di polifenoli totali (TPC) più elevato rispetto alle infusioni di stami. Inoltre, le diverse tipologie di estrazione di queste ultime infusioni non hanno influenzato in modo significativo il TPC, a differenza dei tepali i cui infusi preparati con bollitura, a temperatura ambiente e a freddo hanno mostrato valori TPC significativamente maggiori rispetto alle infusioni a caldo. Una tendenza simile si può osservare anche per il TFC, in cui i valori erano più elevati negli infusi di tepali preparati con le medesime estrazioni.

4.2 Proprietà antiossidanti degli infusi ottenuti da Stami e Tepali di *Crocus sativus*

La valutazione delle proprietà antiossidanti delle diverse tipologie di infusioni di Tepali e Stami è stata eseguita utilizzando il saggio *ORAC* (Oxygen Radical Absorbance Capacity), il saggio *DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ed il saggio *FRAP* (Ferric ion reducing antioxidant power).

Le capacità antiossidanti delle diverse infusioni di Stami e Tepali rilevate dai tre saggi [116] sono mostrate in *figura 22*.

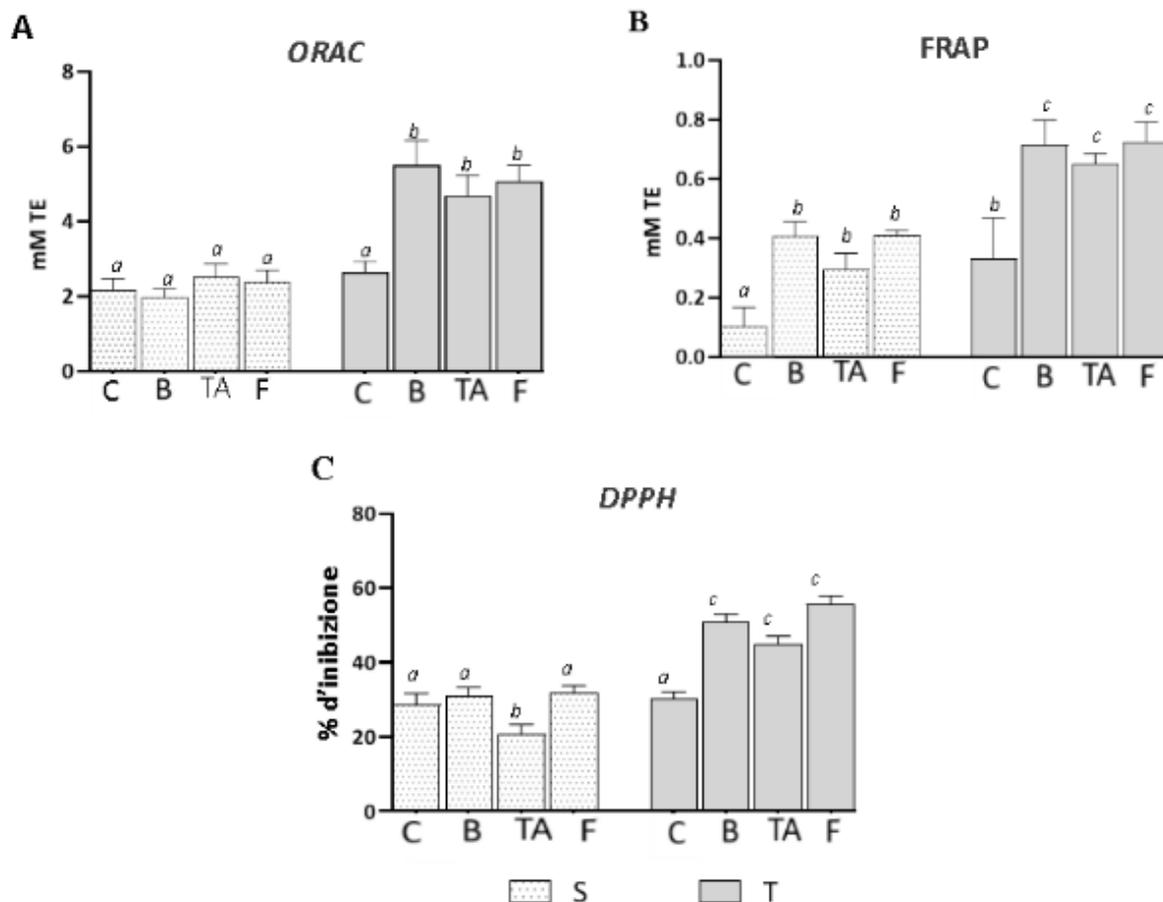


Figura 22: Effetto dei diversi metodi di infusione sulla capacità antiossidante misurata utilizzando il saggio ORAC (A), il saggio FRAP (B) e il saggio DPPH (C) delle infusioni di Stami (S) e Tepali (T). Le condizioni di infusione sono: Caldo (C). Bollito (B). Temperatura ambiente (TA) e Freddo (F). Le barre di errore rappresentano \pm SD, n = 6. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey, $p < 0,05$).

Dai risultati si può osservare che le infusioni di tepali, indipendentemente dal saggio utilizzato, possiedono una capacità antiossidante maggiore rispetto alle infusioni di stami. Inoltre si può notare, soprattutto nelle infusioni di tepali, che

le infusioni a freddo e a temperatura ambiente portano alla stessa capacità antiossidante degli infusi preparati con bollitura.

Confrontando i tre saggi si possono notare alcune differenze:

Il saggio ORAC mostra che tutte le infusioni di stami mostrano le stesse capacità antiossidanti. Nei tepali l'infusione a caldo mostra una capacità antiossidante molto minore rispetto alle infusioni a freddo, a temperatura ambiente e bollite.

Il saggio FRAP mostra che le infusioni a caldo, sia di stami che di tepali, possiedono sempre minore capacità antiossidante rispetto alle altre condizioni di estrazione.

Il saggio DPPH mostra che le infusioni a temperatura ambiente degli stami, possiedono la capacità antiossidante più bassa rispetto alle altre tre preparazioni.

Malgrado queste piccole differenze, i risultati ottenuti dai tre diversi saggi sono tutti correlati tra loro con valori di coefficiente di Pearson superiori a 0,95 per ogni caso. Inoltre vi è una correlazione tra la capacità antiossidante ed il contenuto totali di polifenoli (TPC) e flavonoidi (TFC) dove i valori del coefficiente di Pearson sono compresi nell'intervallo 0,895-0,978.

Per la quantificazione di composti fenolici delle infusioni di stami e tepali, sono state selezionate solo le infusioni preparate con metodo bollitura (B) e a freddo (F) dal momento che queste hanno mostrato complessivamente una maggiore attività antiossidante rispetto alle altre condizioni di estrazione (*Fig. 19*). Si è ricorso ad un approccio basato sulla metabolomica non mirata (spettrometria di massa *UHPLC-QTOF-MS*) al fine di ottenere ulteriori approfondimenti sull'influenza che questi due metodi di infusione hanno sul profilo fenolico di *Crocus sativus* e di conseguenza sull'attività antiossidante.

4.3 Analisi metabolomica dei composti bioattivi degli infusi ottenuti da Stami e Tepali di *Crocus Sativus*

Il profilo fenolico delle infusioni di stami (S) e tepali (T) preparate utilizzando i metodi di estrazione bollita (B) e fredda (C) è stato valutato attraverso un approccio metabolomico non mirato seguito da statistiche multivariate. Sono stati annotati putativamente un totale di 464 composti fenolici, ovvero 257 flavonoidi (cioè 69 antociani, 66 flavonoli, 29 flavan-3-oli e 93 altri flavonoidi), 95 acidi fenolici (di cui 67 erano acidi idrossicinnamici), 76 fenoli a basso peso molecolare (LMW), 29 lignani e 7 stilbeni.

I risultati semiquantitativi sono presentati nella *Tabella 12*.

