



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica

# **Frazionamento e caratterizzazione di polisaccaridi da *Punica granatum* L.**

# **Fractionation and characterization of polysaccharides from *Punica granatum* L.**

**Relatore**

Prof. Pierandrea Lo Nostro

**Correlatori**

Prof.ssa Nadia Mulinacci; Dr. Lorenzo Cecchi

**Candidato**

Mauro Massi

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUZIONE</b>  | <b>4</b>  |
| 1.1. Classificazione del melograno                            | 4         |
| 1.2. Il melograno fra storia e leggenda                       | 5         |
| 1.3. Il melograno: aspetti botanici ed agronomici             | 12        |
| 1.4. Componenti bioattive del melograno                       | 18        |
| 1.5. Usi del melograno  | 24        |
| 1.5.1. Applicazioni mediche                                   | 24        |
| 1.6. I polisaccaridi  | 27        |
| 1.6.1. Amido  | 27        |
| 1.6.2. Cellulosa ed emicellulosa                              | 30        |
| 1.6.3. Pectine  | 32        |
| 1.6.4. Polisaccaridi nel melograno                            | 38        |
| <b>2. OBIETTIVI</b>   | <b>39</b> |
| <b>3. PARTE SPERIMENTALE</b>                                  | <b>41</b> |
| 3.1. Standard e reagenti                                      | 41        |
| 3.2. Estrazione dei polisaccaridi                             | 43        |
| 3.3. Frazionamento dei polisaccaridi                          | 47        |
| 3.4. Analisi strumentali                                      | 50        |
| 3.4.1. Analisi <sup>1</sup> H-NMR                             | 50        |
| 3.4.2. Size Exclusion Chromatography (SEC)                    | 52        |
| 3.4.3. Cromatografia di scambio ionico (IEC)                  | 52        |
| <b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>                             | <b>55</b> |
| 4.1. Risultati preliminari e premessa                         | 55        |
| 4.2. Ottenimento dei polisaccaridi grezzi (CPS) dal mesocarpo | 59        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.3. Frazionamento dei polisaccaridi</b>                | <b>60</b> |
| <b>4.4. SEC (size exclusion chromatography)</b>            | <b>64</b> |
| <b>4.5. IEC</b>  | <b>70</b> |
| <b>4.6. <sup>1</sup>H-NMR (nuclear magnetic resonance)</b> | <b>70</b> |
| <b>5. CONCLUSIONI</b>                                      | <b>83</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA</b>                                     | <b>86</b> |

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. Classificazione del melograno



**Nome botanico:** *Punica granatum*

**Regno:** *Plantae*

**Divisione:** *Magnoliophyta*

**Classe:** *Magnoliopsida*

**Ordine:** *Myrtales*

**Famiglia:** *Punicaceae*

**Ingl:** *Pomegranate*

**Ted:** *Granatapfelbaum*

**Arab:** رمان

## 1.2. Il melograno fra storia e leggenda

Il melograno (*Punica granatum* L., puniceae) è una pianta antica. Il termine “melograno” deriva dal nome latino del frutto *malum granatum*, che significa mela granulosa. L’aggettivo *punica*, che accompagna il nome *granatum*, si riferisce a Pheonicia (Cartagine), in riferimento alla sua presunta origine: fu, infatti, Plinio il Vecchio, storico naturalista del I secolo d.C. a modificare il nome in *malum punica*, in quanto i romani nel 146 a.C., giungendo in Africa per conquistare Cartagine, videro grandi quantità di colture di questo frutto, immaginando erroneamente che esso fosse originario di quelle terre (Holland et al., 2009).

La coltura del melograno è sempre stata limitata ed è sempre stato considerato un raccolto minore, sebbene nel novero dei *fruttiferi minori* esso rappresenta uno di quelli per cui nell’ultimo decennio si è assistito a un rinnovato interesse culturale, commerciale e scientifico (Bellini et al., 2010).

Il melograno è considerato nativo dell’Asia centrale e in particolar modo di un’area compresa tra l’Iran, il Turkmenistan e l’India settentrionale, sebbene, data l’alta adattabilità di questa pianta a svariate condizioni climatiche e varietà di suoli, esso viene coltivato in differenti regioni geografiche, tra cui il bacino del Mediterraneo, l’Asia e la California (Holland et al., 2009).

Esistono molti riferimenti storici che citano il suo utilizzo sia in campo alimentare sia in merito allo sfruttamento delle sue potenzialità medicamentose. Recentemente l’interesse verso il melograno è cresciuto molto, sia per le caratteristiche gustative e salutistiche (per cui si ottengono succhi, grani freschi ed essiccati da mangiare, vino di melograno), sia per l’aspetto esteriore del frutto (sfruttato in ambito ornamentale), sia, infine, per ricavarne prodotti cosmetici e farmaceutici (Bellini et al., 2010).

Il melograno è stato elemento caratterizzante differenti culture nel corso dei secoli, quindi, sebbene non esistano in letteratura molte informazioni a suo riguardo, la storia delle sue origini e diffusione appare lunga e affascinante (Still, 2006).

Sembra che la storia del melograno abbia avuto origine agli inizi del Neolitico, circa 12.000 anni fa, un periodo contraddistinto da innovazioni nella litotecnica, e dall’introduzione dell’uso della ceramica, dell’allevamento e soprattutto dell’agricoltura. È proprio nel contesto delle innovazioni in agricoltura che, in questo periodo storico che va dal 6000 a.C. al 2000 a.C., si assiste, in molte aree geografiche, all’avvio della coltivazione del melograno che fino a quel momento esisteva solamente

allo stato selvatico. Varie fonti collocano in momenti diversi di questo lungo periodo l'inizio della coltivazione del melograno in località geografiche associate a determinate culture e civiltà. In ogni caso, nella prima fase vi fu un processo di selezione probabilmente piuttosto lento. I principali cambiamenti legati alle specie coltivate riguardarono le dimensioni e la qualità del frutto, mentre per quanto riguarda le varietà selvatiche, vi furono variazioni abbastanza limitate. Dopo questa fase il melograno si diffuse rapidamente nel mondo antico (Chandra et al., 2010).

I Sumeri, considerati insieme a quella dell'Antico Egitto la prima civiltà urbana, durante la loro migrazione dai monti Zagros avvenuta intorno al 3500 a.C., portarono il raccolto di melograno selvatico nella zona della bassa Mesopotamia, alla confluenza fra Tigri ed Eufrate. La comparsa della coltivazione, invece, è datata durante la terza dinastia di Ur, intorno al 2000 a.C. In ogni caso, fonti di letteratura fanno risalire i primi ritrovamenti a Jericho, l'attuale Israele, risalenti al 6000-5000 a.C. Rimane comunque certo che sia stato addomesticato ripetutamente in vari periodi e diverse zone geografiche (Chandra et al., 2010).

In Asia minore la coltivazione del melograno era presente intorno al 3500 a.C., mentre esistono diverse documentazioni che riportano che nel 1000 a.C. Cartagine riforniva Roma di grandi quantità di melograno. I Fenici diffusero la sua coltivazione nell'area del Mediterraneo fino a Cartagine dal 1000 a.C., in Spagna, in Grecia e in Italia dal 400 a.C. (Chandra R. et al., 2010).

È stimato che, nelle regioni dell'Asia centrale, la coltivazione del melograno iniziò intorno al 3000 a.C., in particolar modo nel sud del Turkmenistan, regione caratterizzata da un clima subtropicale, grazie all'avvento di regolari sistemi di irrigazione che sarebbero apparsi dal 4000 al 3000 a.C. (Chandra et al., 2010).

Durante l'età delle grandi scoperte geografiche (1600-1700 d.C.) e successivamente, potrebbe essere stato diffuso in aree subtropicali e tropicali del mondo (Levin 2006a).

Infine, l'arrivo del melograno in California è precedente alla sua inclusione agli Stati Uniti. Nel 1769 d.C. i missionari francescani dalla Spagna guidati da padre Junipero Serra, stabilirono centri Cristiani Cattolici Romani e diffusero la coltura del melograno nell'area costiera del sud e nord California (Seelig 1970; LaRue 1980; Morton 1987).

Sia il nome arabo del melograno (Rumman) che il nome ebraico (Rimmon) rimandano alla definizione di "frutto del paradiso", sintomo di quanto fosse apprezzato e considerato in queste culture. In forte contrasto, è invece stato ritenuto dai Greci come

il "frutto dei morti" ed è stato considerato da questa civiltà essere fonte di sostentamento per gli abitanti dell'Adè (Lansky et al., 2000).

L'Antico Testamento ne parla spesso sia come simbolo di ornamento sulle vesti dei sommi sacerdoti (Esodo; 28:33–34) sia come simbolo di amore - "Andiamo presto per i vigneti [...] e se i melograni sono in fiore [...] lì ti darò il mio amore "(Cantico dei Cantici 7,12). Si tratta di una delle sette specie dell'antico Israele, "un paese di frumento e orzo, di viti, di fichi e di melograni, terra di olio di oliva e miele" (Deuteronomio 8: 8). C'è addirittura chi è arrivato a sostenere che il frutto che ha portato alla cacciata dal giardino dell'Eden non fosse una mela, ma piuttosto un melograno, ma una recente revisione dei fatti ha escluso questa eventualità (McDonald, 2002).

Il fascino di questa pianta ha nel corso dei secoli conquistato varie culture, anche molto differenti tra di loro, nel corso dei secoli.

Il potente faraone Ramses IV fu sepolto con melograni, per assicurare il suo passaggio al mondo che l'attendeva dopo la morte (Kathib, 2015).

Associato alla Grande Madre, nel suo ruolo di Colei che dà la vita e Colei che la toglie, la melagrana era simbolo sia di fecondità sia di morte, tanto che sono stati trovati manufatti di argilla rappresentanti melegrane nelle tombe greche dell'Italia meridionale (Cattabiani, 1996)

Un'antica leggenda ellenica racconta che Dioniso, quando uscì dal rifugio che era stata la coscia del padre Zeus, venne catturato dai Titani, i quali, su suggerimento di Era, gelosissima moglie del re dell'Olimpo, lo uccisero facendolo a pezzi; i suoi resti furono messi a bollire in un paiolo e dalle stille del sangue del dio del vino, nacque un albero: il melograno (Cattabiani, 1996)

In epoca arcaica il melograno era associato a un essere femminile, Rhoiò (nome derivante dalla parola greca roìa o roià che significa melagrana), la figlia di Stàfylos, il tralcio d'uva, e nipote di Dioniso. Il padre irato l'aveva rinchiusa in una "larnax", un recipiente di argilla, e gettata in mare. Dopo un viaggio tutt'altro che agevole era giunta sull'isola di Delo dove generò Anios, che quindi procreò Oinò, Spermò, Elais, ovvero Vino, Grano e Ulivo (Cattabiani 1996).

Un altro mito greco racconta, invece, che Side (eroina eponima di Panfilia), moglie di Orione, rea di aver osato sfidare Era in una gara di bellezza, venne scaraventata, per punizione, nell'Adè, ove si trasformò in un melagrano. In tutti questi miti è simboleggiato il ciclo di morte-sacrificio da cui nasce la vita. Lo stesso recipiente di

argilla dove fu rinchiusa Rhoiò, il “larnax”, era usato nel mondo egeo come cassa funebre (Cattabiani, 1996).

La melagrana che nasce dal sangue di un essere mitologico esiste anche in una leggenda frigia. Secondo questo mito, Papas, il dio del cielo, si era addormentato sulla roccia Agdos che aveva assunto le sembianze della Grande Madre. Mentre dormiva, il suo seme cadde sulla roccia che, fecondata, partorì al decimo mese Agdistis, un essere androgino e tracotante. Gli dei erano stanchi della sua arroganza, ma non sapevano come ammansirlo, finché se ne occupò Dioniso, che trasformò l’acqua della sorgente da cui era solito dissetarsi Agdistis in vino, che fece addormentare l’essere androgino. Bacco, mentre dormiva, gli legò il membro con una fune, cosicché quando Agdistis si destò, balzò in piedi con tale slancio da evirarsi, mentre un fiotto di sangue particolarmente fecondo inondava la terra, tanto da far nascere il melograno (Cattabiani, 1996).

Altri miti parlano del melograno quale frutto piantato per la prima volta da Afrodite a Cipro (l’isola a lei dedicata) e come alimento a causa del quale Persefone non poté più risalire sulla terra per restarci, ma fu costretta ogni anno, a trascorrere sei mesi negli inferi (chi consumava i prodotti dell’oltretomba, era destinato a rimanervi per l’eternità), ma il suo ritorno è celebrato con l’arrivo della primavera (Cattabiani, 1996; Kathib, 2015).

In molte antiche culture il melograno figura in modo prominente. Nella cultura greca esso è simbolo di indissolubilità e matrimonio. Nella mitologia persiana Isfandiyar mangiò un melograno e divenne invincibile (Chandra et al., 2010).

La credenza del potere dell’invincibilità reso da tale frutto è riproposta dai babilonesi, i quali credevano che tale effetto sorgesse nel masticare i semi prima della battaglia. Il melograno possiede un “calice” che somiglia a una corona, e così nella tradizione ebraica la corona dell’imperatore era disegnata come la forma del calice del frutto. Inoltre esso rappresentava l’emblema personale dell’imperatore romano, mentre sempre in epoca romana, le spose usavano adornarsi i capelli con dei rametti di melograno, simbolo di ricchezza e di fertilità (Kathib, 2015; Chandra et al., 2010).

Nella simbologia cristiana, il melagrano rappresenta l’unità, nella fede, fra popoli e culture diverse, la fecondità e l’abbondanza, come testimoniato da decorazione e iconografia religiosa. Anche nello zoroastrismo, il melograno simboleggia sia la fecondità e l’immortalità, ed è un emblema di prosperità (Panthaky, 2006).



Nella simbologia ebraica, invece, la melagrana è emblema di onestà e rettitudine, in quanto il numero di semi che contiene è vicino a 613, il numero di prescrizioni contenute nella *Torah* (365 divieti e 248 obblighi), osservando le quali si agisce come individui saggi e corretti; nella simbologia islamica la melagrana figura come uno dei frutti che crescono nel giardino del Paradiso (Langley, 2000; Newman et al., 2007).

Il Corano cita tre volte il melograno (Sura 6:99, Sura 6:141, Sura 55:68), due volte come esempio di cose buone create da Allah e una volta come frutto trovato nel giardino del Paradiso.

Nell'induismo uno dei nomi del Dio Ganesha è *Bijapuraphalasakta* che tradotto significa letteralmente “colui che gradisce la frutta dai molti semi (il melograno)”. In India le donne sterili ne bevono il succo (Cattabiani, 1996).

Ancora oggi il melograno continua ad essere l'emblema, presso molte popolazioni, della fertilità, della prosperità, della fratellanza e dell'energia vitale: in Turchia, ad esempio, le neo spose sono solite gettare a terra una melagrana e contare i chicchi che ne fuoriescono, i quali corrisponderebbero al numero di figli che avranno, mentre in Cina i futuri sposi hanno l'usanza di mangiare un melograno la notte prima delle nozze in segno di buon auspicio. Sempre in Turchia, il succo del melograno è considerato una panacea rinvigorente da dare stagionalmente ai giovani e alle persone debilitate e viene usato tutt'ora per marinare la carne e per condire l'insalata (Cattabiani, 1996).

In Grecia, le donne ateniesi mangiavano i semi del frutto per conquistare fertilità e prosperità; i sacerdoti venivano incoronati con rami di melograno ma non potevano mangiarne i frutti. E' tradizione greca rompere un melograno durante i matrimoni, a capodanno e quando si compra una nuova casa (il melograno è il primo dono che anche oggi gli sposi portano) perché simbolo di abbondanza, fertilità e fortuna. Per lo stesso motivo, le decorazioni che riportano le immagini del melograno sono molto comuni in Grecia e, proprio nella lingua greca, il nome usato per la melagrana, vuol dire “*scorrere della forza dell'universo*” (Kathib, 2015).

Anche la Bibbia, nel Cantico dei Cantici, gli attribuisce un significato estetico e poetico: “*come spicchio di melagrana sono le tue guance, senza quello che di dentro si nasconde*” e più avanti il melograno ritorna come simbolo di fertilità, speranza e fecondità: “*ero discesa nel giardino delle noci, per osservare i frutti delle valli, per vedere se la vigna fosse fiorita, se avessero germogliato i melograni. Io ti prenderò, ti condurrò nella casa di mia madre, là mi istruirai, io ti darò da bere il vino drogato e il*

*mosto delle mie melagrane*”.

In alcune culture dell’Est europeo, la tradizione impone che il novello sposo trasferisca un melograno dal giardino del suocero al suo, come buon augurio di prole numerosa (Kathib, 2015).

La letteratura è piena di riferimenti al melograno, da *Romeo e Giulietta* di Shakespeare (atto III scena V) “[...] il giorno non è ancora vicino: era l’usignolo e non l’allodola, quello che ti ha ferito col suo canto l’orecchio trepidante; esso canta tutte le notti su quel melograno [...]” a Ogden Nash (*the hardest fruit upon this planet*).

Nella letteratura italiana troviamo riferimenti al melograno nella raccolta *Fiabe italiane* di Italo Calvino e ne *L’allegoria dell’autunno* di Gabriele D’annunzio.

Una bella citazione viene fatta da G. Carducci nel 1871 nel *Pianto antico* “l’albero a cui tendevi la pargoletta mano, il verde melograno da’ bei vermigli fior [...]” (Kathib, 2015).

Diversi artisti come Caravaggio, Botticelli e John Singer Sargent sono rimasti affascinati dal melograno tanto da includerlo in molte delle loro opere.

Durante il quattrocento è molto utilizzato il disegno della melagrana nelle decorazioni sia pittoriche che sui tessuti più preziosi, destinati a cerimonie solenni della Chiesa (per gli abiti e i paramenti dei sacerdoti e per le funzioni religiose) o cerimonie fastose di corte.

Il *Libro dei Re* (Re; 7:13-22) narra di melograni rappresentati sui capitelli che erano sul fronte del Tempio di Salomone a Gerusalemme.

Sulle antiche monete della Giudea troviamo raffigurata la melagrana come simbolo santo. Molti rotoli della Torah quando sono avvolti, sono protetti da gusci in argento a forma di melagrane.

Nel santuario di Santa Maria del Granato a Capaccio Vecchio (Sa) viene venerata la Madonna del Granato, in cui la Vergine tiene in collo Gesù Bambino e nella mano destra ha una melagrana, a indicarne morfologicamente la Verginità (figura 1.1).