Classe equivalenti (mg/g DM)	TF	TB	SF	SB	Significatività
Antociani	13.03 ± 0.43 ^a	9.47 ± 3.1 ^a	2.61 ± 0.44 ^b	3.20 ± 0.55 ^b	**
Flavoni	5.79 ± 0.80 ^a	8.72 ± 2.14 ^a	2.00 ± 0.23 ^b	2.62 ± 0.62 ^b	**
Flavonoli	6.14 ± 0.57 ^a	8.78 ± 3.09 ^a	2.70 ± 0.06 ^b	2.40 ± 0.31 ^b	**
Flavon-3-oli	0.90 ± 0.28	0.63 ± 0.08	0.60 ± 0.16	0.87 ± 0.06	ns
Acidi fenolici	3.14 ± 0.46	2.62 ± 0.32	2.21 ± 0.37	2.50 ± 0.22	ns
Lignani	15.58 ± 1.37 ^a	11.30 ± 2.71 ^b	5.06 ± 0.55 ^c	10.14 ± 1.11 ^b	*
Altri fenoli (LMW)	16.04 ± 1.68 ^a	14.01 ± 1.28 ^a	21.97 ± 1.82 ^b	30.27 ± 2.37 ^c	**
Stilbeni	1.26 ± 0.24	2.21 ± 0.11	1.47 ± 0.42	1.99 ± 0.41	ns
Fenoli totali	61.9	57.7	38.6	54.0	

Tabella 12: Quantificazione per classi/sottoclassi di composti fenolici identificati dai dati *UHPLC-QTOF-MS* per le diverse infusioni di Stami (**S**) o Tepali (**T**) preparate tramite bollizione (**B**) e freddi (**F**). I risultati sono espressi come valori medi (mg/g DM) ± DS, n=12. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra le diverse infusioni per ciascuna classe (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey. *p <0,05, **p<0,0001). LMW= Peso Molecolare Inferiore.

I contenuti fenolici cumulativi variavano da 38,6 (per le infusioni fredde di stami) fino a 61,9 (per le infusioni fredde di tepali) mg Eq. /g DM. Le infusioni di tepali hanno mostrato un contenuto fenolico più elevato rispetto alle infusioni di stami quando si considerano entrambi i metodi di estrazione. Il profilo fenolico delle infusioni di tepali è rappresentato principalmente da flavonoidi, con gli antociani come sottoclasse più abbondante (cioè, 13,03 e 9,47 mg Eq. /g DM rispettivamente per TC e TB). In particolare, gli antociani, i flavonoli e altri flavonoidi erano significativamente ($p < 0,0001$) più alti nelle infusioni di tepali rispetto alle infusioni di stami, senza differenze tra l'infusione fredda e quella bollita. Al contrario, i fenoli a basso peso molecolare erano significativamente ($p < 0,0001$) più alti nelle infusioni di stami, essendo la classe più abbondante, con le infusioni di stami bollite che mostravano il valore più alto (30,27 mg Eq. /g DM). Considerando che le infusioni di tepali hanno mostrato i contenuti fenolici più elevati, sono state rilevate solo lievi differenze dall'analisi semi quantitativa tra il metodo di infusione a freddo e bollito (cioè, lignani significativamente più alti in TC che in TB; $p < 0,05$). Inoltre, le infusioni di stami preparate utilizzando il metodo bollito hanno determinato un contenuto fenolico cumulativo più elevato rispetto alle infusioni di stami fredde, con una quantità significativamente maggiore di fenoli LMW e lignani (30,27 e 10,14 mg Eq. /g DM rispettivamente).

Questa analisi dimostra che nei tepali le infusioni a freddo sono caratterizzate dal più alto contenuto di polifenoli totali (61,9 mg/g DM) seguito dalle infusioni bollite (57,7 mg/g DM). Negli stami le infusioni a freddo mostrano un contenuto di polifenoli totale più basso (38,6 mg/g DM) rispetto alle infusioni bollite (54,0 mg/g DM) e a tutte le infusioni di tepali.

Inoltre, sono state studiate anche differenze e somiglianze tra infusioni di tepali e stami attraverso un modello basato sulla proiezione ortogonale multivariata (OPLS-DA). Il grafico a dispersione OPLS-DA (*Fig. 23*) ha mostrato chiare differenze tra le infusioni di tepali e stami, indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato. Inoltre, questo modello ha permesso di discriminare tra i metodi di bollitura e a freddo, e questo era vero principalmente quando si consideravano le infusioni di tepali (sul lato sinistro del grafico del punteggio).

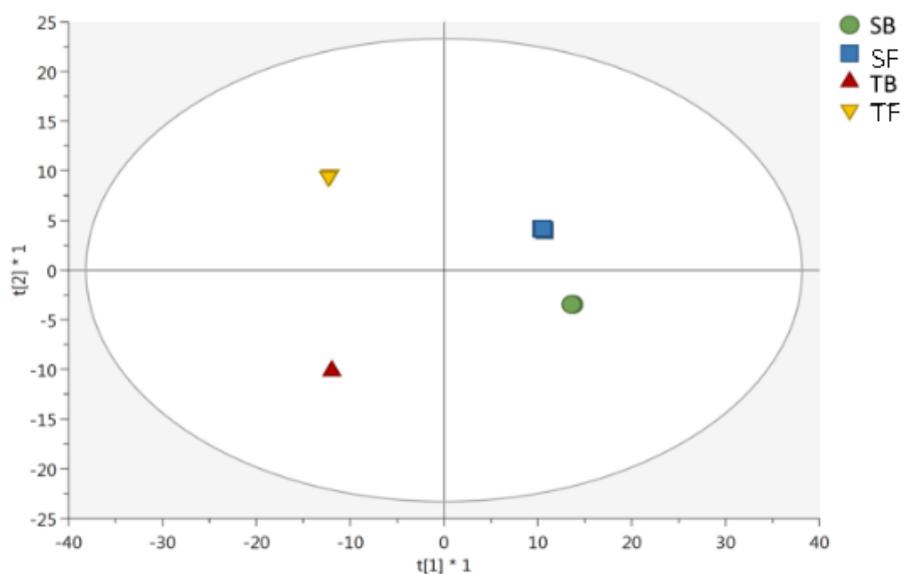


Figura 23: Grafico a dispersione del punteggio OPLS-DA ottenuto considerando diverse condizioni d'infusione quali a freddo (**F**) e bollite (**B**) di stami (**S**) e tepali (**T**).

A questo proposito, VIP (variable importance in projection) è stato utilizzato per rappresentare i composti più discriminanti (punteggio $VIP > 1$) in base al confronto tra estrazione "bollita" e "fredda" per infusioni di stami e tepali. Questi composti marcatori sono riportati in *Tabella 13* con i rispettivi punteggi VIP e valori LogFC.

Composti discriminanti	VIP score	Log FC (SB) vs [SC]	Log FC ([TB] vs [TC])
5-Pentadecilresorcinolo	1.367±0.37	-19.79456	-17.714813
p-HPEA-EDA	1.324±0.35	-2.6558545	-17.7464555
Estere etilico di acido siringico/acido gallico	1.311±0.39	-1.4323761	-0.23338254
Ciclolariciresinolo/Lariciresinolo	1.311±0.22	-0.15350914	-1.3988203
Isorhamnetina 7-O- ramnoside/Isorhamnetina 3-O- glucoside	1.289±0.28	-0.3044084	-2.3518562
1.2-Disinapoilgentiobiosio	1.283±0.28	-0.26936468	-4.2308106
Acido 4-idrossibenzoico 4-O- glucoside	1.277±0.48	-0.6463814	0.3954754
Acido gallico 4-O-glucoside	1.276±0.66	19.299711	1.5979487
3.4-diidrossifenilglicole	1.275±0.49	-1.184454	4.457534
5-pentacosenilresorcinolo	1.261±0.30	-0.31335515	17.653387
Narirutina 4'-O-glucoside	1.256±0.57	-4.732991	3.236229
Cianidina 3-O- rutinoside/Petunidinia 3-O- rutinoside/Perlargonina 3-O- soforoside	1.236±0.58	-0.58624524	1.7878399
Naringin 6'-malonato	1.215±0.26	-1.1336925	1.166565