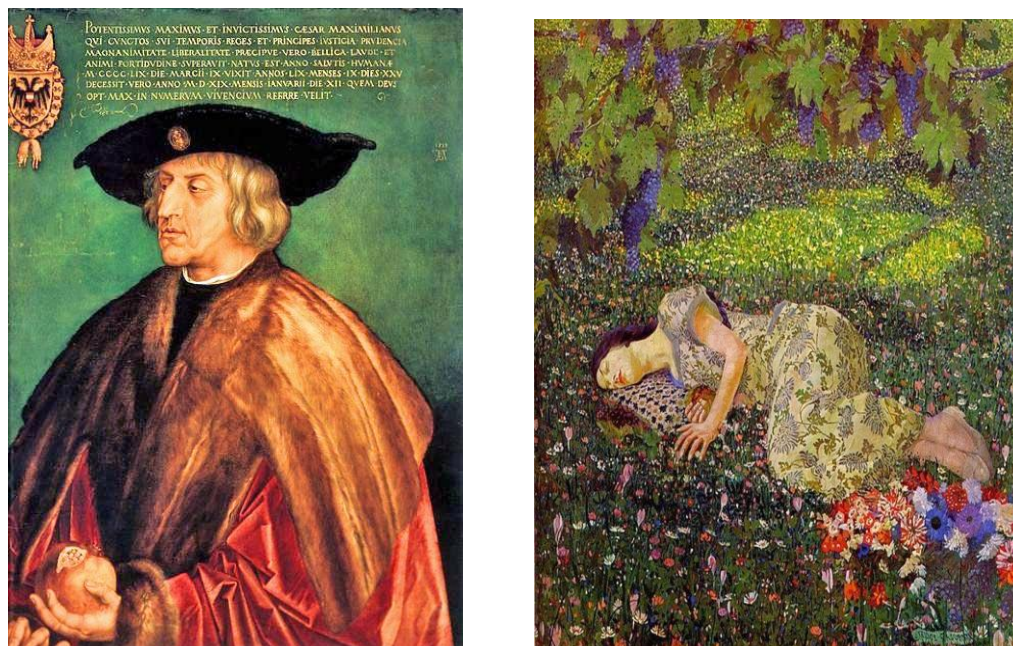
**Figura 1.1.** Madonna del Granato

Nel museo di Paestum, sempre nella provincia di Salerno, è situata una statua arcaica raffigurante la dea Era, in procinto di nutrire un bimbo, e anche lei nella mano destra ha una melagrana.

In altre opere d'arte, soprattutto in quelle dei pittori del XV- XVI secolo, troviamo la melagrana tra le mani del Gesù Bambino, in braccio alla Madonna, a simboleggiare il dono della vita elargito agli uomini.

Molti artisti nei secoli presero la figura della melagrana per rappresentarla nelle proprie opere, come Piero della Francesca, Rossellino, Michelozzo, Verrocchio, Donatello, Botticelli (*Madonna della melagrana*), Raffaello (*Madonna col Bambino e Melagrana*), Albrecht Duerer (*Massimiliano I d'Asburgo*), Casorati (*Il sogno del melograno*) in figura 1.2.





**Figura 1.2.** In ordine, dall'alto a sinistra al basso a destra: Botticelli (*Madonna della melagrana*), Raffaello (*Madonna col Bambino e Melagrana*), Albrecht Duerer (*Massimiliano I d'Asburgo*), Casorati (*Il sogno del melagrano*)

### 1.3. Il melograno: aspetti botanici ed agronomici

La classificazione botanica delle *Punicaceae* contiene solo due specie, *Punica granatum* L. e *P. protopunica* Balf.

*Punica protopunica* è endemica all'isola Socotra (Yemen) ed è attualmente l'unica specie dello stesso genere della *P. granatum* coltivata (Zukovski, 1950; Levin & Sokolova, 1979; Guarino et al., 1990; Mars, 2000; Levin, 2006).

Il melograno è un albero o arbusto che in condizioni di coltivazione è alto fino a 5 m. Allo stato selvatico può in alcuni casi superare i 7 m, mentre in condizioni estreme può essere trovato sotto forma di cespuglio (Levin, 2006). Sebbene essi si presentino in grande prevalenza come alberi decidui, esistono diversi melograni sempreverdi in India (Singh et al., 2006; Sharma et al., 2002).

Il melograno giovane si presenta con rami numerosi e sottili, a volte con spine, di forma poligonale (quadrangolare). Il colore della corteccia, a seconda della varietà, varia dal rosa al viola, mentre in altre varietà il colore è verde chiaro con presenza di macchie, oppure strisce rosa-viola. Con la maturazione, il colore rosa inizia lentamente a sparire, per lasciare spazio, nel secondo anno, a un grigio chiaro che si scurisce come l'albero maturo (Goor & Liberman, 1956).

La corteccia del vecchio albero tende a dividersi e in alcuni casi si stacca dal tronco. Il colore del legno è giallo chiaro (Holland et al., 2009).

Le foglie giovani, di forma oblanceolata con un apice ottuso e base acuminata, tendono ad avere un colore rossastro che diventa verde con la maturazione, con superficie liscia e senza peli e picciolo corto (solitamente hanno un aspetto lucido, in particolar modo sulla parte superiore della foglia) e contengono idioblasto con sostanze di secrezione che non sono ancora state identificate (Fahan, 1976).



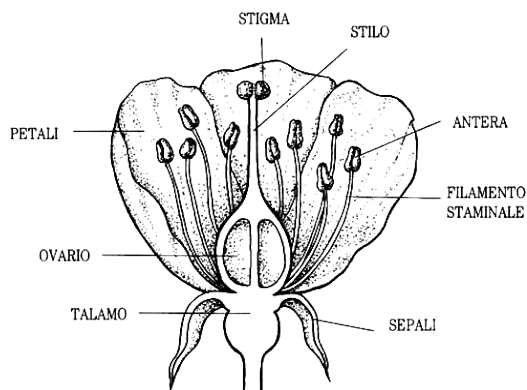
**Figura 1.3.** Fiore di melograno

La fioritura avviene circa un mese dopo la gemmazione, ad aprile-maggio nell'emisfero settentrionale, con la comparsa dei boccioli floreali, e può proseguire fino all'estate. I fiori (figura 1.3) possono apparire solitari (per lo più lungo i rami), in coppia o raggruppati (per lo più al termine del ramo). In varietà sempreverdi nel sud dell'India, è stata osservata la stagione di fioritura in tre periodi: giugno, ottobre e marzo (Nalawadi et al., 1973), o durante tutto l'anno (Hays, 1957).

In una prima fase, il fiore ha similmente una forma a pera, con colorazione che può variare dal verde-scuro al rosso scuro, che vira al rosso-arancio durante la maturazione. I petali sono di un colore rosso-arancio o rosa, e raramente si presentano di colore bianco (Feng et al., 1998; Wang, 2003; Levin, 2006; Beam Home, 2007).

I fiori del melograno si sviluppano o come fiori ermafroditi (*longistilo*) aventi "forma a vaso", o come fiori maschili (*brevistilo*), aventi "forma a campana". Entrambi hanno diverse centinaia di stami. Il *brevistilo* ha ovaie poco sviluppate, non ha il pistillo, contiene pochi ovuli ed è sterile. Pertanto, il fiore maschile cadrà senza allegagione. Il *longistilo* è fertile, con una normale ovaia in grado di sviluppare frutta e compare per primo (Holland et al., 2009; Kathib, 2015).





**Figura 1.4.** Struttura del fiore

Lo stigma del *longistilo* è all'altezza dell'entera (figura 1.4) e questa posizione permette sia l'auto-impollinazione, che l'impollinazione da parte degli insetti, soprattutto api. La capacità di allegagione dipende dal numero di fiori ermafroditi rispetto ai fiori maschili, quindi maggiore sarà la percentuale di tale tipologia, maggiore sarà la produzione del frutto del melograno.

Il numero di sepalii varia da 5 a 8; essi non cadono con l'allegagione, ma rimangono come parte integrante del frutto, a formare una specie di corona a forma di calice ad ornamento del frutto stesso.

Il fiore ha da 5 a 8 petali obovati, un po' increspati e sottili. Essi, a seconda della varietà assumono una colorazione rosa-arancio o rosso-arancio e sono alternati ai sepalii.

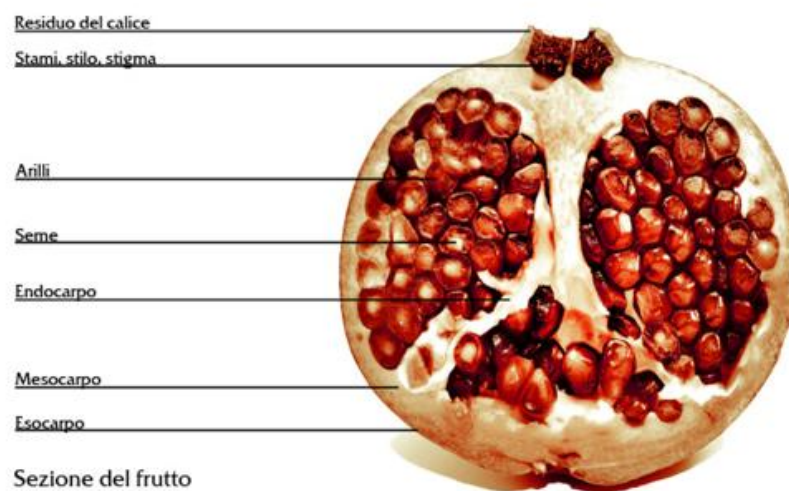
Gli stami sono numerosi (possono essere più di 300 a fiore), con antere gialle, biloculati e a filamento arancione (Holland et al., 2009).



**Figura 1.5.** Frutto melagrana

Il frutto (figura 1.5) è collegato all'albero tramite il picciolo, si sviluppa dall'ovario ed è una falsa bacca carnosa, chiamata botanicamente *balausta*, ed è grosso come una mela. A metà giugno l'ovario si ingrossa e, a seguito dell'allegagione, il colore dei sepali nel frutto in via di sviluppo cambia dall'arancio-rosso al verde, fino a raggiungere la caratteristica colorazione a maturazione avvenuta; il frutto per maturare impiega dai 5 agli 8 mesi dopo l'allegagione, a seconda della varietà (Holland et al., 2009; Kathib, 2015).

La buccia è composta da pericarpo ed endocarpo. Il pericarpo, a sua volta costituito da epicarpo e mesocarpo, è di aspetto coriaceo e colore che va dal giallo al verde, dal rosso al viola o, in rari casi, al nero. L'endocarpo è molto sottile, di colore giallo chiaro e circonda i loculi nei quali si trovano gli arili e i semi (figura 1.6).



**Figura 1.6.** Sezione del frutto

I loculi, divisi a gruppi da un'estensione membranosa, sottilissima e di sapore amarognolo, solitamente sono organizzati in modo asimmetrico. Infatti, la parte inferiore del frutto contiene da 2 a 3 camere multi ovuli, mentre la parte superiore contiene da 6 a 9 multi ovuli.

Gli arili contengono uno strato succoso commestibile che si sviluppa interamente da cellule epidermiche esterne del seme. Il colore della polpa commestibile varia dal bianco al rosso intenso a seconda della varietà, e può capitare addirittura di trovare semi di colore diverso nello stesso frutto. Le dimensioni degli arili variano in funzione dalla

varietà, così come i semi sono di durezza variabile e, ad esempio, la varietà conosciuta come “senza semi” in realtà presenta semi morbidi (Holland et al., 2009).

La maggior parte delle piante del melograno fioriscono e fruttificano nel loro secondo o terzo anno, avendo, rispetto ad altri alberi da frutto quali noci e agrumi, un periodo “giovanile” piuttosto breve.

L’adattabilità al clima variabile da parte del melograno si riflette nella grande distribuzione della forma selvatica in tutta l’Eurasia e Himalaya (Levin, 2006).

Le condizioni climatiche ottimali per la crescita del melograno sono: elevata esposizione alla luce solare, inverni miti con temperature non inferiori ai 12°C, estati calde e secche con carenza di pioggia durante le ultime fasi della maturazione del frutto, cioè quelle del bacino del Mediterraneo. In tali condizioni la melagrana sviluppa la sua dimensione e il suo colore ottimale e una percentuale ottimale di accumulo di zucchero senza il pericolo di splitting (Holland et al., 2009).

Il melograno, a temperature molto basse come -15°C o -16°C, soffre, e a temperature ancora più basse, cioè -20°C, muore (Enciclopedia Agraria Italiana).

Collezioni di germoplasma di melograno sono oggi presenti in diversi paesi, dalla Spagna alla Turchia, ad altri Paesi dell’Ex Unione Sovietica. Stando ai dati di Frison e Servinsky (1995) troviamo collezioni di germoplasma anche in Albania, Cipro, Italia, Francia, Germania, Ungheria, Israele, Portogallo, Russia, Tunisia, Stati Uniti. Con riferimento alle varietà diffuse in coltivazione, la maggior parte di quelle oggi censite (dati IPGRI) sono state selezionate a partire da materiale genetico di origine ignota; a volte come semenzali, altre come mutazioni. Tuttavia sono anche riportate varietà ottenute da specifici programmi di incrocio, in particolar modo in India e in Cina (Bellini et al., 2010).

Tra le varietà ad oggi conosciute, le sei più diffuse al mondo sono: *Wonderful*, di origine americana; *Hicanzar*, di origine turca; *Acco*, di origine israeliana; *Bagua*, di origine indiana; *Mollar de Elche* e *Valenciana*, di origine spagnola.

La varietà *Wonderful*, che è la maggior in ambito commerciale del Stati Uniti, è stata scoperta in Florida e importata in California nel 1896 (California Rare Fruit Growers, 1997). Questo tipo di varietà è coltivata anche in Europa occidentale, Israele e Cile (Sepulveda et al, 2000). E’ la varietà più colorata, sia da un punto di vista della buccia che del succo, dà una buona resa di succo (ideale per la spremitura), ha un sapore ricco e acidognolo, leggermente astringente ma dissetante, paragonabile al succo dei mirtili



rossi e del pompelmo, tanto da essere considerata essere tra le migliori varietà da degustazione (Karp, 2006).

Le varietà *Mollar de Elche* e *Valenciana* sono le più commercializzate in Europa Occidentale (Costa e Melgarejo, 2000). La *Valenciana* viene raccolta in anticipo (agosto), in modo tale da evitare i danni causati dal sole e minimizzare gli attacchi dei parassiti e gli effetti dovuti al cattivo tempo; al contempo, tale pratica causa basse rese, mediamente una scarsa qualità e dimensioni ridotte del frutto. La varietà *Mollar de Elche* è raccolta molto più tardi (da fine settembre a metà novembre), fornisce rese maggiori, un'ottima qualità del frutto (che si presenta anche di dimensioni più grandi) ed è più apprezzata da parte dei consumatori (Costa e Melgarejo, 2000).

Recentemente, altre varietà si stanno diffondendo. Tra di esse c'è una accessione del germoplasma locale siciliano denominata 'Primosole', mentre accessioni del germoplasma localizzato nel Lazio sono in fase di studio e stanno dimostrando di avere buone caratteristiche quali produttività, dimensioni del frutto, epoca di maturazione, colore della buccia, colore del succo, acidità del succo, resistenza ad agenti biotici avversi, capacità antiossidante, e, probabilmente il parametro maggiormente importante e preso in considerazione al fine della qualità del prodotto, la consistenza del tegumento interno del seme, chiamato tegmen (Bellini et al., 2010).

Per la caratterizzazione dei genotipi di melograno ultimamente sono stati molto utilizzati i marcatori molecolari dominanti come RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), PCR-RFLP (PCR- restriction fragment length polymorphism). Questi marcatori sono stati utilizzati, tra gli altri, anche per la collezione di germoplasma in Garrygala, (Turkmenistan), che risulta di grande interesse, in quanto contiene campioni che sono stati raccolti in una zona geografica facente parte dell'Asia centrale, considerata come la zona da cui ha avuto origine il melograno (Bellini et al., 2010).

Il melograno generalmente è propagato per talea, trattando eventualmente i rami utilizzati con ormoni rizogeni. Quindi, data la facilità e immediatezza di propagazione, negli anni non sono state introdotte significative innovazioni, tranne che nell'irrigazione, in quanto la variazione di questo parametro condiziona maggiormente la produttività e la qualità del prodotto. Una costante irrigazione del terreno aumenta la fase produttiva, favorisce il buon funzionamento dell'impianto e diminuisce i rischi che il frutto si spacchi. Inoltre, il melograno, sopporta alti gradi di salinità (inferiore soltanto

a quella della Palma da dattero) e alla clorosi ferrica.

Lo sviluppo di metodi per separare la parte edule (arili e semi) dal pericarpo e dai setti membranosi presenti all'interno del frutto e il miglioramento della crescita delle tecniche sia a livello industriale su larga scala, sia per macchine a uso artigianale o per ristorazione, ha portato a un impressionante ampliamento della portata dei frutteti di melograno (Bellini et al., 2010; Holland et al., 2009).

Un altro importante aspetto in fase di sviluppo e ricerca è dato dal potere di ampliare la fase post-raccolta, in modo da allungare il calendario di commercializzazione del frutto e dei prodotti da esso derivanti.

I principali problemi del melograno nella fase post-raccolta sono rappresentati dalla riduzione delle dimensioni con conseguente perdita di peso, imbrunimento della buccia e comparsa di marciumi. L'utilizzo del film plastico (come riportato in diversi riferimenti in letteratura) ha ridotto la respirazione e ha limitato i danni a carico della buccia, mantenendo anche la freschezza del prodotto.

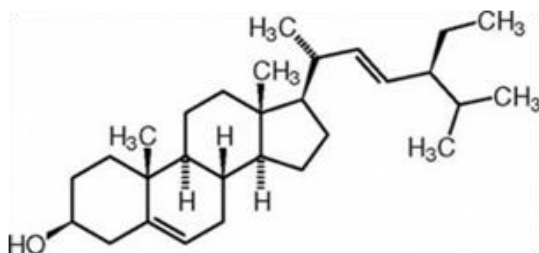
A differenza di molti altri frutti, la maturazione del melograno si arresta subito dopo la raccolta. Questo frutto viene infatti considerato aclimaterico, per via dei bassi livelli di respirazione e il basso tasso di etilene prodotto, e anche dopo trattamenti esogeni con etilene, i principali parametri della maturazione non vengono alterati in modo significativo (Bellini et al., 2010).

#### **1.4. Componenti bioattive del melograno**

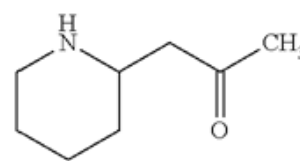
Il melograno ha diverse proprietà salutistiche e varie parti della pianta, quali frutti, corteccia, fiori, radici e foglie, sono state utilizzate per trattamenti medici e medicamentosi in un'ampia gamma di malattie e disturbi della salute. Nello specifico, il consumo del succo di melograno ha mostrato efficacia nella riduzione della progressione del tumore alla prostata e contro altri tipi di cancro, nella protezione contro le malattie cardiovascolari, nell'attività antimicrobica e contro il diabete. Molti di questi effetti a beneficio della salute umana sono stati associati alla capacità antiossidante del succo, che è stimata essere tre volte superiore rispetto a quella del vino rosso o del tè verde (Heber et al., 2006).

Le indagini sulla natura delle componenti chimiche del melograno sono solo all'inizio. Composti bioattivi ad oggi individuati nelle varie parti del melograno includono:

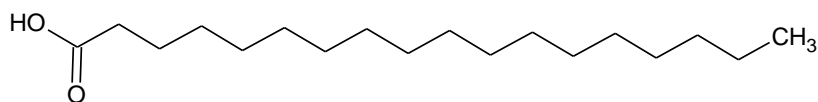
- Stigmasterolo (figura 1.7), appartenente alla classe degli steroli e terpenoidi, presenti nei semi, corteccia e foglie (Abd El Wahab et al., 1998);
- Pelletierine (figura 1.8), appartenenti alla classe degli alcaloidi, (Neuhofer et al., 1993; Vidal et al., 2003), presenti in foglie e corteccia;
- Acidi grassi, in particolare stearico (figura 1.9), punicico (figura 1.10), e trigliceridi, presenti nei semi (Schubert et al., 1999);
- Acido organici, quali citrico (figura 1.11) e succinico (figura 1.12) presenti nel succo (Poyrazoglu et al., 2002);
- Flavonoli, quali quercetina (figura 1.13), canferolo (figura 1.14), e rutina (figura 1.15) presenti nella corteccia, nella buccia, nella frutta, e nelle foglie (Artik, 1998; Van Elswijk et al., 2004);
- Antocianine e antocianidine, quali delphinidina (figura 1.16), cianidina (figura 1.17), cianidina-3-*O*-glucoside (figura 1.18), delphinidina-3,5-*O*-glucoside (figura 1.19), pelargonidina-3-*O*-glucoside (figura 1.20) presenti nella buccia e nel succo (Noda et al., 2002; Hernandez et al., 1999);
- Catechine e procianidine, quali catechina (figura 1.21), epicatechina (figura 1.22) ed epigallocatechin-3-gallato (figura 1.23), presenti nella buccia e nel succo (De Pascual-Teresa et al., 2000).



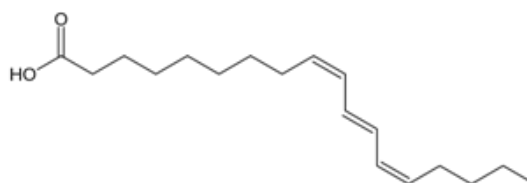
**Figura 1.7.** Stigmasterolo



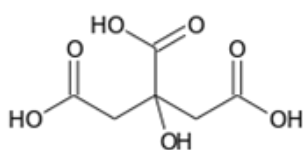
**Figura 1.8.** Pelletierina



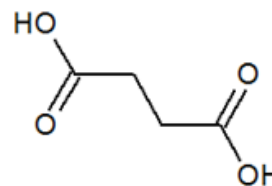
**Figura 1.9.** Acido stearico



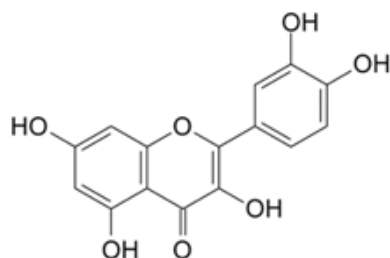
**Figura 1.10.** Acido punico (acido 9-cis-11-trans-13-cis ottadecatrienoico)



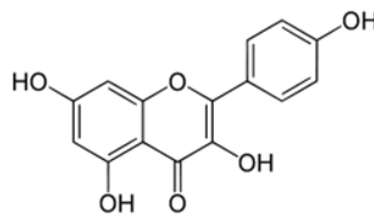
**Figura 1.11.** Acido stearico



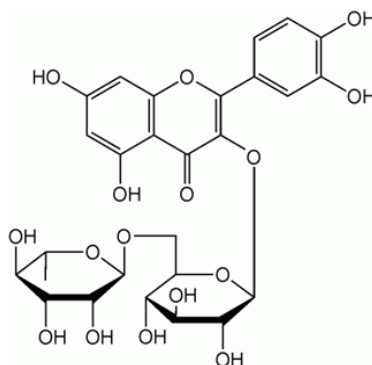
**Figura 1.12.** Acido succinico



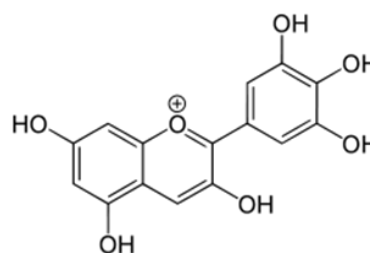
**Figura 1.13.** Quercetina



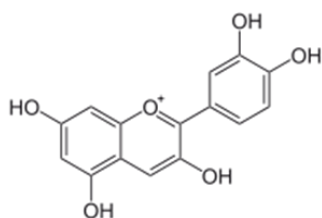
**Figura 1.14.** Canferolo



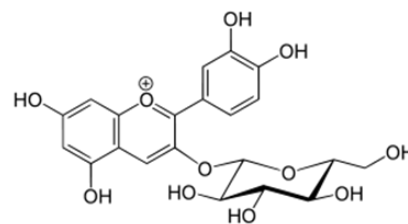
**Figura 1.15.** Rutina



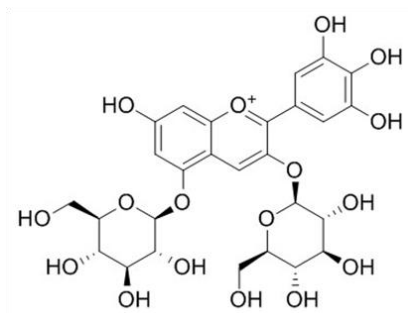
**Figura 1.16.** Delfinidina



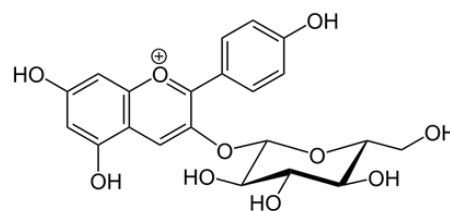
**Figura 1.17.** Cianidina



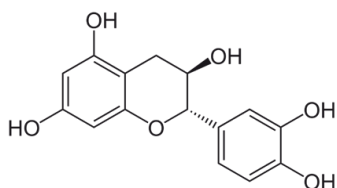
**Figura 1.18.** Cianidin-3-*O*-glucoside



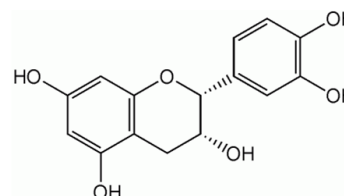
**Figura 1.19.** Cianidin-3,5-*O*-diglucoside



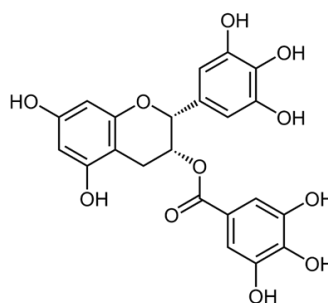
**Figura 1.20.** pelargonidin-3-*O*-glucoside



**Figura 1.21.** catechina



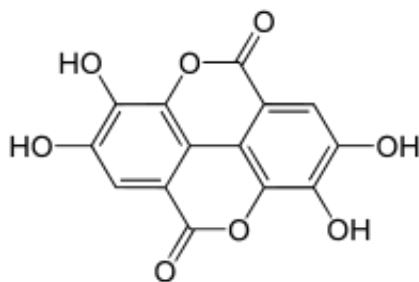
**Figura 1.22.** epicatechina



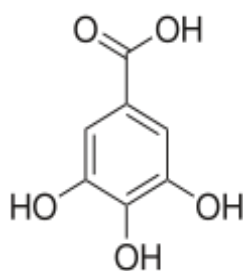
**Figura 1.23.** Epigallocatechin-3-gallate

La quantità di ognuno di questi composti può variare in funzione dello sviluppo della pianta, della maturazione della melograna, di variazioni ambientali e di coltura, e del tipo di varietà.

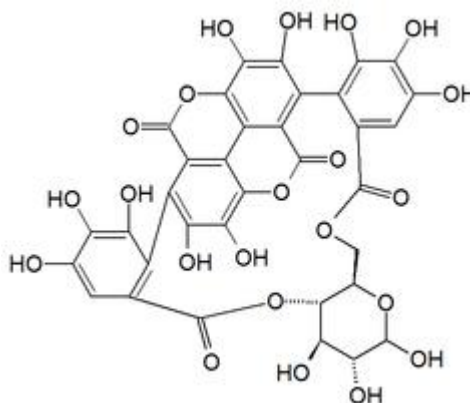
È stata dimostrata una sensibile variazione tra diverse varietà di melograno anche per quanto riguarda il livello di composti fenolici quali l'acido ellagico (figura 1.24), l'acido gallico (figura 1.25), la punicalina (figura 1.26) e la punicalagina (figura 1.27).



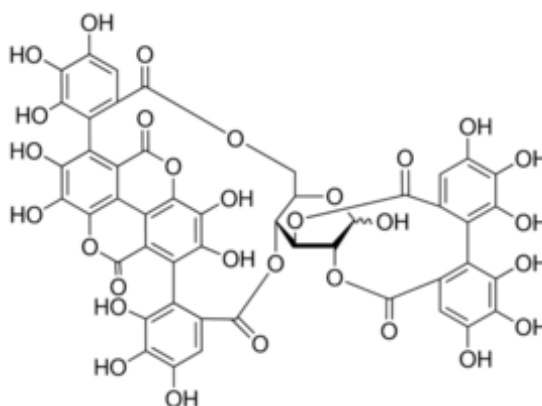
**Figura 1.24.** Acido ellagico, (Amakura et al., 2000b; Wang et al., 2004)



**Figura 1.25.** Acido gallico, (Amakura et al., 2000b; Huang et al., 2005b)



**Figura 1.26.** Punicalina (Tanaka et al., 1986a; Gil et al., 2000)



**Figura 1.27.** Punicalagina (Tanaka et al., 1986a; Gil et al., 2000)

L'acido ellagico è una molecola altamente termostabile e possiede proprietà sia lipofile dovute ai suoi quattro anelli aromatici, sia idrofile dovute ai due sistemi lattonici a sei termini che funzionano da accettori di elettroni e quindi creano le condizioni per la formazione di legami a idrogeno (Salminen et al., 2004). L'acido ellagico ha importanti attività biologiche tra cui antitumorali, antivirali, antimicrobiche (Kathib, 2015). Gli ellagitannini, quali punicalina e punicalagina, sono tannini idrolizzabili, composti non azotati con un peso molecolare compreso tra 300 e 20.000 Dalton (Khanbabaee Van Ree, 2001). Questi composti hanno un ruolo fondamentale nella pianta in quanto sono antimicrobici, funzionalità dovuta alla capacità di formare complessi forti con le proteine e con i polisaccaridi, al fine di inibire la crescita microbica (Haslam, 1996).

La punicalagina (figura 1.27), è un composto presente solo nel melograno, ed è il composto fenolico più grande tra gli ellagitannini, con un peso molecolare superiore ai 1.000 Dalton. Ad esso è imputata la gran parte delle proprietà antiossidanti del succo di melograno (Gil et al., 2000). La punicalagina, presente in natura sotto forma dei due anomeri  $\alpha$  e  $\beta$ , è presente quasi esclusivamente nella buccia. Presenta diverse proprietà farmacologiche, tra le quali proprietà anti-infiammatorie, antiproliferativa, pro-apoptotica e antigenotossica (Lin et al., 1999; Chen et al., 2000; Seeram et al., 2005; Adams et al., 2006).

Le attuali ricerche in campo medico riguardanti le proprietà curative del melograno sono rivolte a malattie coronariche, cardiovascolari, ischemia, disturbi dovuti al diabete, cancro della pelle, della prostata, delle mammelle e del colon, iperlipidemia, ipossia, invecchiamento, malattie cerebrali, e Aids (Shishodia et al., 2006). In particolar modo, malattie gli studi legati al melograno sono finalizzati alla ricerca e all'inibizione di alcuni enzimi grazie ai composti fotochimici contenuti in questo frutto. Tra questi enzimi troviamo il metalloproteinasi, fattore di crescita vascolare endoteliale, lipossigenasi, chinasi c-Jun-N-terminale (JNK) (Shishodia et al. 2006).

Un aspetto interessante e importante da tenere in considerazione a riguardo del melograno, è la biodisponibilità dei suoi costituenti, in quanto alcuni dei principali costituenti del melograno vengono rapidamente degradati nel corpo e il loro apporto diventa trascurabile (Holland D. et al., 2009).

Tra i benefici maggiormente conosciuti per la salute ci sono sicuramente le proprietà che ha il melograno contro le malattie infettive: l'attività antibatterica di questa pianta è

stata dimostrata contro un'ampia gamma di batteri, virus e funghi (Jayaprakasha et al. 2006).

## 1.5. Usi del melograno

Il melograno scopi trova diverse applicazioni. Ad esempio la corteccia del melograno produce tannini utilizzati per la creazione del cuoio marocchino, mentre gli estratti dei fiori e dei gusci sono stati usati come coloranti per tessili. Gli estratti dalla buccia hanno fornito una delle principali fonti di inchiostro medievale in Europa (Carvalho, 1999), e gli inchiostri artigianali sono tuttora ricavati dal melograno.

Il maggior uso del melograno in ambito non alimentare riguarda, tuttavia, il campo estetico-ornamentale. Questo uso estetico visivo è così diffuso che la maggior parte dei melograni acquistati come frutta fresca negli Stati Uniti non viene consumato (California Rare Fruit Growers, 1997).

### 1.5.1. Applicazioni mediche

Il primo ad accorgersi delle proprietà “medicamentose” del melagrano è stato *Ippocrate*, il quale la prescriveva come antinfiammatorio, antidiarroico, antibatterico e antielmintico; le intuizioni del più famoso medico dell'antichità circa le proprietà curative del frutto, hanno trovato conferma, molti secoli dopo, nella ricerca medica.

Nella medicina ayurvedica il melograno è considerato *un farmaco a sé stante*, ed è usato come agente antiparassitario (Naqvi et al., 1991), *tonico del sangue* (Lad et al., 1986) e per guarire afte, diarrea e ulcere (Caceres et al., 1987).

Sebbene il melograno presenti benefici in un ampio campo terapeutico, la gran parte della ricerca si è concentrata nel corso degli ultimi anni sulle sue proprietà antiossidanti, antitumorali e anti-infiammatorie (Jurenka, 2008).

Ad esempio, un test effettuato *in vitro* ha dimostrato che il succo di melograno estratto dai semi ha proprietà antiossidanti tre volte superiori rispetto al vino rosso o al tè verde (Gil et al., 2000). Test *in vitro* condotti su estratti di succo di melograno fermentato e di olio di semi pressato a freddo hanno mostrato proprietà antiossidanti superiori a quelle del vino rosso e molto simili a quelle di estratti di tè verde (Schubert et al., 1999).



Gli estratti di melograno combattono i radicali liberi e diminuiscono lo stress ossidativo dei macrofagi e la perossidazione lipidica negli animali (Rosenblat et al., 2006) ed aumentano la capacità antiossidante del plasma nelle persone anziane (Guo et al., 2008).

Ricerche e test portati avanti sull'uomo hanno dimostrato che un succo della polpa di melograno ha proprietà antiossidanti superiori rispetto al succo di mela. Tramite il test FRAP (ferric ion reducing antioxidant power) è stato trovato che 250 ml di succo di polpa di melograno al giorno per quattro settimane, somministrato a persone anziane sane, aumentano la capacità antiossidante del plasma da 1,33 mmol a 1,46 mmol, mentre, ad esempio, non sono state riscontrate significative variazioni di quel parametro su soggetti a cui era stato somministrato succo di mela. Dal momento che i valori di vitamina E, acido ascorbico, e di glutazione ridotto rimanevano sostanzialmente inalterati, i ricercatori sono giunti alla conclusione che i risultati osservati fossero da imputare ai composti fenolici del melograno (Guo et al., 2008).

Utilizzando tre linee cellulari del cancro alla prostata (DU-145, LNCaP e PC-3), un esperimento ha dimostrato come varie componenti del melograno come il succo e la buccia, inibiscono l'invasività delle cellule del cancro e la proliferazione, grazie alla rottura del ciclo cellulare, inducendo l'apoptosi e bloccando la crescita tumorale. In aggiunta, questi studi hanno dimostrato che l'azione sinergica di varie componenti del melograno ha più effetto dell'azione della singola componente (Lansky et al., 2005; Albrecht et al., 2004).

Due ricerche effettuate su topi a cui è stata impiantata la linea di cellule di cancro alla prostata PC-3, hanno dimostrato che l'estratto del melograno inibisce la crescita delle cellule, inducendo apoptosi attraverso la modulazione delle proteine che regolano l'apoptosi stessa (Malik et al., 2005, 2006).

In un open-label (studio "in aperto"), 16 pazienti dei 46 con cancro alla prostata sotto sperimentazione, hanno mostrato una significativa diminuzione di PSA (antigene prostatico specifico) durante il trattamento con succo di melograno. Questi risultati indicano che il melograno può influenzare il cancro della prostata tramite effetti anti-infiammatori, antiproliferativi e apoptotici (Pantuck et al., 2006).

Recenti ricerche hanno mostrato che il melograno è utile anche per combattere il cancro al seno (Toi et al., 2003).

L'olio di semi di melograno pressato a freddo ha mostrato inibire gli enzimi cicloossigenasi e lipossigenasi. La cicloossigenasi, enzima chiave nella conversione dell'acido arachidonico in prostaglandine (importanti mediatori infiammatori), è risultato inibito del 37%, mentre la lipossigenasi, che catalizza la conversione dell'acido arachidonico in leucotrieni (anch'essi mediatori infiammatori), è risultato inibito del 75% (Schubert et al., 1999).

Una ricerca rivolta a chi soffre di osteoartrite ha dimostrato che l'estratto del frutto del melograno ha un effetto inibitorio sulla metalloproteinasi della matrice (MMP), un sottogruppo di enzimi collagenasi coinvolti nel degrado e nel catabolismo della matrice extracellulare congiunta (Ahmed et al., 2005).

Altri studi si sono orientati su come il melograno abbassi i valori di colesterolo assoluto e di colesterolo LDL (Esmailzadeh et al., 2006) e su come il succo di melograno riduca la pressione sanguigna sistolica e quindi possa essere utile per combattere le malattie cardiovascolari (Aviram et al., 2001).

Un estratto idroalcolico della melagrana è stato studiato per le proprietà antibatteriche sui microorganismi della placca dentale. Sessanta pazienti con apparecchi ortodontici fissi sono stati divisi in tre gruppi da venti persone ognuno. Il primo gruppo faceva risciacqui con 15 ml di acqua distillata, il secondo gruppo con 15 ml di clorexidina, mentre il terzo gruppo con una soluzione di 15 ml di estratto idroalcolico di melagrana. La placca dentale è stata raccolta da ogni paziente prima e dopo il risciacquo, e i campioni diluiti e placcati su Muller-Hinton agar e incubati a 37°C per 48 ore. Il melograno ha diminuito l'unità batterica dell'84%, la clorexidina del 79%, mentre l'acqua solo dell'11%. Sia il melograno che la cloroxidina si sono dimostrati efficaci contro lo stafilococco, streptococco, ed è stato ipotizzato che l'attività antibatterica del melograno sia dovuta alla punicalagina (Menezes et al., 2006).

L'effetto del succo di melagrana ha fatto registrare un aumento del flusso sanguigno intracavernoso e rilassamento della muscolatura liscia, contrastando la disfunzione erettile (Azadzoj et al., 2005), sebbene, da altri test, non sia stata raggiunta la significatività statistica (Forest et al., 2007).

Le proprietà neuroprotettive dei composti fenolici del melograno sono state valutate in un modello animale per lo studio dell'Alzheimer. Alcuni topi affetti da tale malattia, una volta trattati con il succo della melagrana, hanno mostrato il 50% in meno di accumulo del betamiloide rispetto ai topi trattati con acqua e zucchero. Gli animali

sottoposti a questo trattamento hanno mostrato anche migliori capacità cognitive nei labirinti e una migliore nuotata in acqua (Hartman et al., 2006).

L'estratto dei fiori di melograno somministrato a topi obesi per cinque settimane ha causato una diminuzione significativa del loro peso corporeo, un aumento di energia, diminuzione di colesterolo sierico, trigliceridi. È stata notata inoltre una diminuzione dell'appetito e l'assorbimento del grasso intestinale, dovuti in parte all'inibizione dell'attività della lipasi pancreatica (Lei et al., 2007).