Sinapaldeide/estere etilico dell'acido caffeico	1.194±0.47	1.7456863	3.6535127
Pinoresinolo/Matairesinolo	1.187±0.35	1.4250481	-0.89308923
Ligstroside-aglicone/p-HPEA-EA	1.172±0.72	1.8890647	-0.605299
Petunidina 3-O-(6''-acetil-galattoside)	1.157±0.34	0.31807837	-18.275528
Epirosmanolo	1.142±0.19	1.062153	0.1044153
Cinnamoil glucosio	1.128±0.99	-1.002079	2.08822
6''-O-Malonilglicitina	1.126±0.49	-0.21975008	0.89181834
Miricetina 3-O-glucoside	1.101±0.61	-1.674497	-0.020930609
Isomeri dell'acido deidroiferulico	1.093±0.33	-0.80158484	0.59438
24-Metillatosterolo ferulato	1.081±0.19	-16.919323	0.5947418
Acido 3/4/5-feruloilchinico	1.076±0.59	-1.242829	1.8989443
Acido idrossicaffeico	1.072±0.24	-2.5020726	-0.41835785
Acido gallico 3-O-gallato	1.072±0.73	-11.1263685	4.199571
Neodiosmina/Diosmina	1.061±1.35	-0.3492705	3.4729855
Ligstroside	1.055±0.32	0.20288408	-0.5476138
Crisoeriolo 7-O-(6''-malonil-glucoside)	1.049±0.45	17.332327	-0.06485176
Pigmento A/Peonidina 3-O-(6'' - p-cumaroil-glucoside)	1.039±0.79	-1.4932165	1.1594346

Trimerico di prodelfidinia GC-GC-C	1.034±0.27	7.9547105	-1.0685892
Quercetina 3-O-glucoside	1.028±0.19	-1.9295704	-0.1923542
(+) -Gallocatechina 3-O-gallato/ (-) - Epigallocatechina 3-O-gallato	1.015±0.31	17.46068	-0.053878784

Tabella 13: La tabella riporta i composti fenolici discriminanti in base al confronto tra infusione a freddo (**F**) e bollitura (**B**) di Stami (**S**) e Tepali (**T**). I composti sono stati identificati dall'approccio VIP (importanza della variabile nella proiezione) a seguito dell'analisi discriminante OPLS-DA e forniti assieme ai punteggi VIP (misura dell'importanza della variabile nel modello OPLS-DA) e ai valori LogFC (ottenuti dall'analisi FoldChange).

Nel dettaglio, 33 polifenoli sono stati annotati come i composti più discriminanti, essendo principalmente flavonoidi e acidi fenolici. Nonostante ciò, il 5 pentadecilresorcinolo, un alchilfenolo, ha mostrato il punteggio VIP più alto (1.367) mostrando un forte accumulo per il confronto "bollito" vs "freddo" sia per gli stami (LogFC = -19,79) che per i tepali (LogFC = -17,71). Un leggero accumulo è stato registrato anche per altri composti discriminanti con un punteggio VIP > 1,3, vale a dire p-HPEA-EDA, etil estere acido sirringico/acido sallico e ciclolariciresinolo/lariciresinolo. L'acido gallico 4-O-glucoside, il crisoeriolo 7-O-(6"-malonil-glucoside) e (+) gallocatechina 3-O-

gallato sono stati fortemente accumulati nel confronto SB vs SC, mentre 24-metillatosterolo ferulato e l'acido gallico 3-O-gallato era significativamente down-accumulato. Quando si considera il confronto TB vs TC, il composto più accumulato era il 5-pentacosenilresorcinolo (LogFC = 17,65), mentre la petunidina 3-O- (6"-acetil-galattoside) era meno accumulata (LogFC = -18, 28). Infine, è stata valutata anche la possibile correlazione tra il profilo fenolico delle infusioni ed i saggi antiossidanti *in vitro* attraverso un'analisi di Pearson. I coefficienti di Pearson hanno rivelato una correlazione significativa ($p < 0,05$; $p < 0,01$) e positiva tra alcune classi/sottoclassi di composti, vale a dire antociani, flavoni (altri flavonoidi), flavonoli e lignani, e i saggi antiossidanti *in vitro* (es. ORAC, DPPH, FRAP), rivelando così il loro contributo alla capacità antiossidante dei campioni. I coefficienti di correlazione più elevati sono stati registrati per gli antociani, che erano fortemente correlati con i test ORAC (0,896; $p < 0,01$), DPPH (0,929; $p < 0,01$) e in particolare con i saggi FRAP (0,936; $p < 0,01$). Nonostante ciò, è stata evidenziata una correlazione negativa tra i fenoli LMW e i dosaggi ORAC (-0.867; $p < 0,01$), DPPH (-0.839; $p < 0,01$) e FRAP (-0.864; $p < 0,01$) (Tab.14).

	TPC	TFC	ORAC	DPPH	FRAP
Antocianine	0.899**	0.909**	0.896**	0.929**	0.936**
Flavoni	0.727**	0.675*	0.813**	0.760**	0.810**
Flavonoli	0.727**	0.697*	0.799**	0.741**	0.796**
Flavanoli	NS	NS	NS	NS	NS
Acidi fenolici	NS	NS	NS	NS	0.599*
Lignani	0.694*	0.786**	0.646*	0.748**	0.707*
Altri fenoli (LMW)	-0.868**	-0.779**	-0.867**	-0.839**	-0.864**
Stilbeni	NS	NS	NS	NS	NS
TPC	1	0.924**	0.952**	0.978**	0.963**
TFC	0.924**	1	0.895**	0.936**	0.934**
ORAC	0.952**	0.895**	1	0.953**	0.985**
DPPH	0.978**	0.936**	0.953**	1	0.972**
FRAP	0.963**	0.934**	0.985**	0.972**	1

Tabella 14: Coefficiente di correlazione di Pearson tra polifenoli (TPC: contenuto totale di polifenoli e TFC: contenuto totale di flavonoidi) e attività antiossidante (ORAC, DPPH, FRAP). *p<0,05, **p<0,01.

4.4 Confronto dei livelli di polifenoli totali e proprietà antiossidanti tra gli infusi ottenuti da parti floreali di *Crocus sativus* e Rooibos e tè nero

Il contenuto totale di polifenoli (TPC) e la capacità antiossidante di infusi preparati con tepali e stami e stimmi di *Crocus sativus*, sono stati confrontati con quelli di Rooibos (*Aspalthus linearis*) e tè nero (*Camellia sinensis*). Tutti gli infusi sono stati preparati con metodo di infusione a caldo (C) ovvero versando acqua bollente sulle parti della pianta e lasciando in infusione per 5 minuti a temperatura ambiente prima di filtrare.

I risultati ottenuti sono mostrati in *Fig. 24*. Dalla *figura 24 A* si può notare che gli infusi preparati con stami e tepali di *C. sativus* possiedono un contenuto di polifenoli totali (TPC) significativamente più elevato rispetto agli infusi a base di stimmi. Inoltre possiedono un TPC simile a quello di Rooibos e tè nero. Un andamento simile è stato osservato con il saggio ORAC utilizzato per la determinazione della capacità antiossidante dove le infusioni a base di stami e tepali di *C. sativus* hanno mostrato una maggiore capacità antiossidante rispetto al Rooibos e al tè nero (*Fig 24 B*).

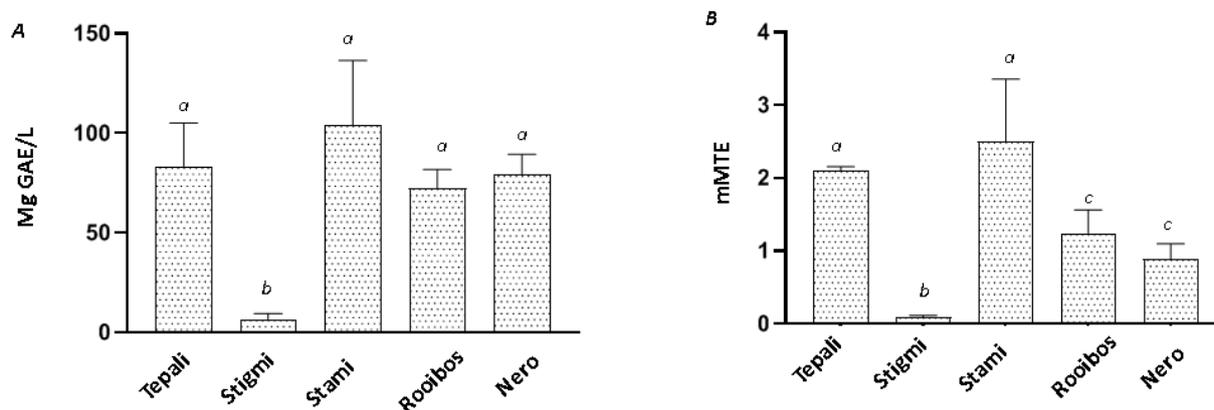


Figura 24: **A)** Livelli totali di polifenoli, **B)** Capacità antiossidante totale (ORAC Assay) di infusi di Tepali, Stigmi, Stami, Rooibos e Tè nero preparati con il metodo dell'estrazione a caldo. I dati sono espressi come media \pm SD, n = 6. Lettere diverse indicano differenze statistiche tra i campioni (test di confronto multiplo post-hoc di Tukey, $p < 0,05$).