## **1.6. I polisaccaridi**

I polisaccaridi costituiscono una classe di composti chimici organici appartenente alla classe più ampia dei glucidi. Quelli sintetizzati in natura presentano una sorprendente diversità tra di loro. Molti polisaccaridi microbici e vegetali non sono ancora stati scoperti. La complessità delle loro strutture e la capacità di associarsi con altri sistemi naturali li rende difficili da isolare e da caratterizzare (Singh, et al., 2001).

Nel corso degli ultimi anni è stato registrato un rapido e crescente interesse per i polisaccaridi, sia dal punto di vista strutturale che applicativo. I polisaccaridi sono solitamente omopolimeri, costituiti da una singola specie di residui di pentosi (monosaccaridi a cinque atomi di carbonio) o esosi (monosaccaridi a sei atomi di carbonio); anche quando sono costituiti da più di una specie di residui monosaccaridici, raramente il numero supera le tre o quattro unità. In natura, i polisaccaridi si trovano comunemente nelle piante, dove costituiscono dal 50% al 90% del loro peso secco, mentre negli animali si trovano in quantità minori, ma la loro presenza è essenziale come scorta energetica. Tra i polisaccaridi di origine vegetale ci sono l'amido, la cellulosa, l'emicellulosa e la pectina (Harding, et al., 2002).

### *1.6.1. Amido*

L'amido è presente in quasi tutte le piante, ed è una miscela di due polisaccaridi: l'amilosio (figura 1.28) e l'amilopectina (figura 1.29).

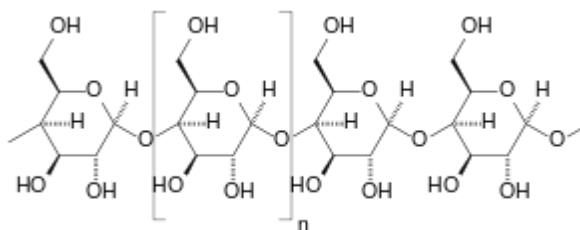


Figura 1.28. Struttura dell'amilosio

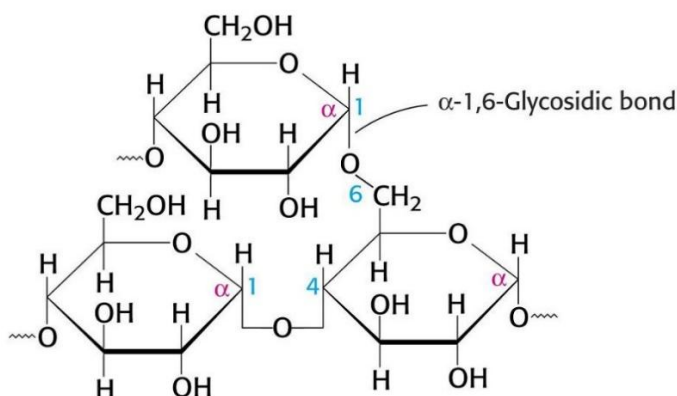


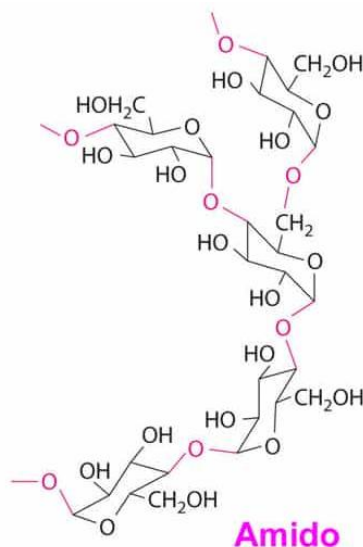
Figura 1.29. Struttura dell'amilopectina

Il rapporto tra amilosio e amilopectina nell'amido varia al variare di alcuni parametri, tra cui la fonte e l'età.

L'amido rappresenta la principale fonte di carboidrati nelle piante ed è il più abbondante componente tra i nutrimenti dopo l'acqua. E' presente in radici, semi, tuberi, frutta e steli di varie piante, tra le quali il mais, frumento, riso, miglio, orzo, patate e si presenta sotto forma di granuli insolubili in acqua (Collins et al., 1995; Stevens, 1999; Kaplan, 1998; Shogren, 1998).

L'isolamento dell'amido dalle fonti in cui si trova avviene con svariati metodi fisici quali immersione, fresatura e sedimentazione (Stevens, 1999; Kaplan, 1998). E' insolubile a temperatura ambiente, ma in acqua ad elevate temperature tende a gelatinizzare per formare una dispersione opalescente (Shogren, 1998).

Sotto l'opera di enzimi quali l'amilasi e l'amiloglucosidasi subisce un effetto di degradazione. Per esterificazione ed eterificazione l'amido può subire modifiche e formare copolimeri ad innesto con materiali sintetici come l'acido poliacrilico. Presenta una struttura molto ramificata (figura 1.30) e un'elevata permeabilità, quindi non è adatto per prodotti in plastica e in fibra (Stevens, 1999).



**Figura 1.30.** Struttura dell'amido

Tuttavia, l'amido trova largo impiego nel campo alimentare in qualità di addensante, in campo medico in qualità di diluente inerte per i farmaci, e nell'industria tessile (Collins et al., 1995; Stevens, 1999; Kaplan, 1998; Shogren, 1998).

L'amido acetato è un estere dell'amido e il suo impiego aumenta la stabilità degli impasti di salse, di dolci, di verdure liofilizzate e polveri di frutta, grazie ai ponti tra le catene di amilopectina che i gruppi acetato formano prevenendo o riducendo la retrogradazione. Gli eteri sono utilizzati come adesivi, mentre gli eteri allilici, in particolare, fungono da rivestimento essiccante (Shogren, 1998). Il notevole interesse suscitato dai copolimeri di amido ad innesto è dovuto alla loro sostanziale utilità come materiali di imballaggio biodegradabili e pacciamatura agricola. Infatti, l'amido reticolato con l'epicloridina è utilizzato nel trattamento del riso per rendere i suoi grani più resistenti (Singh, et al., 2001).

L'unico metodo affidabile per la determinazione dell'amido totale è basato sulla conversione totale dell'amido in D-glucosio da enzimi purificati specifici per l'amido, e la determinazione del D-glucosio rilasciato da un enzima specifico per esso. Tuttavia, utilizzando questo metodo, possono sorgere dei problemi. L'amilasi (enzimi che catalizzano la degradazione di legami oligosaccaridici e polisaccaridici per ottenere composti più semplici, come i disaccaridi) deve subire un processo di purificazione per eliminare qualsiasi altra attività enzimatica che potrebbe rilasciare D-glucosio, tipo cellulasi, invertasi o saccarasi, e catalasi, che distruggerebbe il perossido di idrogeno da cui dipende la determinazione enzimatica di D-glucosio. Questa contaminazione

potrebbe dare risultati errati, sopra o sottostimando il reale dato (Nielsen, 2010).

Un modo per ovviare a questo problema è disperdere l'amido nel dimetilsolfossido (DMSO) e convertirlo quantitativamente a D-glucosio tramite trattamento con  $\alpha$ -amilasi termostato per ottenere depolimerizzazione e solubilizzazione dell'amido. La glucoamilasi determina una conversione quantitativa dai frammenti prodotti dall'azione dell' $\alpha$ -amilasi nel D-glucosio, che viene determinato con un reagente glucosio ossidasi/perossidasi (GOPOD) (AOAC Method 969.39, American Association of Cereal Chemists Method 76-13). Questo reagente contiene una tintura incolore che è ossidata per colorare i composti ricavati dal perossido di idrogeno in una reazione catalizzata dalla perossidasi. In questo modo è determinato l'amido totale.

### 1.6.2. Cellulosa ed emicellulosa

La cellulosa è la molecola lineare più abbondante in natura sulla Terra (figura 1.31). Questo polimero è il maggiore costituente delle piante superiori, essendo presente in esse per una quantità che oscilla tra il 40% e il 50%. La cellulosa è anche un costituente delle alghe e dei funghi, sebbene in percentuale inferiore, ma torna ad essere il principale costituente di alcune fibre naturali tra cui il cotone, che rappresenta la forma più pura di cellulosa, o le fibre di stelo e le fibre di foglie (Collins et al., 1995; Gilbert et al., 1998; Stevens, 1999).

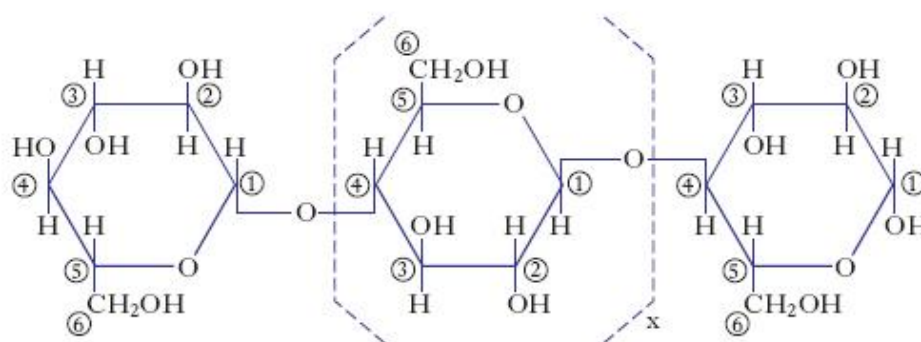


Figura 1.31. Struttura della cellulosa

In natura la cellulosa si trova spesso associata con altri polisaccaridi quali emicellulose, pectine, proteine, lignina e sostanze minerali. Essa può essere sintetizzata da alcuni tipi di batteri come *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e

Sarcina e può assumere le fattezze di una pellicola se i batteri vengono coltivati su un terreno di glucosio. Sono noti anche processi enzimatici per la biosintesi di cellulosa (Gilbert R. D. et al., 1998; Stevens M. P., 1999; Hon, 1996).

La cellulosa è un polimero cristallino, e sebbene abbia molti gruppi ossidrilici, è completamente insolubile in acqua e nella maggior parte dei solventi organici. Molti organismi costituiti da cellulosa, producendo enzimi, hanno anche le depolimerasi, che ne favoriscono la mineralizzazione (Gilbert et al., 1998; Stevens, 1999; Hon, 1996). La cellulosa è solubile in acidi minerali forti, in idrossido di sodio, nei complessi metallici di rame (II) (Hudson et al., 1980; Gadd, 1982). In ambiente fortemente acido la cellulosa viene idrolizzata completamente a D-glucosio, invece l'idrolisi blanda produce idrocellulosa con catene più corte, più bassa viscosità e resistenza alla trazione. Per effetto di grandi estensioni intramolecolari e legami idrogeno intermolecolari, la cellulosa non è un polimero termoplastico, ma si decompone prima di fondere (Yamamoto et al., 1991). Sono possibili esteri della cellulosa tra i quali nitrato, fosfato, acetati, propionati, butirrati, e alcuni eteri (solubili in acqua a differenza della cellulosa) come carbossimetilcellulosa, metilcellulosa (usato come agente alimentare di ispessimento e come costituente di alcuni adesivi, inchiostri e formulazioni tessili di finitura) e idrossipropilcellulosa (Gilbert et al., 1998; Stevens, 1999; Hon, 1996).

La cellulosa e i derivati da questo polisaccaride sono molto utilizzati nel campo tessile, alimentare e nella produzione di membrane, pellicole, carta. Questo polimero è utilizzato anche per la produzione di farmaci, agenti di sospensione, cordami, materassi, reti, tappezzeria, funi, spaghi, imballaggi (Gilbert et al., 1998; Stevens, 1999; Hon, 1996).

Le emicellulose rappresentano una categoria di polisaccaridi che si associano con la cellulosa e la lignina nelle pareti cellulari delle piante. Questi polisaccaridi fungono da collegamento tra la cellulosa e la lignina (Kanke et al., 1992).

Hanno un peso molecolare molto più basso rispetto alla cellulosa e un bassissimo grado di polimerizzazione (DP generalmente sotto a 200) (Collins et al., 1995; Kanke et al., 1992). La loro struttura primaria dipende sostanzialmente dalla sorgente del polimero e rappresentano circa il 20-30% della massa del legno.

L'emicellulosa esiste in forma amorfa, è costituita da zuccheri differenti (in contrapposizione alla cellulosa che è costituita da unità di solo glucosio), ha struttura ramificata e non fibrosa. Le emicellulose vengono idrolizzate a monosaccaridi (quali

glucosio, mannosio, arabinosio, xilosio, galattosio), ad acido acetico ed acido uronico. A loro volta, i saccaridi ottenuti dall'idrolisi possono essere convertiti a sostanze chimiche primarie come acetone, butanolo, etanolo, furano, acido glutammico (Popa, 1996).

I costituenti principali dell'emicellulosa sono 1,4-p-D-xilani, 1,4-p-D-mannani, arabani (composta da unità arabinosio), e 1,3- e 1,4-p-D-galattani (miscela di monosaccaridi) (Kanke et al., 1992).

Grazie alle loro proprietà biologiche, le emicellulose sono molto importanti nell'industria. Sono usate come additivi alimentari, addensanti, emulsionanti, gelificanti, adesivi e come materiale adsorbente. Alcune emicellulose hanno dimostrato proprietà antitumorali. L'idrogenazione di questo polisaccaride con lo xilosio produce lo xilitolo che è utilizzato come dolcificante (Popa, 1996).

### *1.6.3. Pectine*

Le pectine sono dei polisaccaridi strutturali presenti nella maggior parte delle pareti cellulari vegetali e appartengono al gruppo di polisaccaridi che concorrono a formare la fibra alimentare, la quale influenza il metabolismo del glucosio e diminuisce la quantità di colesterolo nel siero del sangue. La pectina, con un più alto contenuto di gruppi metossilici, ha un apporto maggiore e quindi risulta più efficace.

Ad oggi le principali fonti di pectine sono la polpa della mela e la buccia dell'arancia, con contenuti intorno all'1%. La struttura della pectina dipende dalla fonte, compresa la fase di sviluppo del frutto o vegetale da cui proviene (Nielsen, 2010).

Una molecola di pectina è costituita da tre polisaccaridi tenuti insieme da legami covalenti (Velisek, 2016):

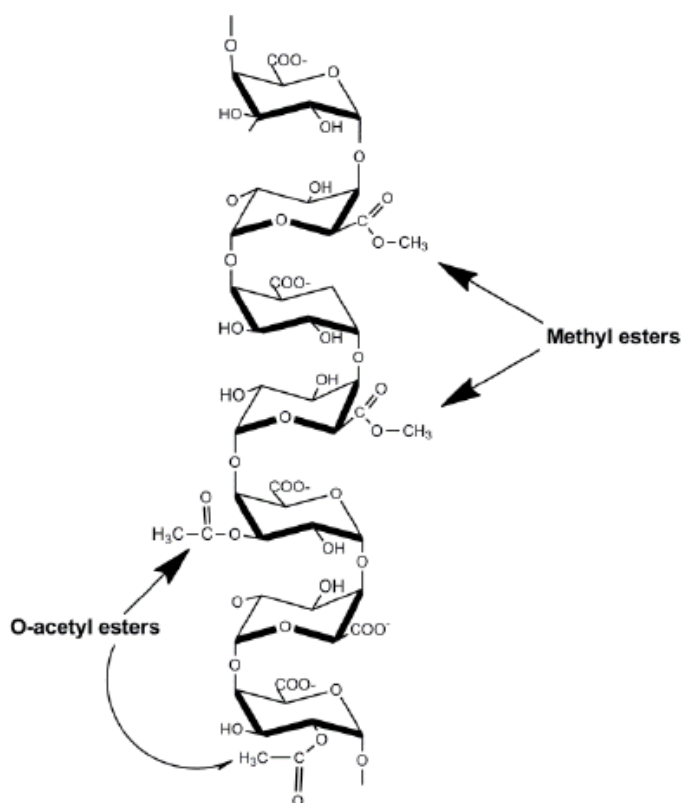
- Omogalatturonani: la struttura di base consiste di polimero chiamato spesso acido poligalatturonico formato da una catena lineare di 25-100 unità di acido D-galatturonico legate con legami  $\alpha$ -(1→4). Le unità di acido galatturonico possono essere metilate, con percentuali di esterificazione medie del 70%. Le unità esterificate non presentano carica elettrica, mentre le rimanenti unità contengono gruppi carbossilici dissociati ed hanno carica negativa; tramite legami con ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , unità cariche negativamente appartenenti a catene diverse permettono l'interconnessione di diverse catene polisaccaridiche. Inoltre, le singole unità di galatturonani possono essere acetilate in posizione



C2 o C3, con aumento del grado di idrofobicità; tuttavia, salvo rare eccezioni, il grado di acetilazione delle pectine è piuttosto basso.

Il grado di metilazione, invece, è definito come la percentuale di gruppi carbossilici esterificati: se esso supera il 50% si parla di pectine altamente metossilate, mentre se è inferiore al 50% si parla di pectine poco metossilate.

In figura 1.32 è riportata la struttura descritta;



**Figura 1.32.** Struttura primaria di un omogalatturonano

- ramnogalatturonani I: il ramnogalatturonano di tipo I (figura 1.X2) è caratterizzato da grado di polimerizzazione circa 1000 e contiene catene di acido  $\alpha$ -D-galatturonico con  $\alpha$ -L-ramnospiranosio terminale legato con legami  $\alpha$ -(1→2). Il contenuto totale di ramnosio in queste pectine è 1-4%. I residui galatturonosilici e ramnosilici sono approssimativamente in rapporto 2:1; alcune unità sono molecole di acido galatturonico metilate, mentre la metà dei residui ramnosidici contengono residui di acido galatturonico sul C4. Metà dei residui ramnosilici contiene un acido galatturonico residuo in C-4.

Alcune molecole di questo tipo di pectine contengono anche una significativa quantità di ramificazioni con un consistente numero di unità di

arabinosio e galattosio; tali catene hanno la struttura di arabinani e arabinogalattani e sono legate alla catena principale principalmente mediante legami al C3 o al C4 di molecole di ramnosio. La molecola di ramnosio è incompatibile con la conformazione dei poligalatturonati e per questo la loro localizzazione nella catena determina le dimensioni di certe sovrastrutture che giocano un ruolo chiave nella formazione di gel.