4.5 Analisi sensoriale

È stata condotta un'analisi sensoriale su alcuni volontari per testare le caratteristiche organolettiche delle infusioni di tepali di *C. sativus* preparate con metodo a caldo e a freddo. I grafici a ragnatela (spider plot) riportati in *fig. 25* mostrano i risultati ottenuti dall'analisi sensoriale con riferimento a: attributi olfattivi, visivi e gustativi (amaro, astringente, dolce e persistente) (*Fig. 25 A*) e attributi all' aroma suddivisi in: macro descrittori (Floreale, Speziato, Vegetale, Sottobosco, Fruttato) e micro descrittori (erba verde, verdure cotte, erbe, legnoso, terroso, minerale, frutti di bosco, agrumi, frutti tropicali, frutta secca frutta) (*Fig. 25 B*).

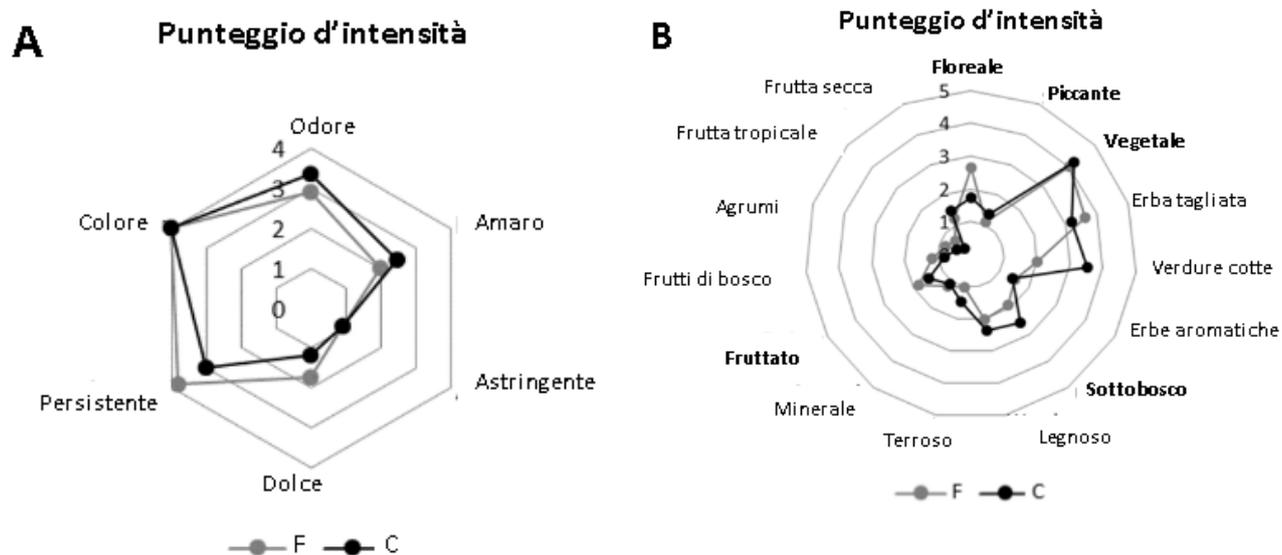


Figura 25: Spider plot raffiguranti i profili sensoriali delle infusioni a caldo e a freddo dei tepali. **(A)** Odore, gusto e attributi visivi (amaro, astringente, dolce, persistenza, colore). **(B)** Attributi dell'aroma: i macro descrittori sono in grassetto, mentre i micro descrittori sono in caratteri semplici.

Nel grafico **A** si può osservare che entrambe le tipologie di infusioni sono state percepite come un po' amare, leggermente dolci e quasi privi di astringenza. La sensazione di persistenza in bocca degli infusi freddi era maggiore rispetto a quelli caldi. L'odore è stato valutato come piuttosto intenso sia per le infusioni a caldo che a freddo e infine si è osservata la stessa tonalità di colore per entrambe le infusioni.

Per quanto riguarda gli attributi all'aroma, nel grafico **B** possiamo notare che l'attributo predominante è quello vegetale e in particolare erba tagliata e un aroma più forte di verdure cotte è stato percepito nelle infusioni calde. È stato identificato anche un aroma un po' legnoso e di sottobosco soprattutto nelle infusioni calde. Tutte le altre note erano meno intense e appena percepite.

In termini di gusto è stata maggiormente apprezzata l'infusione a freddo in quanto definita come una bevanda rinfrescante, molto piacevole e con un tipico sentore floreale.

5 Conclusioni

Tepali e Stami sono i principali bioresidui floreali che si ottengono nel processo di produzione dello zafferano (*Crocus sativus* L.). I pochi studi rivolti a queste parti floreali, hanno rilevato un notevole contenuto di composti bioattivi, come i polifenoli [117]. Studi precedenti hanno evidenziato che i principali polifenoli presenti nei tepali sono rappresentati dai flavonoli e dagli antociani, questi ultimi responsabili della loro tipica colorazione violacea. La componente fenolica degli stami è rappresentata dai flavonoli e flavanoni ma presenti in quantità inferiori rispetto ai tepali. Questi composti bioattivi conferiscono agli stami e ai tepali una varietà di proprietà biologiche, incluse proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie [3] e antimicrobiche [81].

Gli estratti di Tepali hanno anche dimostrato di possedere diverse attività biologiche [8] inclusa l'attività antiossidante [9] [4] [10] [11] [12] [13] e proprietà antidiabetiche [3] [118]. Studi *in vivo* hanno riportato che i tepali somministrati mediante sonda gastrica (20 mg/kg di peso corporeo per 6 giorni) hanno effetti epatoprotettivi nei ratti [14], mentre nell'uomo è stata osservata un'attività antidepressiva (30 mg/giorno) [15]. Gli stami e il perianzio hanno mostrato importanti attività antimicotiche, citotossiche e antiossidanti [13].

L'obiettivo della ricerca condotta nella presente tesi è stato investigare la composizione polifenolica e la capacità antiossidante di infusi di Tepali e Stami di *Crocus sativus* preparati con diverse condizioni di estrazione: a caldo (C), a freddo (F), a temperatura ambiente (TA) e bollito (B).

I risultati hanno dimostrato che gli infusi di tepali possiedono un contenuto di polifenoli totali (TPC) e flavonoidi (TFC) molto più elevato rispetto alle infusioni di stami indipendentemente dalla condizione di estrazione. Nelle infusioni di stami, le diverse preparazioni non hanno influenzato in modo significativo il TPC e TFC, al contrario delle infusioni di tepali che hanno mostrato valori significativamente più elevati soprattutto per gli infusi preparati con bollitura e a freddo che hanno mostrato un contenuto di polifenoli totali pari a *186 mgGAE/L* e *186 mgGAE/L* rispettivamente e flavonoidi pari a *89 mgCE/L* e *91 mgCE/L* rispettivamente.

Come già riferito la presenza di questi composti attribuisce agli infusi di stami e tepali importanti proprietà antiossidanti. La valutazione del potenziale antiossidante totale dei diversi infusi è stata valutata mediante tre saggi *in vitro*: *ORAC* (Oxygen Radical Absorbance Capacity), *DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e *FRAP* (Ferric ion reducing antioxidant power).

Il saggio **ORAC** è uno dei metodi più utilizzati per valutare l'attività antiossidante di un campione. Permette di misurare la capacità di una sostanza

antiossidante di inibire la degradazione ossidativa di una molecola fluorescente provocata da radicali perossilici per trasferimento di un atomo di idrogeno (HAT). I risultati ottenuti hanno mostrato che sia le infusioni di stami che le infusioni di tepali possiedono capacità antiossidante, che risulta però maggiore nelle infusioni di tepali, soprattutto quelle preparate con bollitura e a freddo.

Il saggio **DPPH** valuta la capacità delle molecole antiossidanti presenti in un campione di neutralizzare il radicale azotato DPPH (difetil-picrilidrazile) secondo la tipologia HAT, ovvero l'inibizione dell'attività ossidante del radicale tramite cessione di un atomo di idrogeno (H). Anche in questo caso le infusioni di tepali hanno mostrato una capacità antiossidante più elevata rispetto agli infusi di stami, indipendentemente dal tipo di estrazione. La più alta capacità antiossidante è stata riscontrata nelle infusioni fredde dei tepali.