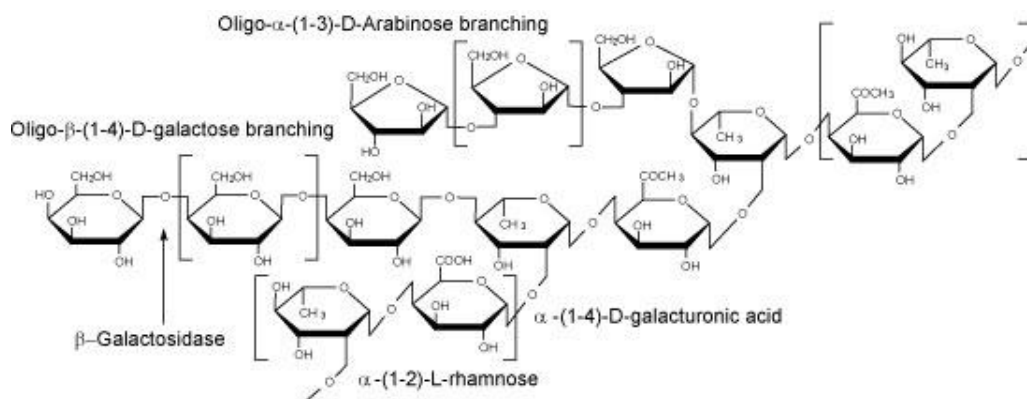


Figura 1.33. Struttura primaria di ramnogalatturonano I

- ramnogalatturonani II. Il ramnogalatturonano di tipo II (figura 1.33) è un polimero a basso peso molecolare, il cui grado di polimerizzazione è circa 60 e il suo peso molecolare circa 4.8 KDa. E' caratterizzato da una catena principale formata da unità di acido  $\alpha$ -D-galatturonico unite da legami  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Catene laterali costituite da acidi  $\alpha$  e  $\beta$ -D-galattopiranuronici,  $\alpha$  e  $\beta$ -D-ramnopiranosio,  $\alpha$ -D-galattopiranosio,  $\alpha$ -L-fucopiranosio,  $\alpha$ -L-arabinopiranosio,  $\beta$ -L-arabinofuranosio,  $\alpha$ -D-xilopiranosio e acido D-glucopiranurico sono connesse alla catena principale. Le catene laterali contengono anche quattro residui di zuccheri inusuali derivanti da 3-C-(idrossimetil)- $\beta$ -D-eritrofuranosio conosciuto come  $\beta$ -D-apiofuranosio ( $\beta$ -D-Apif), 3-C-carbossi-5-deossi- $\beta$ -L-xilofuranosio ( $\beta$ -L-AcefA, acido acerico), acido 3-deossi- $\beta$ -D-lyxo-ept-2-ulopirananarico ( $\beta$ -D-Dhap) e acido 3-deossi- $\beta$ -D-manno-ott-2-ulopiranosonico ( $\beta$ -D-Kdop). Lo xilosio e il fucosio sono in parte presenti come eteri 2-O-metilici.



formano gel solamente in presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . I gel sono comunque termo-reversibili.

Gel termo reversibili più solidi si formano in presenza di alginato di sodio in condizioni acide, in presenza di piccole quantità di zucchero e assenza di ioni calcio. Le proprietà meccaniche di questi gel dipendono dal grado di esterificazione delle pectine e dal rapporto pectina/alginato. Gel stabili si formano da alginati con alto contenuto di acido guluronico e pectine con grado di esterificazione intorno al 70%.

- Interazione con proteine. Le molecole di pectine hanno una carica elettrica negativa in ambiente neutro ( $\text{pKa} = 3,5$ ), e perciò reagiscono con polimeri che hanno cariche positive, come le proteine (in soluzioni con  $\text{pH} < \text{pI}$ ). Ad esempio, in condizioni acide, la pectina stabilizza la caseina, permettendo il trattamento termico di prodotti caseari fermentati. Inoltre, l'interazione proteina-pectina influenza la consistenza di derivati della frutta.
- Idrolisi. Le pectine sono idrolizzate in soluzioni acide o basiche e in presenza di specifici enzimi, quali pectinesterasi, che catalizzano l'idrolisi dei metil esteri, pectin de-polimerasi, pectinacetilesterasi, che che idrolizzano via i gruppi acetili e ramnagalatturonasi, che insieme alle pectinacetilesterasi, spostano via oligosaccaridi contenenti ramnosio.  
L'idrolisi degli esteri metilici delle pectine a basso grado di esterificazione ad opera di pectinesterasi presenti ad esempio in ciliegie, agrumi, pomodori e carote porta all'interazione degli acidi liberi formati con gli ioni bivalenti presenti, e ciò può portare alla gelificazione spontanea (nei succhi della frutta) o all'indurimento (nella lavorazione di patate o cavolfiore).
- Determinazioni analitiche. Sebbene esse rappresentino un polisaccaride molto importante in campo alimentare, non esistono metodologie ufficiali per la loro determinazione sperimentale. Alcuni metodi che sono stati pubblicati prevedono la precipitazione delle pectine mediante alcol da marmellate e gelatine. Un altro metodo prevede la saponificazione in soluzione di idrossido di sodio, seguita da acidificazione aggiunta di  $\text{Ca}^{2+}$  per la precipitazione delle pectine. Il pectato di calcio è raccolto, lavato, asciugato e dosato per gravimetria (Nielsen, 2010).

Il grado di esterificazione (DE) può essere misurato direttamente per titolazione prima e dopo la saponificazione. Prima, la pectina isolata è lavata con alcol acidificato al fine di convertire i gruppi carbossilato in gruppi carbossilici liberi, quindi viene lavato via l'eccesso di acido. A questo punto, una dispersione di acido pectinico in H<sub>2</sub>O è titolata con una base diluita, che può essere una soluzione di NaOH standardizzata, per determinare la percentuale di gruppi esteri carbossilici non esterificati. La base in eccesso è aggiunta per saponificare i gruppi esteri metilici. La retro-titolazione con acido standardizzato per determinare l'eccesso di base seguente la saponificazione, fornisce il grado di esterificazione. In alternativa il grado di esterificazione può essere determinato tramite gascromatografia (GC) o NMR (Nielsen, 2010).

### **Applicazioni delle pectine**

La pectina commerciale è essenzialmente un polimetil estere dell'acido  $\alpha$ -D-galatturonico a vario grado di esterificazione, e, talvolta, di ammidazione. Ciò è dovuto al fatto che nella produzione delle pectine commerciali la maggior parte dello zucchero neutro viene rimossa.

E' usata principalmente per marmellate, gelatine, surgelati e come sostituto di grassi e/o zuccheri in cibi a basso contenuto calorico. Nel settore farmaceutico è utilizzato per ridurre il livello di colesterolo nel sangue e per i disturbi gastrointestinali (Singh, et al., 2001)

Alcuni processi manifatturieri ricorrono all'uso di enzimi pectolitici di origine microbica per incrementare la resa nella produzione dei succhi di frutta e mantenere la loro chiarezza. Le preparazioni pectolitiche hanno trovato uso anche nell'industria enologica, dello zucchero e altri settori.

L'isolamento delle pectine è basato sull'estrazione da soluzioni acquose acidificate (pH=1,5-3) a temperature di 60-100°C. Gli estratti vengono quindi concentrati per evaporazione o essiccamento. Le pectine commerciali prodotte sono ottenute da precipitazione usando ioni metallici che formano sali insolubili con le pectine (ad esempio Al<sup>3+</sup>), o per precipitazione di soluzioni di pectine con alcol (etanolo o propan-2-olo) (Vesilek, 2016).

#### *1.6.4 Polisaccaridi nel melograno*

Secondo studi e ricerche fino ad oggi effettuate, i polisaccaridi estratti dalla buccia del melograno hanno mostrato capacità antiossidanti e notevoli proprietà di inibizione anti glicazione e tirosinasi (Rout et al., 2007).

Un recente studio ha dimostrato che un galattomannano estratto dalla buccia del frutto di *Punica granatum* L. presenta attività immunomodulanti di lavaggio del radicale libero (Joseph et al., 2012), così come presenta attività antitumorale nei topi di questo composto non tossico di origine vegetale, riducendo il tumore da solo o in combinazione con doxorubicina, in ruolo di coadiuvante (Joseph et al., 2013; Sreelekha et al., 2008). Oltretutto, questo tipo di composti provenienti dalla buccia della melagrana sono in grado di inibire la proliferazione di cellule tumorali umane (osteosarcoma) inducendo apoptosi essenzialmente attraverso un percorso di segnalazione mitocondriale (Li et al., 2014).

Ad oggi, da ricerche in letteratura, nessuno degli studi sui polisaccaridi estratti dal melograno ha tenuto conto delle varietà Wonderful dalla Puglia.

Al contempo, è noto che i polisaccaridi costituiscono una parte importante della fibra alimentare solubile fermentescibile. Possono mostrare attività prebiotica in quanto sono in grado di stimolare la crescita di batteri benefici nel colon, contribuendo in questo modo al mantenimento di un buon stato di salute dell'intestino (Khatib, 2015). Una composizione microbica intestinale equilibrata conferisce benefici grazie alla modulazione del metabolismo e delle funzioni immunitarie, mentre gli squilibri microbici sono associati a disturbi metabolici e/o malattie (Di Gioia et al., 2014; Tremaroli et al., 2012 ).

In letteratura spesso viene utilizzato il termine "buccia" per indicare l'esocarpo (la buccia reale) e il mesocarpo insieme, senza una reale distinzione tra queste due parti del frutto (Viuda-Martos et al., 2010).

Per ora non ci sono molti studi su mesocarpo ed esocarpo presi singolarmente come potenziale fonte di polisaccaridi bioattivi (Kathib, 2015).

## 2. OBIETTIVI

Il lavoro di questa tesi si inserisce in un progetto più ampio, volto alla valorizzazione degli scarti del melograno (*Punica granatum* L.), quali possibili fonti di polisaccaridi; l'attenzione si è focalizzata inizialmente su mesocarpo ed esocarpo. Una preliminare ricerca bibliografica ci ha permesso poi di decidere di concentrarsi principalmente sul mesocarpo, in quanto da studi recenti è emerso che l'esocarpo dà basse rese di polisaccaridi e non risulta quindi essere una buona fonte di tali molecole. Inoltre, dati del nostro gruppo di lavoro hanno evidenziato forti analogie qualitative fra i polisaccaridi di mesocarpo ed esocarpo, non avendo quindi quest'ultima parte elementi aggiuntivi di interesse neanche dal punto di vista qualitativo.

Sulla base di tali premesse, questo lavoro di tesi si è focalizzato sulla caratterizzazione della componente polisaccaridica del mesocarpo. Lo studio si è sviluppato principalmente prendendo in considerazione la varietà Wonderful, originaria della California e fra le più coltivate in Italia e in tutto l'Occidente. I campioni analizzati sono di provenienza pugliese.

Gli obiettivi principali sono stati:

1. La ottimizzazione di un metodo per l'estrazione quantitativa e il frazionamento mediante etanolo dei polisaccaridi da mesocarpo
2. La caratterizzazione chimica dei polisaccaridi presenti nelle varie frazioni, con riferimento anche alla presenza di pectine.

Per la caratterizzazione chimica si è deciso di utilizzare una combinazione di tre tecniche analitiche strumentali:

- $^1\text{H-NMR}$ : per la caratterizzazione delle frazioni polisaccaridiche, con particolare riferimento al grado di acetilazione e metilazione e alla presenza di unità ramnosidiche e galatturoniche. Tale approccio ha permesso anche di fare valutazioni sulla presenza di pectine.
- SEC (size exclusion chromatography): per la caratterizzazione dei volumi idrodinamici tramite cromatografia di esclusione molecolare delle frazioni polisaccaridiche, finalizzata alla valutazione dei range di pesi molecolari dei polisaccaridi presenti nelle varie frazioni;
- IEC (ionic exchange chromatography): per la caratterizzazione chimica della componente monosaccaridica dopo idrolisi acida dei polisaccaridi più

abbondanti; l'approccio richiesto una preventiva dialisi delle frazioni sottoposte ad idrolisi al fine di rimuovere eventuali impurezze, ed in particolare mono- e disaccaridi presenti.

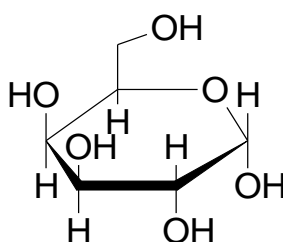


### 3. PARTE SPERIMENTALE

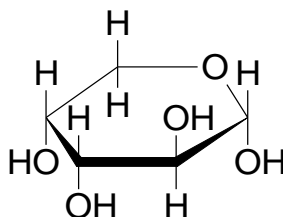
#### 3.1. Standard e reagenti

I principali standard e reagenti utilizzati per l'estrazione e la caratterizzazione dei polisaccaridi sono di seguito elencati:

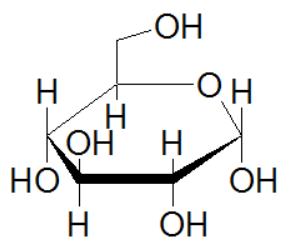
- D-(+)-galattosio (monosaccaride di formula bruta  $C_6H_{12}O_6$ , azienda produttrice Fluka, grado di purezza >99%)



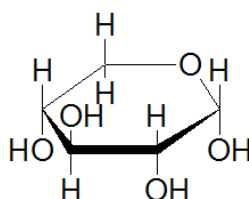
- L-(+)-arabinosio (monosaccaride di formula bruta  $C_5H_{10}O_5$ , azienda produttrice Fluka, grado di purezza >99%)



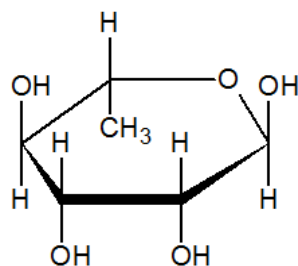
- D-(+)-glucosio (monosaccaride di formula bruta  $C_6H_{12}O_6$ , azienda produttrice Fluka, grado di purezza >99%)



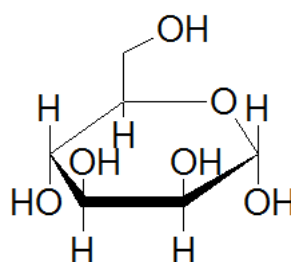
- D-(+)-xilosio (monosaccaride di formula bruta  $C_5H_{10}O_5$ , azienda produttrice Fluka, grado di purezza >99%)



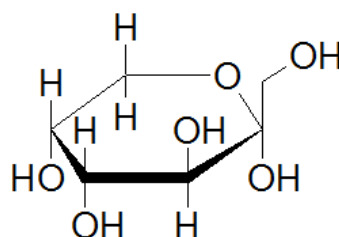
- L-(+)-ramnosio (monosaccaride di formula bruta  $C_6H_{12}O_5$ , azienda produttrice Fluka, grado di purezza >99%)



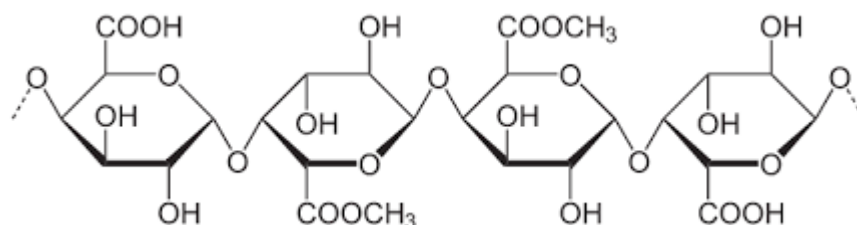
- D-(+)-mannosio (monosaccaride di formula bruta  $C_6H_{12}O_6$ , azienda produttrice Fluka, grado di purezza >99%)



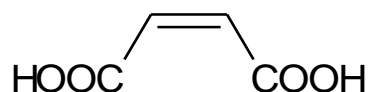
- D-(-)-fruttosio (monosaccaride di formula bruta  $C_6H_{12}O_6$ , azienda produttrice Anala R.)



- Pectine a diverso grado di esterificazione ( $\geq 85\%$  e  $55-70\%$ ) (eteropolisaccaridi, azienda produttrice Sigma Aldrich,)



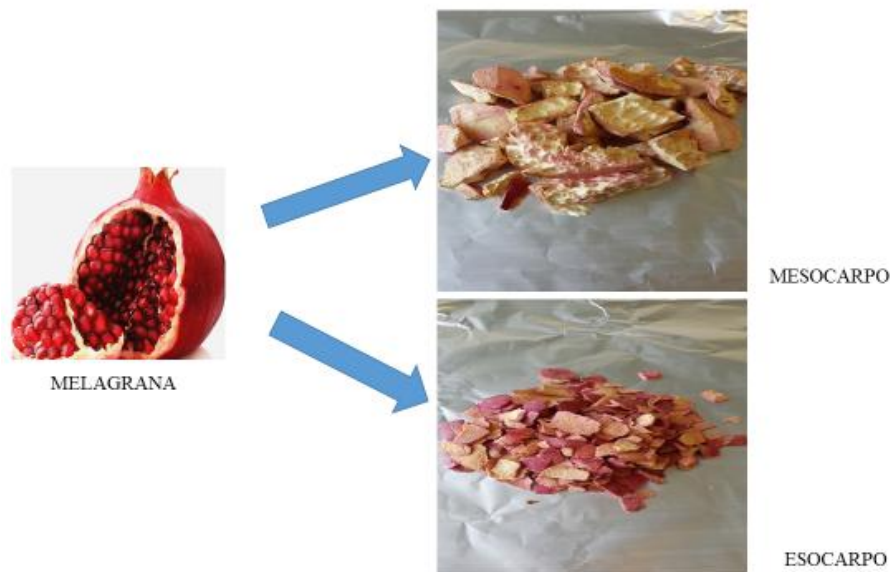
- Acido maleico (acido bicarbossilico di formula bruta  $C_4H_4O_4$ , azienda produttrice Merck, grado di purezza 98%)



- Etanolo assoluto (alcol di formula bruta  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )
- Acido trifluoroacetico 2N (azienda produttrice Fluka)
- Blue dextran: miscela di destrani a diversi pesi molecolari, usata come standard (Sigma-Aldrich, USA). In particolare sono stati utilizzati standard a pesi molecolari di: 2.000 KDa; 1.100 KDa; 410 KDa; 150 KDa; 50 KDa.

### 3.2. Estrazione dei polisaccaridi

Gli esperimenti sono stati eseguiti su campioni di *Punica granatum* L. di varietà Wonderful provenienti dalla Puglia, raccolti nell'autunno del 2015. I frutti sono stati lavati con acqua corrente fredda, dopodiché il mesocarpo è stato separato manualmente dall'esocarpo e dagli arili (figura 3.1)



**Figura 3.1.** Mesocarpo ed esocarpo liofilizzati di *Punica granatum* L. (cv Wonderful)

Il mesocarpo, gli arili e l'esocarpo sono stati congelati e successivamente liofilizzati. Il mesocarpo liofilizzato è stato poi macinato per poter procedere all'estrazione dei polisaccaridi. Il lavoro si è poi focalizzato principalmente allo studio del mesocarpo.