Infine il saggio **FRAP** valuta la capacità dei vari composti antiossidanti presenti in un campione di convertire, per trasferimento elettronico (ET), il complesso ossidato Fe^{3+} -(TPTZ)₂ (complesso Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-s-triazina) nella sua forma ridotta Fe^{3+} -(TPTZ)₂ (Fe^{2+} - 2,4,6-tripiridil-s-triazina) ad un pH di 3.6. Da questo saggio è emerso che, sia le infusioni di stami che di tepali, preparate con metodo tradizionale (C) sono sempre statisticamente meno potenti in termini di capacità antiossidante rispetto a quelle preparate con le altre tre condizioni di estrazione. Tuttavia le infusioni di tepali dimostrano

nuovamente una maggiore capacità antiossidante rispetto agli stami, e in particolare le infusioni fredde e bollite.

I risultati confermano le proprietà antiossidanti delle molecole contenute nelle infusioni di tepali e stami e dimostrano che tali proprietà sono maggiori nei tepali. Queste proprietà sono state associate al loro contenuto di polifenoli e alla capacità di questi di agire come agenti riducenti, donatori di idrogeno e quenchers di ossigeno singoletto. Infatti nei tepali sono presenti flavonoli, flavanoni, flavoni e antocianine che non sono abbondanti negli stami in cui si ritrovano esclusivamente flavonoli e flavanoni.

Il contenuto totale di polifenoli e la capacità antiossidante delle infusioni di stami e tepali di *Crocus sativus*, sono stati confrontati con quelli di stimmi (*Crocus sativus*), Rooibos (da *Aspalthus linearis*) e tè nero (da *Camellia sinensis*), tutti preparati utilizzando il metodo di infusione tradizionale a caldo. L'infuso preparato con gli stimmi ha mostrato un contenuto di polifenoli totale e capacità antiossidante più bassa rispetto alle infusioni di stami, tepali, Rooibos e tè nero. Inoltre gli infusi di tepali hanno mostrato un contenuto di polifenoli totale simile a quello dei Rooibos e tè nero, ma una capacità antiossidante maggiore.

Dal momento che le infusioni di tepali (a caldo e a freddo) hanno mostrato un maggior contenuto polifenolico e dunque una maggior capacità antiossidante,

queste sono state sottoposte ad un'analisi sensoriale *in vivo* eseguita su volontari per valutarne gli attributi olfattivi, visivi e gustativi (amaro, astringente, dolce e persistente) e gli attributi all'aroma. Nonostante sia più diffuso l'utilizzo dell'acqua calda nella preparazione degli infusi, l'infusione a freddo di tepali è stata maggiormente apprezzata in quanto definita una bevanda rinfrescante ideale per l'estate caratterizzata da un piacevole sentore erbaceo e floreale, un po' amaro, leggermente dolce, privo di astringenza e più leggero, dal momento che il materiale vegetale viene estratto molto più lentamente.

Inoltre i risultati hanno confermato che la composizione di questi infusi varia a seconda della specie vegetale ed è influenzata dalle modalità di infusione (tempo, temperatura) [19] [20] [21]. In studi precedenti, abbiamo dimostrato che le condizioni di preparazione degli infusi di *Camellia sinensis* (tè comune) e *Aspalathus linearis* (tè Rooibos) influenzano il contenuto di polifenoli e la capacità antiossidante *in vitro* e che gli infusi a freddo hanno mostrato un contenuto di polifenoli e capacità antiossidanti simili o superiori rispetto alla bevanda calda preparata tradizionalmente [20] [21].

In conclusione, i risultati ottenuti nel seguente lavoro hanno confermato che Tepali e Stami di *Crocus sativus*, sottoprodotti della lavorazione dello zafferano, sono una preziosa fonte di composti fenolici ad alto valore aggiunto e che le infusioni possono rappresentare un ottimo veicolo di sostanze bioattive.

In particolare, l'infuso freddo di Tepali può rappresentare una valida alternativa ai consumatori, grazie alla sua facilità di preparazione, al gusto fresco e al suo elevato contenuto di composti bioattivi.

Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse nell'utilizzo di infusioni a base di erbe come veicoli di sostanze bioattive. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno esplorato un'ampia gamma di tisane e hanno dimostrato proprietà antiossidanti e potenziali benefici clinici in condizioni croniche tra cui diabete, ipertensione, obesità [17] [16] e cancro [18].

I dati ottenuti possono contribuire alla valorizzazione dell'intera filiera dello zafferano coltivato nelle Marche e dei suoi sottoprodotti, aprendo prospettive per il recupero dei sottoprodotti, ora prodotto di scarto che potrebbero creare un nuovo mercato con applicazioni in ambito farmaceutico nonché in ambito cosmetico, fornendo nuove opportunità di mercato aumentando la competitività nel settore.

6 Riferimenti

- [1] R. Kumar, V. Singh, K. Devi, M. Sharma, M. K. Singh e P. S. Ahuja, «State of Art of Saffron (Crocus sativus L.) Agronomy: A Comprehensive Review,» *Food Reviews International*, p. 44–85, 01 Gennaio 2009.
- [2] E. Cusano, R. Consonni, E. A. Petrakis, K. Astraka, L. R. Cagliani e M. G. Polissiou, «Integrated analytical methodology to investigate bioactive compounds in Crocus sativus L. flowers,» *Phytochemical Analysis*, 06 Gennaio 2018.
- [3] L. Menghini, L. Leporini, G. Vecchiotti, M. Locatelli, S. Carradori, C. Ferrante, G. Zengin, L. Recinella, A. Chiavaroli, S. Leone, L. Brunetti e G. Orlando, «Crocus sativus L. stigmas and byproducts: Qualitative fingerprint, antioxidant potentials and enzyme inhibitory activities,» *Food Research International*, vol. 109, pp. 91-98, 2018.
- [4] P. Montoro, M. Maldini, L. Luciani, C. I. G. Tuberoso, F. Congiu e C. Pizza, «Radical Scavenging Activity and LC-MS Metabolic Profiling of Petals, Stamens and Flowers of Crocus sativus L,» *Journal of Food Science*, vol. 77, n. 8, 2012.
- [5] B. Senizza, G. Rocchetti, S. Ghisoni, M. Busconi, M. D. L. M. Pascual, J. A. Fernandez, L. Lucinia e M. Trevisan, «Identification of phenolic markers for saffron authenticity and origin: An,» *Food Research International*, 25 Luglio 2019.
- [6] C. I. Tuberoso, A. Rosa, P. Montoro, M. A. Fenu e C. Pizza, «Antioxidant activity, cytotoxic activity and metabolic profiling of juices obtained from saffron (Crocus sativus L.) floral by-products,» *Food Chemistry*, pp. 18-27, 26 novembre 2015.
- [7] S. Xu, X. Ge, S. Li, X. Guo, D. Dai e T. Yang., «Discrimination of Different Parts of Saffron by Metabolomic-Based Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with High Definition Mass Spectrometry,» *Chemistry & Biodiversity*, 2019.
- [8] N.M.-López, M. J. Bagur, C. Lorenzo, M. M-Navarro, M. R. Salinas e G. L. Alonso, «Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of Crocus sativus L. Flower,» *molecules*, 2 agosto 2019.