Le fasi di decozione e l'estrazione dei polisaccaridi sono state condotte in duplicato. Per la decozione del mesocarpo e l'estrazione dei polisaccaridi, si è seguito il

procedimento schematizzato nella seguente figura 3.2

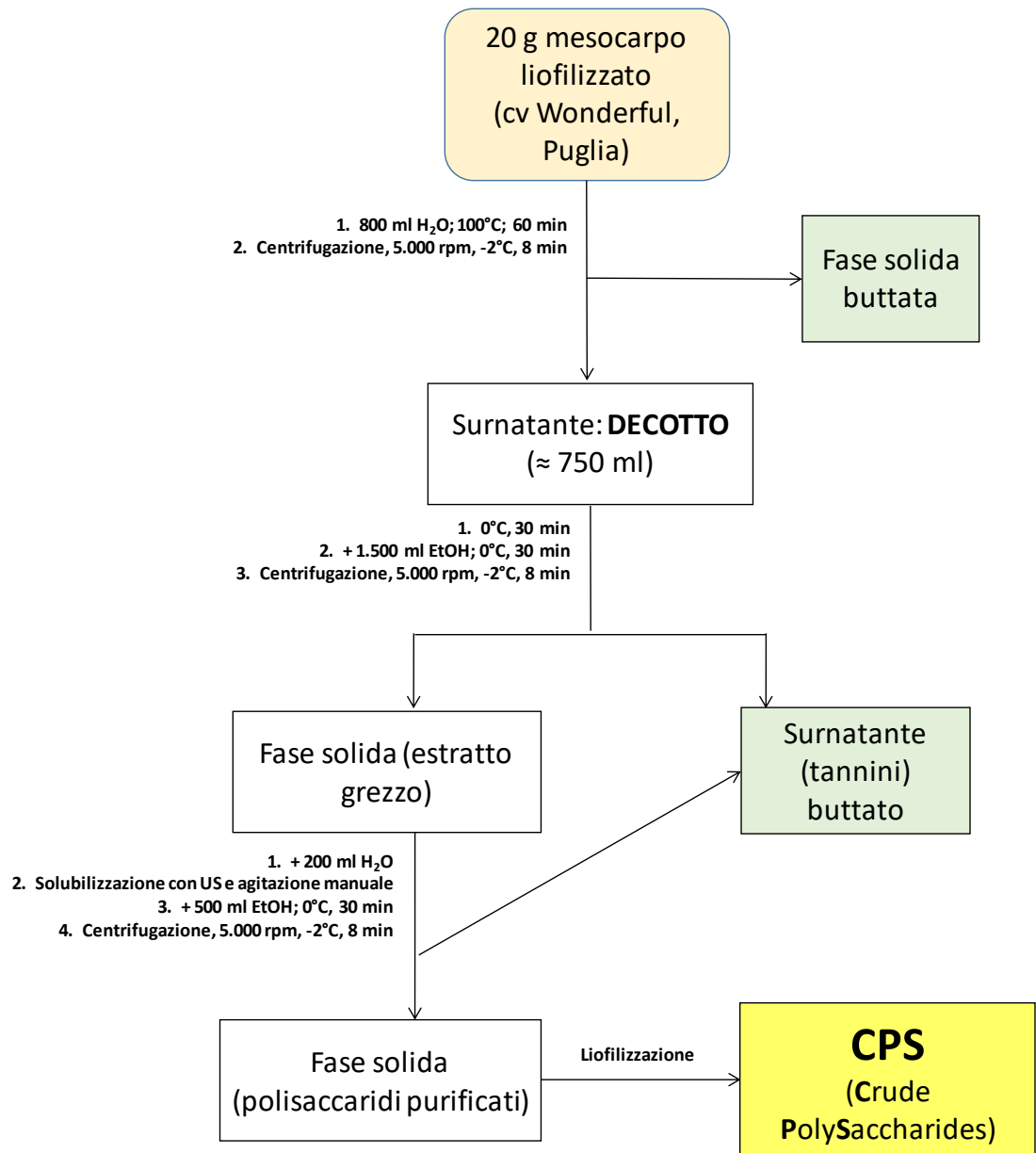


Figura 3.2. Schema generale di estrazione dei polisaccaridi da mesocarpo

In particolare, 20 g di mesocarpo liofilizzato e macinato sono stati solubilizzati in 800 ml di acqua distillata all'interno di una beuta. La soluzione è stata posta sulla piastra riscaldante e agitata per mezzo di un agitatore magnetico fino a bollitura e tenuta in queste condizioni per 60 minuti. Il campione ottenuto, raffreddato a temperatura ambiente, è stato centrifugato a 5.000 rpm per 8 minuti a -2°C. Il residuo solido è stato buttato, mentre il surnatante (decotto) è stato raccolto in una nuova beuta e raffreddato in bagno di ghiaccio per mezz'ora ottenendo un volume di circa 750 ml. Al decotto sono stati aggiunti 1,5 L di EtOH al 96% e la soluzione ottenuta è stata messa in bagno di

ghiaccio per mezz'ora, e quindi centrifugata a 5.000 rpm per 8 minuti a una temperatura di -2°C. Il precipitato, costituito dai polisaccaridi grezzi, è stato raccolto come in figura 3.3, mentre il surnatante, contenente i tannini, è stato trasferito in una beuta.

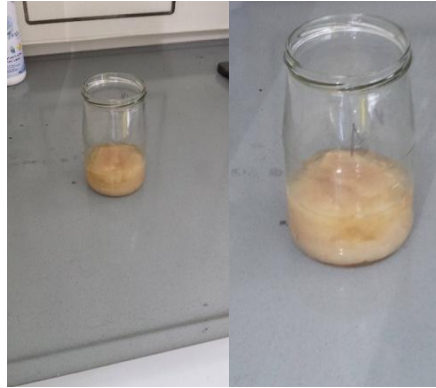


Figura 3.3. Polisaccaridi grezzi

I polisaccaridi precipitati dal decotto di mesocarpo sono stati sottoposti a lavaggio, come schematizzato in figura 3.4

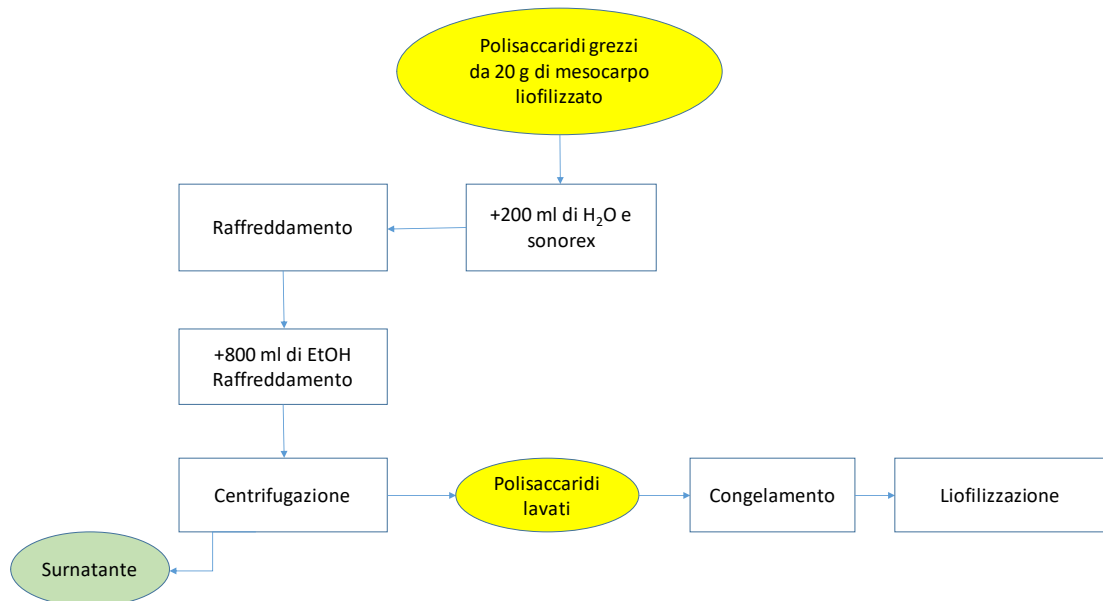
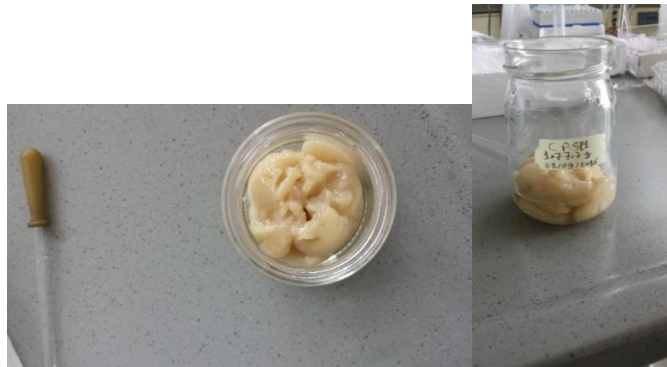


Figura 3.4. Schema di lavaggio dei polisaccaridi grezzi

In particolare, per ognuno dei due replicati sono stati aggiunti 200 ml di acqua distillata ai polisaccaridi grezzi e il miscuglio ottenuto è stato sonicato e agitato manualmente fino a completa solubilizzazione, ottenendo così circa 400 ml totali di soluzione. Questa è stata trasferita in una beuta che è stata poi posta in un bagno di ghiaccio per mezz'ora, sono stati poi aggiunti 800 ml di EtOH al 96%, e la soluzione

così ottenuta è stata sottoposta a nuovo raffreddamento in bagno di ghiaccio per mezz'ora. La soluzione etanolica di polisaccaridi raffreddata è stata sottoposta a centrifugazione a 5.000 rpm per 10 minuti a -2°C.

Il residuo solido (polisaccaridi lavati) è stato trasferito in un barattolo precedentemente tarato ed etichettato come CPSP1 (Crude PolySaccharides Puglia 1) (figura 3.4) mentre il surnatante è stato posto in una beuta (figura 3.5).



**Figura 3.4.** Polisaccaridi lavati (CPSP1)



**Figura 3.5.** Estratti dopo primo (a sinistra) e secondo lavaggio (a destra)

Ai polisaccaridi CPSP1 è stata aggiunta H<sub>2</sub>O sufficiente a solubilizzarli con l'ausilio di un sonicatore; il campione è stato liofilizzato e conservato in un barattolino di vetro scuro chiuso fino alla successiva fase di frazionamento.

### **3.3. Frazionamento dei polisaccaridi**

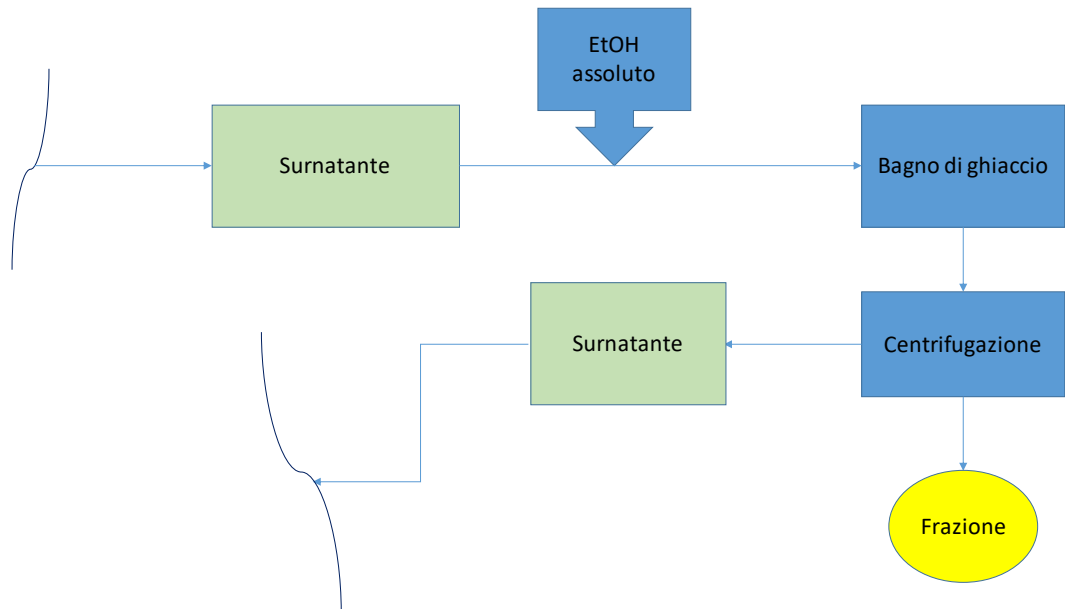
I polisaccaridi estratti dal mesocarpo, lavati e liofilizzati sono stati sottoposti a frazionamento. A tal fine sono stati pesati esattamente circa 100 mg di campione, trasferiti in Falcon e solubilizzati in 15 ml di acqua con l'ausilio del vortex e del sonicatore. La soluzione ottenuta è stata centrifugata a 3.000 rpm per 3 minuti a -2°C.

La parte solida che si ottiene dalla centrifugazione costituisce la frazione zero (F0), mentre il surnatante (circa 14 ml) è stato trasferito in un cilindro graduato cui sono stati aggiunti 5 ml di EtOH assoluto. La soluzione è stata raffreddata e sottoposta a centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, ottenendo in questo modo un residuo solido di colore giallo/nero, che costituisce la frazione 1 (F1). Il surnatante è stato trasferito in un altro cilindro di plastica cui sono stati aggiunti 2,5 ml di EtOH assoluto.

Il cilindro con surnatante + EtOH è stato posto in un bagno di ghiaccio per 5 minuti, per poi essere sottoposto a centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a -2°C. Dalla centrifugazione è stato ottenuto un residuo gelatinoso (F2). Il surnatante è stato trasferito in un nuovo cilindro cui sono stati aggiunti 2,5 ml di EtOH assoluto, quindi è stato lasciato a raffreddare per 4 minuti in bagno di ghiaccio. E' quindi stata eseguita una centrifugazione a 14.000 rpm per 8 minuti a temperatura ambiente, grazie alla quale è stato ricavato un residuo gelatinoso bianco (F3). Il surnatante ottenuto è stato trasferito in un nuovo cilindro cui è stato aggiunto 1 ml di EtOH assoluto, raffreddato in bagno di ghiaccio per 4 minuti e quindi centrifugato per 8 minuti a 14.000 rpm a temperatura ambiente, ottenendo un residuo gelatinoso (F4) e un nuovo surnatante. Al nuovo surnatante, trasferito in un nuovo cilindro, sono stati aggiunti 1,5 ml di EtOH assoluto, quindi è stato lasciato a raffreddare per 20 minuti in bagno di ghiaccio e centrifugato a 14.000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, ottenendo un residuo gelatinoso giallo (F5) e il surnatante. Successivamente è stato preso il surnatante, ad esso sono stati aggiunti 2,5 ml di EtOH assoluto, lasciato in bagno di ghiaccio per 10 minuti, quindi centrifugato a 5.000 rpm per 15 minuti a -2°C, ottenendo un residuo solido bianco (F6). Al surnatante sono stati aggiunti 2,5 ml di EtOH assoluto, quindi è stato lasciato a raffreddare in bagno di ghiaccio per 5 minuti. A questo punto è stata fatta una centrifugazione a 5.000 rpm per 5 minuti a una temperatura di -2°C. E' stato ottenuto un residuo gelatinoso (F7) e il surnatante, e a quest'ultimo sono stati aggiunti 2 ml di EtOH assoluto, quindi è stato lasciato raffreddare in bagno di ghiaccio per 4

minuti, a cui è seguita una centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a 0°C. Da questo ultimo frazionamento abbiamo ottenuto un residuo gelatinoso (F8).

Lo schema generale utilizzato per il frazionamento è illustrato in figura 3.6. Complessivamente sono state raccolte 9 frazioni, come riassunto in tabella 3.1.



**Figura 3.6.** Schema generale adottato per l'ottenimento delle varie frazioni



| 100mg CPS/15ml di H <sub>2</sub> O<br>Vortex + UltraSuoni (US) |   |  |   |   |   |  |  |   |
|--|---|--|---|---|---|--|--|---|
| F0   | F1  | F2   | F3  | F4  | F5  | F6   | F7   | F8  |
| Centrifugazione a 3.000 rpm per 3 minuti a -2°C                | +5ml EtOH assoluto                        | +2,5 ml EtOH assoluto                            | +2,5 ml EtOH assoluto                     | +1ml EtOH assoluto                        | +1,5ml EtOH assoluto                      | +2,5ml EtOH assoluto                             | +2,5ml EtOH assoluto                             | +2ml EtOH assoluto                              |
|  | Centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti | Bagno di ghiaccio per 5 minuti                   | Bagno di ghiaccio per 4 minuti            | Bagno di ghiaccio per 4 minuti            | Bagno di ghiaccio per 20 minuti           | Bagno di ghiaccio per 10 minuti                  | Bagno di ghiaccio per 5 minuti                   | Bagno di ghiaccio per 4 minuti                  |
| Residuo solido   | Residuo solido di colore giallo/nero      | Centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a -2°C | Centrifugazione a 14.000 rpm per 8 minuti | Centrifugazione a 14.000 rpm per 8 minuti | Centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti | Centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a -2°C | Centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a -2°C | Centrifugazione a 5.000 rpm per 15 minuti a 0°C |
|  |   | Residuo gelatinoso                               | Residuo gelatinoso bianco                 | Residuo gelatinoso                        | Residuo gelatinoso giallo                 | Residuo solido bianco                            | Residuo gelatinoso                               | Residuo gelatinoso                              |

**Tabella 3.1.** Schematizzazione delle varie fasi del frazionamento

### 3.4. Analisi strumentali

Le varie frazioni ottenute sono state evaporate mediante rotavapor a una temperatura di circa 30°C per eliminare EtOH. I residui ottenuti sono stati liofilizzati ottenendo i vari campioni (figura 3.7) pronti ad essere utilizzati per le analisi strumentali, quali <sup>1</sup>H-NMR e SEC.

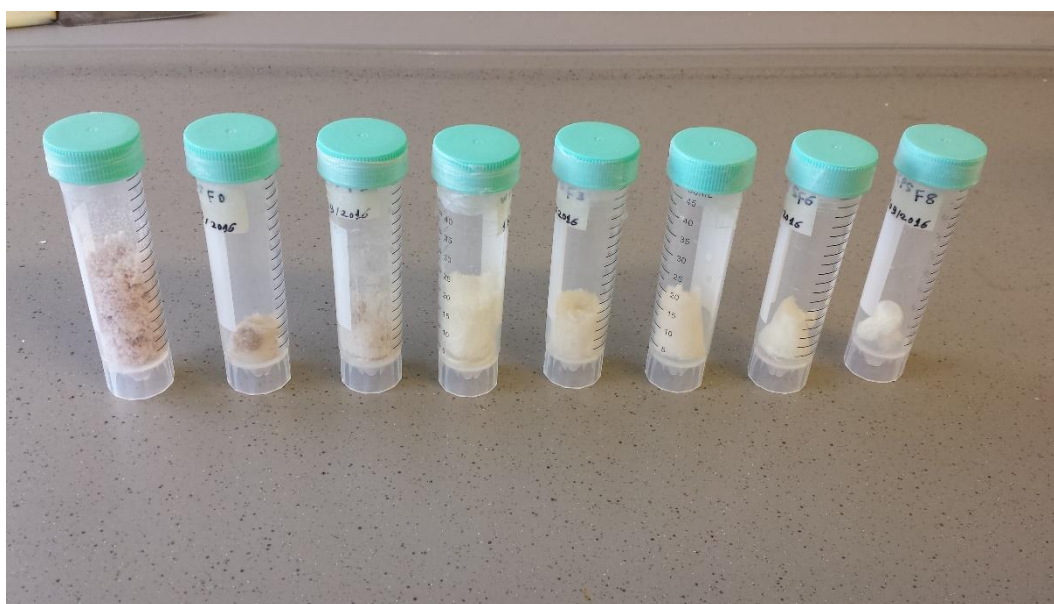


Figura 3.7. Frazioni di polisaccaridi liofilizzati

Le frazioni F5 e F7 liofilizzate sono state inoltre dializzate per 72 ore a 5°C in una membrana di nitrocellulosa (Medicell International Ltd) con un filtro con cut-off di 12-14 KDalton, mentre le altre frazioni sono state analizzate senza preventiva dialisi a causa delle basse quantità disponibili

#### 3.4.1. Analisi <sup>1</sup>H-NMR

Un'aliquota (tabella 3.2) dei campioni liofilizzati è stata sciolta in circa 1 ml di acqua deuterata (D<sub>2</sub>O), e alla soluzione ottenuta è stato aggiunto acido maleico come standard interno (tra 25 e 50 µl di una soluzione 5,1 mg/ml).