- [9] I. Lahmass, T. Lamkami, C. Delporte, S. Sikdar, P. V. Antwerpen, E. Saalaoui e V. Megalizzi, «The waste of saffron crop, a cheap source of bioactive compounds,» *Journal of Functional Foods*, pp. 341-351, 5 giugno 2017.
- [10] R. Sánchez-Vioque, M. Rodríguez-Conde, J. Reina-Urena, M. Escolano-Tercero, D. Herraiz-Penalver e O. Santana-Méridas, «In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.),» *Industrial Crops and Products*, pp. 149-153, 18 Febbraio 2012.
- [11] J. Serrano-Díaz, A. M. Sanchez, L. Maggi, M. Martínez-Tomè, L. García-Diz e M. A. Murcia, «Increasing the Applications of *Crocus sativus* Flowers as Natural Antioxidants,» *Journal of Food Science*, vol. 77, n. 11, pp. 1162-1168, 2012.
- [12] A. Termentzi e E. Kokkalou, «LC-DAD-MS (ESI+) Analysis and Antioxidant Capacity of *Crocus sativus* Petal Extracts,» *Planta Medica*, pp. 573-581, Aprile 2008.
- [13] C.-J. Zheng, L. Li, W.-H. Ma, T. Han e L.-P. Qin, «Chemical constituents and bioactivities of the liposoluble fraction from different medicinal parts of *Crocus sativus*,» *Pharmaceutical Biology*, p. 756–763, 03 Giugno 2011.
- [14] A. Omid, N. Riahinia, M. B. M. Torbati e M. Ali, «Hepatoprotective effect of *Crocus sativus* (saffron) petals extract against acetaminophen toxicity in male Wistar rats,» *Original Research Paper*, vol. 4, n. 5, pp. 330-336, 2014.
- [15] J. Mottaghipisheh, M. M. Sourestani, T. Kiss, A. Horváth, B. Tóth, M. Ayanmanesh, A. Khamushi e D. Csupor, «Comprehensive chemotaxonomic analysis of saffron crocus tepal and stamen samples, as raw materials with potential antidepressant activity,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18 Febbraio 2020.
- [16] F. S. Poswal, G. Russell, M. Mackonochie, E. MacLennan e E. C. Adukwu, «Herbal Teas and their Health Benefits: A Scoping Review,» *Plant Foods for Human Nutrition*, p. 266–276, 26 Ggiugno 2019.
- [17] A. Chandrasekara e F. Shahid, «Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk,» *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, pp. 451-458, 9 Agosto 2018.

- [18] W. H. Talib, I. A. Al-Ataby, A. I. Mahmud, S. Jawarneh, L. T. Al-Kury e I. H. AL-Yasar, «The Impact of Herbal Infusion Consumption on Oxidative Stress and Cancer: The Good, the Bad, the Misunderstood,» *molecules*, pp. 1-34, 14 settembre 2020.
- [19] S. Castiglioni, E. Damiani, P. Astolfi e P. Carloni, «Influence of steeping conditions (time, temperature, and particle size) on antioxidant properties and sensory attributes of some white and green teas,» *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 28 Maggio 2015.
- [20] E. Damiani, P. Carloni, G. Rocchetti, B. Senizza, L. Tiano, E. Joubert, D. Beer e L. Lucini, «Impact of Cold versus Hot Brewing on the Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Rooibos (*Aspalathus linearis*) Herbal Tea,» *Antioxidants*, 21 Ottobre 2019.
- [21] E. Venditti, T. Bacchetti, L. Tiano, P. Carloni, L. Greci e E. Damiani, «Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity?,» *Food Chemistry*, 16 Settembre 2009.
- [22] M. Zaccardelli, G. Roscigno, C. Pane, G. Celano, M. D. Matteo, M. Mainente, A. Vuotto, T. Mencherini, T. Esposito e A. E. D. Falco, «Essential oils and quality composts sourced by recycling vegetable residues from the aromatic plant supply chain,» *Industrial Crops & Products*, 19 gennaio 2021.
- [23] S. D. Fraia, N. Massarotti, M. Prati e L. Vanoli, «A new example of circular economy: Waste vegetable oil for cogeneration in wastewater treatment plants,» *Energy Conversion and Management*, 31 marzo 2020.
- [24] E. Pannucci, M. Clemente, R. Bernini e L. Santi, «Strategie di economia circolare applicate agli scarti della produzione primaria,» 6 marzo 2020. [Online]. Available: <https://agronotizie.imagelinenetwork.com/>.
- [25] «Regioni e ambiente,» 23 Luglio 2020. [Online]. Available: <https://www.regionieambiente.it/economia-circolare-11/>.
- [26] R. Mallamaci, R. Budriesi, M. L. Clodoveo, G. Biotti, M. Micucci, A. Ragusa, F. Curci, M. Muraglia, F. Corbo e C. Franchini, «Olive Tree in Circular Economy as a Source of Secondary Metabolites Active for Human and Animal Health Beyond Oxidative Stress and Inflammation,» *molecules*, 8 febbraio 2021.

- [27] D. A. Campos, R. Gómez-García, A. A. Vilas-Boas e A. R. Madureira, «Management of Fruit Industrial By-Products—A Case Study on Circular Economy Approach,» *molecules*, pp. 1-22, 13 gennaio 2020.
- [28] M. Ferri, M. Vannini, M. Ehrnell, L. Eliasson, E. Xanthakis, S. Monari, L. Sisti, P. Marchese, A. Celli e A. Tassoni, «From winery waste to bioactive compounds and new polymeric biocomposites: A contribution to the circular economy concept,» *Journal of Advanced Research*, pp. 1-11, 26 febbraio 2020.
- [29] A. Zabaniotou e P. Kamaterou, «Food waste valorization advocating Circular Bioeconomy - A critical review of potentialities and perspectives of spent coffee grounds biorefinery,» *Journal of Cleaner Production*, p. 1553e1566, 24 Novembre 2018.
- [30] E. Kakouri, D.-. Dafereraa, S. Paramithiotis, K. Astrakaa, E. H. Drosinos e M. G. Polissioua, «Crocus sativus L. tepals: The natural source of antioxidant and antimicrobial factors,» *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, pp. 66-74, 28 settembre 2016.
- [31] I. Mzabri, K. Charif, M. Rimani, N. Kouddane, A. Boukroute e A. Berrichi, «History, biology, and culture of Crocus sativus: Overview and perspectives,» *Arabian Journal of Chemical and Environmental Research*, vol. 08, n. 01, pp. 01-28, 11 dicembre 2020.
- [32] S. Sharafzadeh, «Saffron: A Concise Review of Researches,» *Advances in Environmental Biology*, pp. 1617-1621, 2011.
- [33] R. Landi, LO ZAFFERANO tradizione e tipicità, Pontassieve (FI): Ercoli e Lombardi, 2007.
- [34] L. Cardone, D. Castronuovo, M. Perniola, N. Cicco e V. Candido, «Saffron (Crocus sativus L.), the king of spices: An overview,» *Scientia Horticulturae*, 16 Giugno 2020.
- [35] A. Acciaro e A. Arrabito, «Lo zafferano,» Assessorato Agricoltura e foreste, Sicilia, 2010.
- [36] J. C. Koot, «Sativus.com,» [Online]. Available: www.sativus.com.
- [37] M. G. Caiola e A. Canini, «Looking for Saffron's (Crocus sativus L.) parents,» *Functional Plant Science and Biotechnology*, 15 maggio 2010.

- [38] M. Grazia, G. Fabio, L. Giovanni, S. Laura, R. Giuseppe, S. Andrea, V. Mariangela e F. Ferdinando, «Diffusione della coltura dello zafferano nel territorio ennese,» “La Moderna” Soc. Coop., Enna, 2008.
- [39] «Osservatorio Economico sullo Zafferano,» [Online]. Available: <https://www.zafferanoitaliano.it/>.
- [40] F. Loreto, «Zafferano di mare,» [Online]. Available: <https://www.zafferanodimare.it/>.
- [41] A. Giorgi, D. Pentimalli, L. Giupponi e S. Panseri, «Quality traits of saffron (*Crocus sativus* L.) produced in the Italian Alps,» *Open Agriculture*, pp. 52-57, 13 gennaio 2017.
- [42] G. Agostinucci, «Zafferano – *Crocus sativus* L.,» *Rivista di agraria.org*, n. 82, 1 giugno 2009.
- [43] J. Serrano-Diaz, A. M. Sánchez, M. Martínez-Tomé, P. Winterhalter e G. L. Alonso, «A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food,» *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 101-108, 27 Marzo 2013.
- [44] F. Gresta, G. Lombardo, L. Siracusa e G. Ruberto, «Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural,» *Agronomy for Sustainable Development*, 31 maggio 2007.
- [45] Progetto saffron, Il libro bianco: Zaffrano in Europa, problemi e strategie per valorizzare la qualità e migliorare la competitività, Sardegna: Agenzia Laore Sardegna, ERSAT, 2010.
- [46] G. Chichiricò, C. Ferrante, L. Menghini, L. Recinella, S. Leone, A. Chiavaroli, L. Brunetti, S. Simone, M. Ronci, P. Piccone, B. Lanza, S. Cesa, A. Pomab, G. Vecchiotti e G. Orlando, «*Crocus sativus* by-products as sources of bioactive extracts: Pharmacological and toxicological focus on anthers,» *Food and Chemical Toxicology*, pp. 7-14, 20 gennaio 2019.
- [47] «Giardinaggio.net,» 2021. [Online]. Available: <http://www.giardinaggio.net/>.
- [48] K. Zeka, K. C. Ruparelia, M. A. Continenza, D. Stagos, F. Vegliò e R. R. Arroo, «Petals of *Crocus sativus* L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol,» *Fitoterapia*, pp. 128-134, 23 maggio 2015.
- [49] M. Domenighini, «La coltivazione dello zafferano in Valle Camonica,» Università degli studi di Milano, 2013/2014.

- [50] P. Amirante, «Macchine ed impianti per la produzione dello zafferano,» 2019.
- [51] A. Lupini, «Zafferano di Sardegna, la Dop dopo secoli di storia,» *Italia a tavola*, 10 gennaio 2009.
- [52] A. Hosseini, B. Razavi e H. Hosseinzadeh, «Saffron (*Crocus sativus*) petal as a new pharmacological target: a,» *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15 luglio 2018.
- [53] P. Goupy, M. A. Vian, F. Chemat e C. Caris-Veyrat, «Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in,» *Industrial Crops and Products*, p. 495–510, 3 ottobre 2012.
- [54] L. Leila, K. Ahmad, H. Mirmanoochehr e G. Fereshteh, «Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals (*Crocus sativus*) along with its color properties and structural stability,» *journal of food and drug analysis*, pp. 210-218, 7 gennaio 2015.
- [55] C. Sun, S. H. Nile, Y. Zhang, L. Qin, H. R. El-Seedi, M. Daglia e G. Ka, «Novel Insight into Utilization of Flavonoid Glycosides and Biological Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.) Flower Byproducts,» *Agricultural and food chemistry*, 14 settembre 2020.
- [56] . R. Giacco, G. Fatati , D. Pistis, L. Frittitta, M. Parillo, G. Marelli, M. . I. Maiorino e C. Tubili, «Polifenoli: diabete mellito tipo 2 e fattori di rischio cardio-metabolico”,» *“Diabete e Nutrizione”*, 2019.
- [57] D. Vauzour, A. Rodriguez-Mateos, G. Corona e M. J. Oruna-Concha, «Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action,» *nutrients*, vol. 2, n. 2111106, pp. 1106-1131, 2010.
- [58] R. Tsao, «Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols,» *nutrients*, pp. 1231-1246, 10 dicembre 2010.
- [59] R. K. Singla, A. K. Dubey, A. Garg, R. K. Sharma, F. Marco, S. M. Ameen, M. A. Haddad e M. Al-Hiary, «Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures,» *Journal of AOAC International*, vol. 102, n. 5, p. 1397, 2019.
- [60] Y. Zhou, J. Zheng, Y. Li, D.-P. Xu, S. Li, Y.-M. Chen e H.-B. Li, «Natural Polyphenols for Prevention and Treatment,» *nutrients*, 22 agosto 2016.

- [61] F. Greco, «Composti fenolici,» 2014.
- [62] C. G. Fraga, K. D. Croft, D. O. Kennedy e F. A. Tomás-Barberán, «The effects of polyphenols and other bioactives on human health,» *food e function*, 2019.
- [63] R. Ornelio, «flavonoidi ed antrachinoni,» in *Chimica delle Sostanze Organiche Naturali*, 2016-2017, pp. 125-142.
- [64] A. N. Panche, A. D. Diwan e S. R. Chandra, «Flavonoids: an overview,» *JNS- JOURNAL OF NUTRITIONAL SCIENCE*, vol. 5, n. 47, pp. 1-15, 2016.
- [65] C. V. Chandrasekaran, M. A. Vijayalakshmi, K. Prakash, V. S. Bansal, J. Meenakshi e A. Amit, «Review Article: Herbal Approach for Obesity Management,» *American Journal of Plant Sciences*, pp. 1003-1014, 10 giugno 2012.
- [66] C. Lorena, V. Mircea, R. Octavia, C. V. Stefan, L. Andreea, N. Vasile, P. Mirela-G., D. V. I., A. Teodora-G., P. Ioana e D. Gabriela, «The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases,» *molecules*, 21 settembre 2020.
- [67] L. Ciumărnean, M. V. Milaciu, O. Runcan, S. C. Vesa, A. L. Răchis, V. Negrean, M.-G. Perné, V. I. Donca, T.-G. Alexescu, I. Para e G. Dogaru, «The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases,» *Molecules*, 21 Settembre 2020.
- [68] O. Mykhailenko, V. Kovalyov, O. Goryacha, L. Ivanauskas e V. Georgiyants, «Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review,» *Phytochemistry*, pp. 56-89, 15 febbraio 2019.
- [69] R. Nørbæk., K. Brandt, J. Nielsen, M. Ørgaard e N. Jacobsen, «Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation,» *Biochemical Systematics and Ecology*, p. 763–791, 28 novembre 2001.
- [70] J. Serrano-Díaz, A. M. Sanchez, M. Martínez-Tome, P. Winterhalter e G. L. Alonso, «Flavonoid Determination in the Quality Control of Floral Bioresidues from *Crocus sativus* L.,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, p. 8, 20 marzo 2014.
- [71] P. Vignolini, D. Heimler, P. Pinelli, F. Ieri, A. Sciullo e A. Romani, «Characterization of By-products of Saffron (*Crocus sativus* L.) Production,» *Natural Product Communications*, pp. 1959 - 1962, 31 ottobre 2008.

- [72] Meléndez-Martínez e A. J., «An Overview of Carotenoids, Apocarotenoids, and Vitamin A in Agro-Food, Nutrition, Health, and Disease,» *molecular nutrition*, pp. 1-11, 2019.
- [73] J. Y. Wang, P.-Y. Lin e S. Al-Babili, «On the biosynthesis and evolution of apocarotenoid plant growth regulators,» *Seminars in Cell & Developmental Biology*, pp. 3-11, 13 luglio 2020.
- [74] T. Chacón-Ordóñez,, R. Carle e R. Schweiggert, «Bioaccessibility of carotenoids from plant and animal foods,» *Science of Food and Agriculture*, 7 Dicembre 2018.
- [75] N. E. Moran, E. S. Mohn, N. Hason, J. W. Erdman e E. J. Johnson, «Intrinsic and Extrinsic Factors Impacting Absorption, Metabolism, and Health Effects of Dietary Carotenoids,» *Advances in Nutrition*, vol. 9, n. 4, p. 465–492, 2018.
- [76] Y. Sharoni, K. Linnewiel-Hermoni, M. Khanin, H. Salman e A. Veprik, «Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review,» *molecular nutrition and food research*, 15 settembre 2011.
- [77] A. Eroglu e H. E. Harrison, «Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids,» *Journal of Lipid Research*, vol. 54, 10 Maggio 2013.
- [78] A. Eroglu e E. H. Harrison, «Carotenoid metabolism in mammals, including man:formation, occurrence, and function of apocarotenoids,» *Journal of Lipid Researc*, vol. 54, 10 maggio 2013.
- [79] H. Hosseinzadeh e H. Younesi, «Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L.stigma and petal extracts in mice,» *Pharmacology*, pp. 1-8, 15 marzo 2002.
- [80] K. Zeka, P. Marrazzo, M. Micucci, K. C. Ruparelia, R. R. J. Arroo, G.Macchiarelli, S. A.Nottola, M. A.Continenza, A.Chiarini, C. Angeloni, S. Hrelia e R. Budriesi, «Activity of Antioxidants from *Crocus sativus* L. Petals: Potential Preventive Effects towards Cardiovascular System,» *Antioxidants*, pp. 1-8, 9 novembre 2020.
- [81] S. Zara, G. L. Petretto, A. Mannu, G. Zara, M. Budroni, I. Mannazzu, C. Multineddu, G. Pintore e F. Fancello, «Antimicrobial Activity and Chemical Characterization of a Non-Polar Extract of Saffron Stamens in Food Matrix,» *foods*, pp. 1-12, 26 marzo 2021.