Gli esperimenti <sup>1</sup>H-NMR sono stati effettuati usando uno strumento Bruker 400 MHz. La valutazione quantitativa è stata effettuata secondo le linee guida di riferimento (Eurolabs, 2014), applicando un protocollo già usato (Khatib, et al., 2016).

| Frazione per <sup>1</sup> H-NMR | Peso mg | µl acido maleico | ml D <sub>2</sub> O |
|---------------------------------|---------|------------------|---------------------|
| WPCPSF1                         | 5,50    | 25               | 1,00                |
| WPCPSF2                         | 5,95    | 25               | 0,65                |
| WPCPSF3                         | 6,09    | 25               | 0,80                |
| WPCPSF4                         | 4,33    | 25               | 0,80                |
| WPCPSF5                         | 4,71    | 50               | 0,80                |
| WPCPSF6                         | 4,35    | 50               | 0,80                |
| WPCPSF7                         | 6,09    | 50               | 0,80                |
| WPCPSF8                         | 3,33    | 50               | 1,00                |

**Tabella 3.2.** Quantità delle frazioni liofilizzate usate per analisi <sup>1</sup>H-NMR

Sono stati effettuati gli spettri protonici di una serie di pectine e monosaccaridi da utilizzare come riferimento per le successive analisi. La tabella 3.3 riassume le concentrazioni dei vari monosaccaridi in 1 ml di acqua deuterata (D<sub>2</sub>O), mentre la tabella 3.4 quelle delle due pectine commerciali.

| Monosaccaride            | Peso mg/ml |
|--------------------------|------------|
| D(+)-Galattosio          | 5,95       |
| L(+)-Arabinosio          | 5,16       |
| D(+)-Glucosio anidro     | 6,56       |
| D(+)-Xilosio             | 5,88       |
| L(+)-Ramnosio monoidrato | 5,46       |
| D(+)-Mannosio            | 6,60       |
| D(-)-Fruttosio           | 6,90       |

**Tabella 3.3.** Quantità di monosaccaridi standard usate per analisi <sup>1</sup>H-NMR

| Pectina                     | Peso mg/ml |
|-----------------------------|------------|
| Pectina esterificata 55-70% | 6,39       |
| Pectina esterificata ≥85%   | 6,74       |

**Tabella 3.4.** Quantità di pectine standard usate per analisi <sup>1</sup>H-NMR

### 3.4.2. Size Exclusion Chromatography (SEC)

La Size Exclusion Chromatography è stata effettuata al fine di stimare il range di pesi molecolari dei polisaccaridi delle varie frazioni, differenziandoli in funzione del loro volume idrodinamico. Un'aliquota (Tabella 3.5) di ognuno dei campioni liofilizzati delle 8 frazioni è stata solubilizzata in acqua distillata, come riportato in tabella, prima di essere ulteriormente diluita 10 volte.

| Frazione SEC | Peso mg | H <sub>2</sub> O ml |
|--------------|---------|---------------------|
| WPCPSF1      | 7,22    | 10,0                |
| WPCPSF2      | 4,21    | 5,0                 |
| WPCPSF3      | 4,24    | 2,5                 |
| WPCPSF4      | 4,27    | 5,0                 |
| WPCPSF5      | 4,38    | 5,0                 |
| WPCPSF6      | 4,40    | 5,0                 |
| WPCPSF7      | 4,75    | 5,0                 |
| WPCPSF8      | 2,42    | 5,0                 |

**Tabella 3.5.** Per ogni frazione è riportata la quantità di campione pesata e il volume di acqua in cui è stato sciolto prima della diluizione

Le soluzioni sono state analizzate utilizzando un cromatografo Varian ProStar HPLC (Varian, USA), munito di un rivelatore ad Indice di Rifrazione (RI) e una colonna Biosep s4000 (Phenomenex, USA).

Le frazioni sono state analizzate utilizzando acqua di grado HPLC come eluente e un flusso di 0,6 mL/min. Gli standard utilizzati per la valutazione del volume idrodinamico dei vari picchi rivelati nelle varie frazioni sono destrani a differenti pesi molecolari: 2.000 kDa, 1.100 kDa, 410 kDa, 150 kDa e 50 kDa (Sigma-Aldrich, USA).

### 3.4.3. Cromatografia di scambio ionico (IEC)

La frazione 5 e la frazione 7 dializzate, oltre ad alcune frazioni di una estrazione e frazionamento precedenti a quelle relative a questo lavoro di tesi, sono state idrolizzate in ambiente acido per essere poi analizzate mediante cromatografia a scambio ionico, IEC (Erbing et al., 1995). Per l'idrolisi, sono stati pesati 5 mg di ciascuna frazione e a questi sono stati aggiunti 1 ml di acido trifluoroacetico 2N; la soluzione è stata tenuta a una temperatura di 120°C per 120 minuti e successivamente è stata raffreddata in un

bagno di ghiaccio; a questo punto è stata effettuata ultrafiltrazione a 3.500 g per 20 minuti, usando dispositivi filtranti cut-off a 3000 Dalton (Amicon Ultra-4, Millipore, Billerica, MA).

La soluzione filtrata è stata prima disidratata mediante rotavapor a una temperatura di 37°C, e successivamente solubilizzata in 1 ml di H<sub>2</sub>O distillata. Questa procedura di evaporazione/risospensione è stata ripetuta tre volte, con lo scopo di rimuovere il TFA, che può interferire nella successiva analisi cromatografica.

I campioni così ottenuti sono stati lavati due volte con acqua MilliQ, ridisciolti in 1 ml di acqua deionizzata e poi analizzati per cromatografia a scambio ionico (IEC), con l'ausilio di un cromatografo ionico ICS-2500 provvisto di un rivelatore amperometrico pulsato ED50, di un elettrodo di lavoro in oro e una colonna Carbowac PA1 250x4mm, (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). La figura 3.8 schematizza il procedimento descritto. Non è stato possibile completare le analisi IEC delle frazioni 5 e 7 prima della fine di questo lavoro di tesi a causa di problemi strumentali.

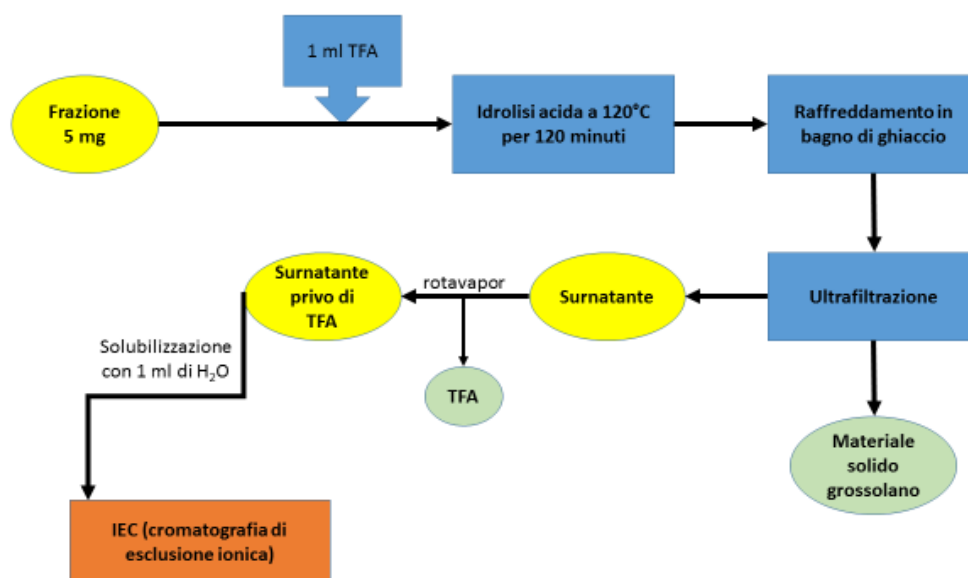


Figura 3.8. Processo di idrolisi acida e IEC

Come eluenti sono stati utilizzati H<sub>2</sub>O MilliQ (eluente A), idrossido di sodio 0,185 M (eluente B) e acetato di sodio 0,488 M (eluente C). La composizione dell'eluente è variata come segue: nei primi 7 minuti 84% di A, 15% di B e 1% di C; dal minuto 7 al 13 minuti, 50% di B e 50% di C; dal minuto 13 a 30 minuti, 84% di A, 15% di B e 1% di C. Il flusso di eluizione era di 1 ml/min. I monosaccaridi sono stati rivelati in base al tempo di ritenzione dei monosaccaridi standard.

Sono state ripetute tre iniezioni degli standard, in modo da ottenere un tempo di ritenzione medio per ogni monosaccaride, e il CV% non ha mai superato il 5%.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Questo lavoro di tesi si inserisce in uno studio di caratterizzazione dei polisaccaridi estratti dal melograno, principalmente dal mesocarpo.

### 4.1. Risultati preliminari e premessa

I primi dati ottenuti derivano da un precedente frazionamento che ha permesso di recuperare due frazioni polisaccaridiche principali (F3\* e F4\*). Queste sono state dializzate per rimuovere gli zuccheri semplici e idrolizzate in ambiente acido per valutare, mediante la loro composizione monosaccaridica la natura pectinica della loro componente principale. La frazione monosaccaridica è stata valutata mediante cromatografia di scambio ionico; la seguente tabella 4.1 riporta le percentuali molari dei vari monosaccaridi presenti nelle due frazioni analizzate:

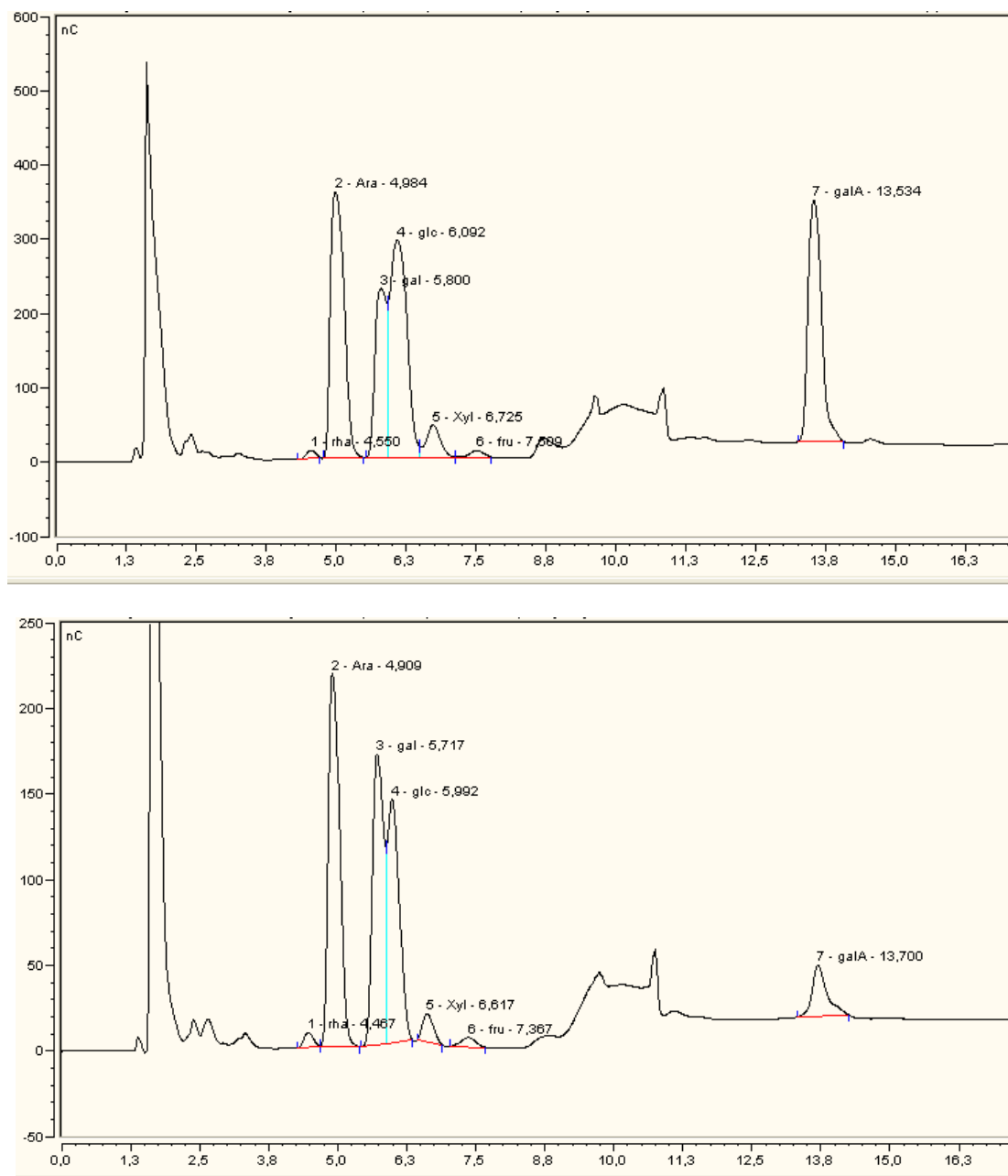
|                            | % molare F3* | % molare F4* |
|----------------------------|--------------|--------------|
| <b>Ramnosio</b>            | 1,46         | 4,16         |
| <b>Arabinosio</b>          | 18,76        | 30,64        |
| <b>Galattosio</b>          | 11,08        | 26,96        |
| <b>Glucosio</b>            | 15,17        | 16,82        |
| <b>Xilosio</b>             | 3,81         | 3,63         |
| <b>Fruttosio</b>           | 0,75         | 1,55         |
| <b>Acido galatturonico</b> | 48,97        | 16,24        |

**Tabella 4.1.** Composizione monosaccaridica delle frazioni 3\* e 4\* ottenute dal primo frazionamento

La frazione F3\* risulta particolarmente ricca di acido galatturonico. Questo dato, unito all'alta percentuale di metilazione rivelata via <sup>1</sup>H-NMR (dati non mostrati), ha permesso di ipotizzare che la frazione F3 fosse in buona parte costituita da pectine a prevalenza omogalatturonica.

La frazione F4\*, invece, risulta costituita da una frazione minore di acido galatturonico; inoltre, la presenza di quantità di ramnosio minori ma confrontabili all'acido galatturonico e di quantità significative di arabinosio, ha permesso di ipotizzare che in questa frazione siano presenti pectine a prevalenza ramnogalatturonica (tipo I).

Nella seguente figura 4.1 si riportano i cromatogrammi IEC delle due frazioni



**Figura 4.1.** Cromatogrammi IEC delle frazioni F3\* e F4\* ottenuti dal primo frazionamento

L'analisi di size exclusion chromatography via gel permeation ha tuttavia messo in evidenza che queste due frazioni non erano molto pure (dati non mostrati), ma a loro volta costituite da ulteriori sottofrazioni polisaccaridiche.

Pertanto, il principale obiettivo di questo lavoro è stato quello di ottimizzare il frazionamento del pool di polisaccaridi, al fine di ottenere frazioni più possibile pure e di iniziare la loro caratterizzazione.



Lo studio effettuato ha previsto tre fasi in successione, come illustrato anche in figura 4.2:

- Estrazione dei polisaccaridi dal decotto di melograno
- Frazionamento dei polisaccaridi estratti
- Caratterizzazione delle varie frazioni mediante analisi strumentali



**Figura 4.2.** Schematizzazione generale del procedimento

In particolare, i polisaccaridi sono stati estratti dal mesocarpo, come descritto nel paragrafo 3.2, ottenendo i polisaccaridi grezzi (CPS, **C**rude **P**oly**S**accharides), che sono poi stati frazionati, come descritto nel paragrafo 3.3. Tutte le frazioni ottenute, escluse la 5 e la 7, sono state analizzate tal quali mediante  $^1\text{H-NMR}$  e SEC. Invece, le frazioni 5 e 7, che erano le più abbondanti, sono state dializzate prima delle analisi strumentali, in modo da eliminare eventuali molecole a basso peso molecolare, e principalmente i monosaccaridi che avrebbero interferito con le analisi. Su tali frazioni, dopo idrolisi acida del prodotto dializzato, è stata effettuata anche cromatografia di scambio ionico (IEC, Ionic Exchange Chromatography) mediante cromatografo Dionex (figura 4.3).

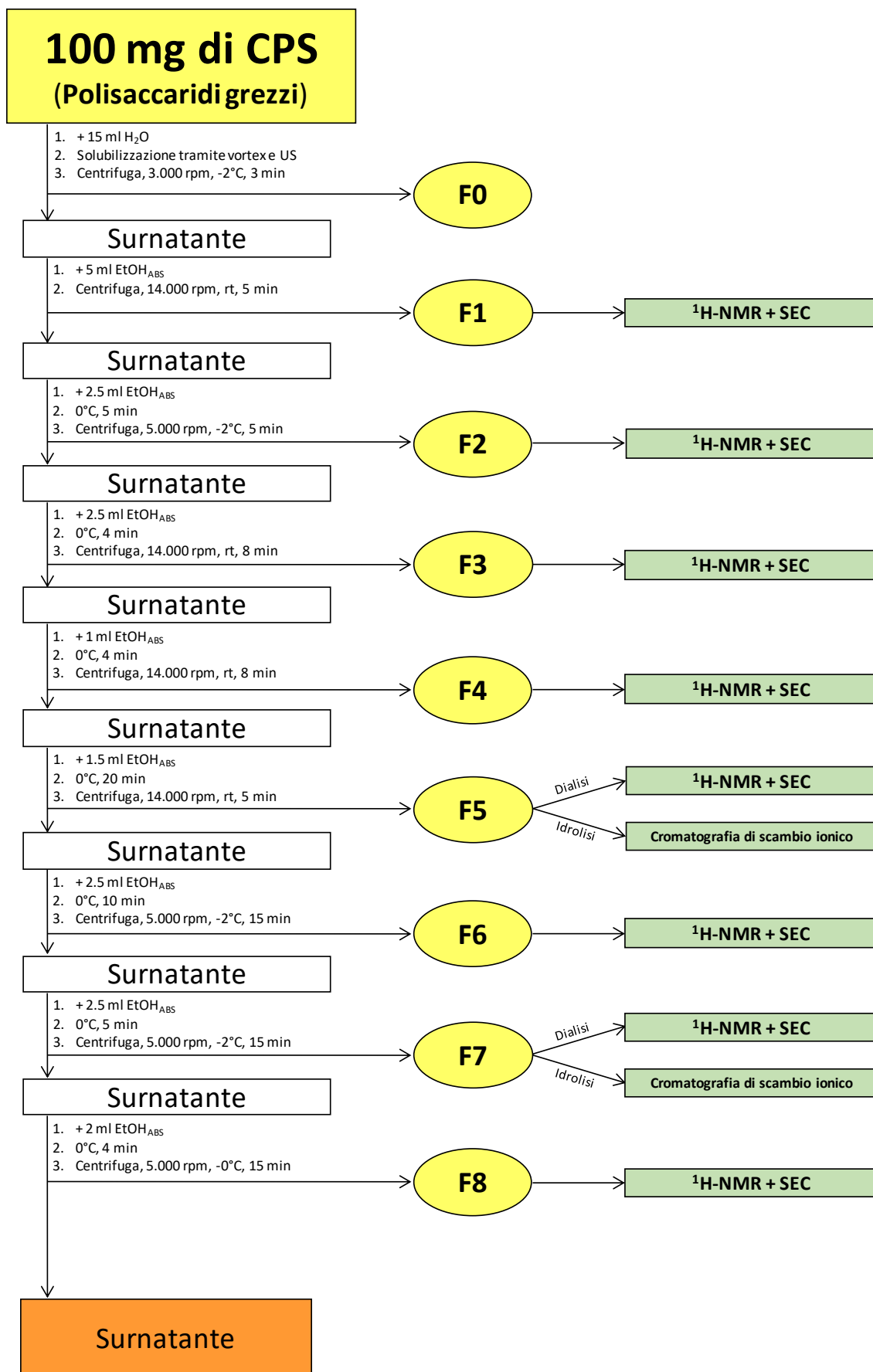


Figura 4.3. Schema generale di frazionamento e analisi strumentali

## **4.2. Ottenimento dei polisaccaridi grezzi (CPS) dal mesocarpo**

Da una ricerca bibliografica, abbiamo constatato che in letteratura non sono presenti molti studi relativi all'estrazione e alla caratterizzazione dei polisaccaridi dal mesocarpo della melagrana. Pertanto, l'estrazione è stata effettuata sulla base di un metodo messo a punto recentemente (Khatib et al., 2015), metodo che prevede la decozione e che è lo stesso utilizzato per ottenere le frazioni relative ai risultati preliminari descritti nel precedente paragrafo. Questo metodo presenta alcuni importanti vantaggi:

- non è tossico;
- bassi costi;
- è applicabile su larga scala;
- prevede l'uso di acqua, solvente economico e non inquinante.