- [82] M. N. Alam, N. J. Bristi e M. Rafiquzzaman, «Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity,» *Saudi Pharmaceutical Journal*, pp. 143-152, 1 Maggio 2012.
- [83] C. Enrique, «Basic mechanisms of antioxidant activity,» *BioFactors*, p. 391–397, 1997.
- [84] S. P. Wong, L. P. Leong e J. H. W. Koh, «Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants,» *Food Chemistry*, p. 775–783, 1 Agosto 2005.
- [85] I. Mzabr, M. Addi e A. Berrichi, «Traditional and Modern Uses of Saffron (*Crocus Sativus*)».
- [86] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro e D. J. Bobilya, «Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships,» *Journal of Nutritional Biochemistry*, p. 572–584, 1 maggio 2002.
- [87] S. Jadouali, H. Atifi, R. Mamouni, K. Majourhat, Z. Bouzoubaâ, A. Lanknifli e A. Faouzi, «Chemical characterization and antioxidant compounds of flower parts of Moroccan crocus sativus L.,» *ournal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 24 Marzo 2018.
- [88] H. Hausenblas, D. Saha, P. J. Dubyak e S. D. Anton, «Saffron (*Crocus sativus* L.) and major depressivedisorder: a meta-analysis of randomized clinical trials,» *Journal of Integrative Medicine*, vol. 11, n. 6, pp. 377-383, 2013.
- [89] E. Moshiri, A. A. Basti, A.-A. Noorbala, A.-H. Jamshidi, S. H. Abbasi e S. Akhondzadeh, «*Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial,» *Phytomedicine*, p. 607–611, 24 Agosto 2006.
- [90] A. A. Basti, E. Moshiri, A.-A. Noorbala, A.-H. Jamshidi, S. H. Abbasi e S. Akhondzadeh, «Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: A pilot double-blind randomized trial,» *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, p. 439–442, 8 novembre 2006.
- [91] J. P. Melnyk, S. Wang e M. F. Marccone, «Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron,» *Food Research International*, pp. 1981-1989, 29 Luglio 2010.

- [92] H. Hosseinzadeh, V. Motamedshariaty e F. Hadizadeh, «Antidepressant effect of keamperol, a constituent of saffron (*Crocus sativus*) petal, in mice and rats,» *Pharmacologyonline*, pp. 367-370, 2007.
- [93] V. Kumar, Z. A. Bhat, D. Kumar, N. A. Khan, I. A. Chashoo e M. Y. Shah, «Evaluation of anti-inflammatory potential of petal extracts of *Crocus sativus* “Cashmerianus”,» *International Journal of Phytopharmacology*, pp. 27-31, 2012.
- [94] D. V. Kuprash e S. A. Nedospasov, «Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation,» *Biochemistry*, vol. 81, n. 11, pp. 1237-1239, 2016.
- [95] T. Shahi, E. Assadpour e S. M. Jafari, «Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas,» *Trends in Food Science & Technology*, pp. 69-78, 5 novembre 2016.
- [96] R. Hoshyar, M. Hosseinian, M. R. Naghandar, M. Hemmati, A. Zarban, Z. Amini, M. Valavi, M. Z. Beyki e O. Mehrpour, «Anti-Dyslipidemic Properties of Saffron: Reduction in the Associated Risks of Atherosclerosis and Insulin Resistance,» 27 aprile 2016.
- [97] M. Fatehi, T. Rashidabady e Z. Fatehi-Hassanabad, «Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum,» *Journal of Ethnopharmacology*, pp. 199-203, 7 ottobre 2002.
- [98] L. P. Bechmann, R. A. Hannivoort, G. Gerken, G. S. Hotamisligil, M. Trauner e A. Canbay, «The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases,» *Journal of hepatology*, vol. 56, p. 952–964, 2012.
- [99] S. L. Arnaiz, S. Llesuy, J. C. Cutrin e A. Boveri, «oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver,» *Free Radical Biology & Medicine*, pp. 303-310, 27 gennaio 1995.
- [100] M. T. Olaleye e B. J. Rocha, «Acetaminophen-induced liver damage in mice: Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system,» *Experimental and Toxicologic Pathology*, p. 319–327, 8 ottobre 2007.

- [101] W. CHANDA, T. P. JOSEPH, X.-F. GUO, W.-D. WANG, M. LIU, M. VUAI, A. A. PADHIAR e M.-T. ZHONG, «Effectiveness of omega-3 polyunsaturated fatty acids against microbial pathogens,» *Journal of Zhejiang*, pp. 253-262, 10 Marzo 2018.
- [102] B. Fazeli-Nasab, «Evaluation of Antibacterial Activities of Hydroalcoholic Extract of Saffron Petals on Some Bacterial Pathogens,» *Journal of Medical Bacteriology*, pp. 8-20, 05 settembre 2019.
- [103] DiTNE Scarl; DARE Scarl, «Studio di Fattibilità per la Coltivazione di piante officinali e di un Opificio destinato alla loro trasformazione a integrazione di una Centrale Solare Termodinamica,» pp. 1-29, 07 febbraio 2018.
- [104] C. J. Etheridge e E. Derbyshire, «Herbal infusions and health,» *Nutrition & Food Science*, vol. 50, n. 5, pp. 969-985, 2020.
- [105] C. Fotakis, D. Tsigirmani, T. Tsiaka, D. Z. Lantzouraki, I. F. Strati, C. Makris, D. Tagkouli, C. Proestos, V. J. Sinanoglou e P. Zoumpoulakis, «Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions,» *Food Chemistry*, p. 963–971, 19 maggio 2016.
- [106] C. Rocha, A. Moura e L. Cunha, «Consumers' associations with herbal infusions and home preparation,» *Food Quality and Preference*, 19 giugno 2020.
- [107] V. d. C. Rodrigues, M. V. d. Silva, A. R. d. Santos, A. A. F. Zielinski e C. W. I. Haminiuk, «Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas,» *International Journal of Food Science and Technology*, p. 2038–2045, 30 Aprile 2015.
- [108] E. Damiani, T. Bacchetti, L. Padella, L. Tiano e P. Carloni, «Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions,» *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 59-66, 25 settembre 2013.
- [109] C. Morresi, L. Cianfruglia, T. Armeni, F. Mancini, G. C. Tenore, E. D'Urso, A. Micheletti, G. Ferretti e T. Bacchetti, «Polyphenolic compounds and nutraceutical properties of old and new apple cultivars,» *food biochemistry*, 20 luglio 2018.
- [110] A. Pełal e K. Pyrzyńska, «Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid,» *Food Analytical Methods*, p. 1776–1782, 11 febbraio 2014.

- [111] K. M. Gillespie, J. M. Chae e E. A. Ainsworth, «Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants,» *nature protocol*, p. 867–870, 12 Aprile 2007.
- [112] S. C. T. Nicklisch e J. HerbertWaite, «Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins,» *MethodsX*, pp. 233-238, 22 ottobre 2014.
- [113] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier e C. Berset, «Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity,» *LWT Food Science and Technology*, pp. 25-30, 28 giugno 1994.
- [114] F. F. Benzie e J. J. Strain, «The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay,» *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, n. 0293, p. 70–76, 23 gennaio 1996.
- [115] F. Tomasina, C. Carabio, L. Celano e L. Thomson, «Analysis of Two Methods to Evaluate Antioxidants,» *Laboratory Exercises*, p. 266–270, 7 maggio 2012.
- [116] R. L. Prior, X. Wu e K. Schaich, «Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements,» *Agricultural Food Chemistry*, vol. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.
- [117] M. Caser, S. Demasi, S. Stelluti, D. Donno e V. Scariot, «Crocus sativus L. Cultivation in Alpine Environments: Stigmas and Tepals as Source of Bioactive Compounds,» *agronomy*, 25 settembre 2020.
- [118] A. F. Wali, J. R. Pillai, Y. A. Dhaheri, M. Rehman, A. Shoaib, O. Sarheed, S. Jabnoun, M. Razmpoor, S. Rasool, B. A. Paray e P. Ahmad, «Crocus sativus L. Extract Containing Polyphenols Modulates Oxidative Stress and Inflammatory Response against Anti-Tuberculosis Drugs-Induced Liver Injury,» *Plants*, 30 Gennaio 2020.
- [119] L. Ferrari, «Zafferano: confronto tra diverse tecniche di coltivazione in Italia e all'estero,» Torino, 2017/2018.
- [120] T. Ardalan, P. Ardalan e M. M. Heravi, «Kinetic Study of Free Radicals Scavenging by Saffron Petal Extracts,» *Journal of Chemical Health Risk*, vol. 2, n. 4, pp. 29-36, 2012.

- [121] D. Villano, M. S. Fernandez-Pachòn, M. L. Moya', A. M. Troncoso e M. C. Garcia-Parrilla, «Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical,» *Talanta*, p. 230–235, 23 marzo 2007.
- [122] P. Arulselvan, M. T. Fard, W. S. Tan, S. Gothai, S.Fakurazi, M. E. Norhaizan e S. S. Kumar, «Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation,» *Hindaw*, p. 15, 7 settembre 2016.