La decozione (vedi paragrafo 3.2) è stata condotta sotto agitazione e riscaldamento per favorire la solubilizzazione dei polisaccaridi, insolubili a temperatura ambiente.

Durante la fase di bollitura della soluzione acquosa è importante mantenere un rapporto mesocarpo:H<sub>2</sub>O = 1:40, rapporto ottimale per maggior ottimizzare le rese di estrazione. Il livello di solvente deve essere mantenuto costante con eventuale aggiunta di H<sub>2</sub>O.

Alla fine della fase di bollitura, la soluzione è stata fatta raffreddare e centrifugata a -2°C, in quanto la temperatura bassa favorisce la separazione delle due fasi (residuo solido e surnatante).

Il residuo solido, non contenente molecole di nostro interesse (Khatib et al., 2015) è stato buttato. Al surnatante sono stati aggiunti 1,5 l di EtOH al 96% e la soluzione ottenuta è stata messa in bagno di ghiaccio per mezz'ora per favorire la precipitazione dei polisaccaridi. E' noto, infatti, che oltre alla bassa temperatura, la precipitazione, è favorita anche dalla presenza di EtOH, che diminuisce il potere di solvatazione dell'acqua favorendo la precipitazione dei polisaccaridi. Il precipitato così ottenuto costituisce la frazione di polisaccaridi grezzi (Crude Polysaccharides, CPS).

Il lavaggio dei polisaccaridi grezzi è stato eseguito aggiungendo 200 ml di H<sub>2</sub>O distillata. Il campione è stato poi trattato mediante ultrasuoni e agitazione manuale per purificare i polisaccaridi eliminando tannini (l'acqua è un ottimo solvente per l'estrazione dei composti fenolici polari quali i tannini idrolizzabili).

La frazione polisaccaridica solida ottenuta è stata prima asciugata eliminando la frazione liquida idroalcolica grossolana con una pipetta, poi essiccata mediante liofilizzazione.

La resa in polisaccaridi a partire dal mesocarpo liofilizzato è stata circa del 9,0%.

### 4.3. Frazionamento dei polisaccaridi

Frazionamento preliminare. Per l'ottimizzazione del frazionamento dei polisaccaridi siamo partiti da un metodo di prova precedentemente descritto (Khatib et al., 2015). Il metodo, è stato ottimizzato in corso d'opera, come di seguito descritto.

Il campione di polisaccaridi essiccato è stato frazionato partendo da circa 100 mg; tale quantità è stata scelta sia in maniera da non impiegare troppo campione, sia per un fatto pratico, in quanto quantitativi più grandi non erano al momento necessari per le indagini da effettuare.

Preliminarmente la procedura usata per la prima aliquota di campione frazionato è schematizzata in figura 4.4. In particolare, 104,0 mg di campione sono stati solubilizzati in 15 ml di H<sub>2</sub>O distillata con l'ausilio degli ultrasuoni. La soluzione ottenuta è stata centrifugata a 3.000 rpm per 3 minuti, ad una temperatura di -2°C, per eliminare il residuo solido non sciolto in H<sub>2</sub>O.

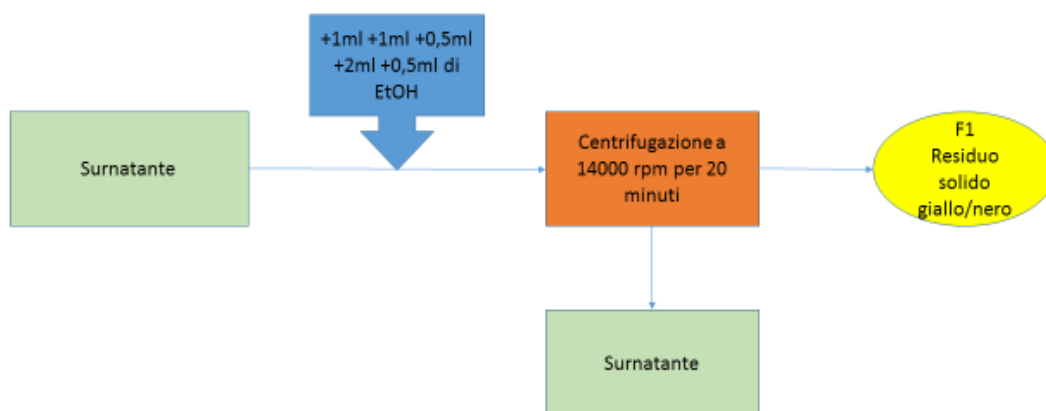
| 104mg CPS /15ml di H <sub>2</sub> O<br>motore rotativo + sonificatore |   |  |   |   |  |   |   |
|---|---|--|---|---|--|---|---|
| F0  | F1  | F2   | F3  | F4  | F5   | F6  | F7  |
| Centrifugazione a 3000 rpm per 3 minuti a 0°C                         | +5ml EtOH assoluto  | +2,5 ml EtOH assoluto                          | +2,5 ml EtOH assoluto                     | +2,5 ml EtOH assoluto                     | 2 ml EtOH assoluto                             | +2 ml EtOH assoluto                             | +2,5ml EtOH assoluto                            |
| Residuo solido  | Centrifugazione a 14000 rpm per 20 minuti<br><br>Residuo solido di colore giallo/nero | Centrifugazione a 5000 rpm per 20 minuti a 0°C | Centrifugazione a 14000 rpm per 20 minuti | Centrifugazione a 14000 rpm per 20 minuti | Centrifugazione a 5000 rpm per 15 minuti a 0°C | Centrifugazione a 5000 rpm per 12 minuti a -2°C | Centrifugazione a 5000 rpm per 15 minuti a -2°C |

Figura 4.4. Schema di frazionamento utilizzato inizialmente

Il surnatante è stato trasferito in un cilindro graduato, mentre il residuo solido è stato conservato come frazione zero (F0).

Per ottenere la prima frazione (F1), abbiamo proceduto come mostrato in figura 4.5: è stato aggiunto 1 ml di EtOH assoluto, quindi ancora 1 ml di EtOH assoluto, ed abbiamo agitato manualmente. Prima di mescolare si è notata la presenza di due fasi distinte: una liquida in basso e una simil-gelatinosa in alto. Successivamente è stato aggiunto ancora 0,5 ml di EtOH assoluto, agitato, poi aggiunti ancora 2 ml e successivamente altri 0,5 ml di EtOH assoluto ed agitato di nuovo; in tutto sono stati aggiunti 5 ml di etanolo assoluto al surnatante. La miscela è stata trasferita in provette eppendorf e centrifugata a 14.000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente (circa 20°C).

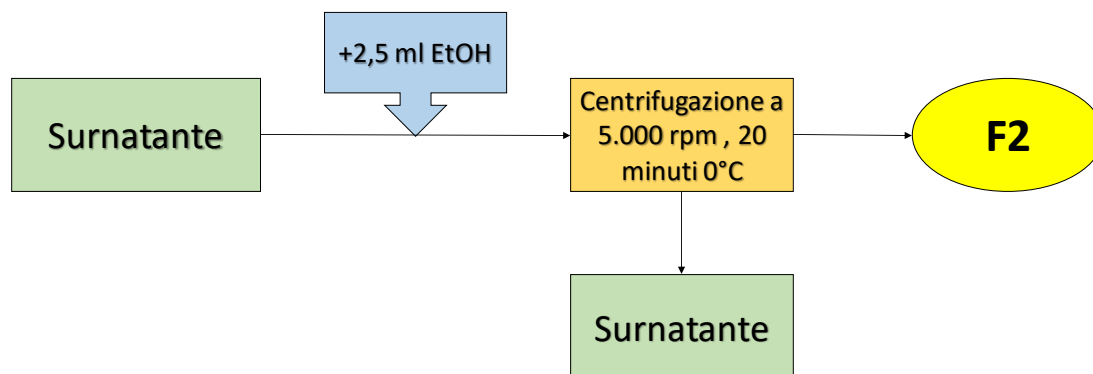
Il residuo ottenuto (F1) era solido di colore nero con sfumature gialle. Si è ipotizzato che tale colorazione potesse essere dovuta alla presenza di impurezze.



**Figura 4.5.** Prima procedura di frazionamento per ottenere F1

Nei successivi campioni CPS da frazionare, per ottenere la F1 il tempo di centrifugazione è stato ottimizzato, passando prima a 8 minuti e poi a 5 minuti, mantenendo gli altri parametri invariati e notando che il risultato ottenuto era il medesimo, con notevole risparmio di tempo.

Per ottenere la frazione 2, abbiamo proceduto inizialmente aggiungendo 2,5 ml di EtOH assoluto e successivamente centrifugato a 5.000 rpm per 20 minuti a 0°C (figura 4.6).



**Figura 4.6.** Prima procedura di frazionamento per ottenere F2

Il residuo ottenuto, sebbene appena centrifugato si presentasse come un residuo simil-gelatinoso, tendeva quasi immediatamente a liquefarsi.

Abbiamo quindi proceduto ad inserire un raffreddamento in bagno di ghiaccio per qualche minuto prima della centrifugazione, che è stata adesso condotta a bassa temperatura per 15 minuti finali. In questo modo si è ottenuta una frazione simil-gelatinosa che stavolta non si scioglieva col passare del tempo.

Poiché i frazionamenti del primo campione eseguiti senza raffreddamento prima della centrifugazione presentavano tutti dei residui che spesso subivano rapida liquefazione, abbiamo proceduto a lavorare su ogni frazionamento successivo, sulla base del risultato ottenuto per la frazione 2, abbassando la temperatura. In aggiunta, abbiamo gradualmente diminuito il tempo di centrifugazione fino a giungere a un tempo ideale, sia da un punto di tempo guadagnato per poter procedere ad eseguire più frazionamenti, sia dipendente dal fatto che la centrifuga quando è in azione, dato il moto che genera, produce calore e quindi va a scaldare la soluzione formata dal surnatante e dall'EtOH assoluto.

Nella prima procedura di frazionamento abbiamo ottenuto sette frazioni; cercando di proseguire il frazionamento per un'eventuale ottava frazione non avevamo nessun residuo né solido né gelatinoso. Le frazioni più abbondanti erano le F4, F5 e F6.

Ipotizzando che in queste condizioni in alcune frazioni fossero precipitati insieme polisaccaridi di natura diversa a causa della quantità di etanolo aggiunto, abbiamo proceduto a una diminuzione di etanolo aggiunto; ad esempio, per la F4 si è passati dai 2,5 ml aggiunti nella prima procedura, a 1 ml nelle procedure ottimizzate, o nel caso della frazione 5, passando da 2 ml a 1,5 ml aggiunti di EtOH assoluto. È stato anche provato EtOH al 96% al posto di quello assoluto, ma non ottenendo buoni risultati.

*Frazionamento ottimizzato.* Alla luce dei risultati ottenuti precedentemente, abbiamo proceduto con gli ulteriori frazionamenti. Nello specifico, ogni volta sono stati utilizzati circa 100 mg di CPS in modo da avere poi un quantitativo sufficiente delle diverse frazioni che ci permettesse di eseguire le analisi SEC, IEC, e <sup>1</sup>H-NMR.

In tutto sono stati effettuati 12 frazionamenti; trattando in totale circa 1,2 g di CPS; quindi, ognuna delle 8 frazioni (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8) era costituita da 12 frazionamenti riuniti.

Ciascuna frazione è stata evaporata al rotavapor a una temperatura di circa 30°C, per eliminare l'EtOH, e quindi liofilizzata. Le rese in peso secco per ogni frazione sono riportate nella tabella 4.2.

| <b>Frazione</b> | <b>Peso mg</b> | <b>%</b> |
|-----------------|----------------|----------|
| F0              | 114,5          | 9,9      |
| F1              | 345,3          | 29,8     |
| F2              | 7,0            | 0,6      |
| F3              | 8,0            | 0,7      |
| F4              | 62,0           | 5,4      |
| F5              | 305,1          | 26,3     |
| F6              | 59,8           | 5,2      |
| F7              | 252,4          | 21,8     |
| F8              | 3,8            | 0,3      |
| Totale          | 1157,8         | -        |
| Totale senza F0 | 1043,3         | -        |

**Tabella 4.2.** Rese dei frazionamenti eseguiti su 12 aliquote di CPS da circa 100 mg ognuno

I dati riportati in tabella hanno messo in luce un recupero pressoché totale della frazione polisaccaridica sottoposta a frazionamento. Inoltre, dal punto di vista quantitativo, le frazioni più abbondanti sono F1, F5 e F7, con quantità trascurabili di F2,

F3 ed F8.

#### 4.4. SEC (size exclusion chromatography)

I polisaccaridi sono spesso caratterizzati da una struttura ramificata, dovuta alla presenza di unità monosaccaridiche di diversa natura come arabinosio, galattosio e xilosio e alla possibilità di formazione di legami glicosidici in differenti posizioni del singolo monosaccaride. Risulta pertanto difficile valutare esattamente il peso molecolare del singolo polisaccaride e la valutazione viene condotta sulla base del volume idrodinamico della molecola. Le dimensioni dei vari polisaccaridi costituenti le 8 frazioni ottenute sono state quindi valutate in termini di volume idrodinamico mediante la tecnica della Size Exclusion Chromatography (SEC). Per correlare i volumi idrodinamici a dei range di pesi molecolari, i risultati delle analisi in SEC sono stati confrontati con quelli di standard a differenti pesi molecolari. In questa maniera i tempi di ritenzione dei picchi sono stati assegnati a dei range di pesi molecolari dei polisaccaridi costituenti le varie frazioni.

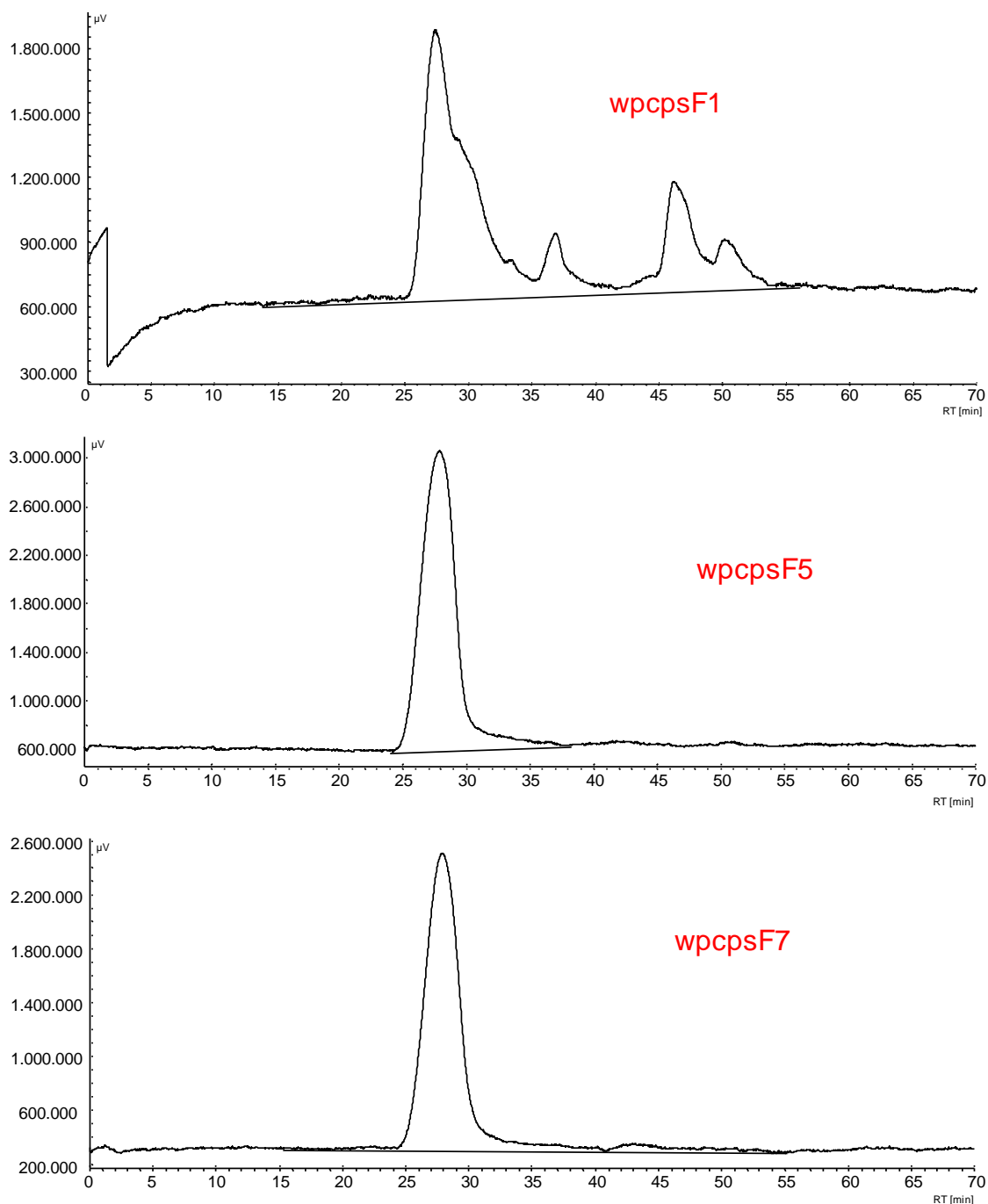
In tabella 4.3 sono riportati i pesi molecolari e i tempi di ritenzione dei vari standard utilizzati. Così, ad esempio, aree di picchi con tempi di ritenzione inferiori a 25 minuti sono stati associati a polisaccaridi con pesi molecolari superiori a 2.000 KDa, aree di picchi con tempi di ritenzione compresi fra 25 e 35 minuti sono stati associati a polisaccaridi con pesi molecolari fra 2.000 KDa e 1.100 KDa e così via.

|   | <b>Tempo di ritenzione<br/>(min)</b> | <b>Pesi<br/>molecolari</b> |
|---|--------------------------------------|----------------------------|
| A | 25,18                                | 2.000.000                  |
| B | 35,45                                | 1.100.000                  |
| C | 36,47                                | 410.000                    |
| D | 38,48                                | 150.000                    |
| E | 40,85                                | 50.000                     |
| F | 48,00                                | disaccaridi                |

**Tabella 4.3.** Tempi di ritenzione e pesi molecolari dei vari standard utilizzati

Nella seguente figura 4.7 sono riportati i cromatogrammi ottenuti dalle 3 frazioni analizzate più abbondanti: F1, F5 e F7.





**Figura 4.7.** SEC delle frazioni 1, 5 e 7

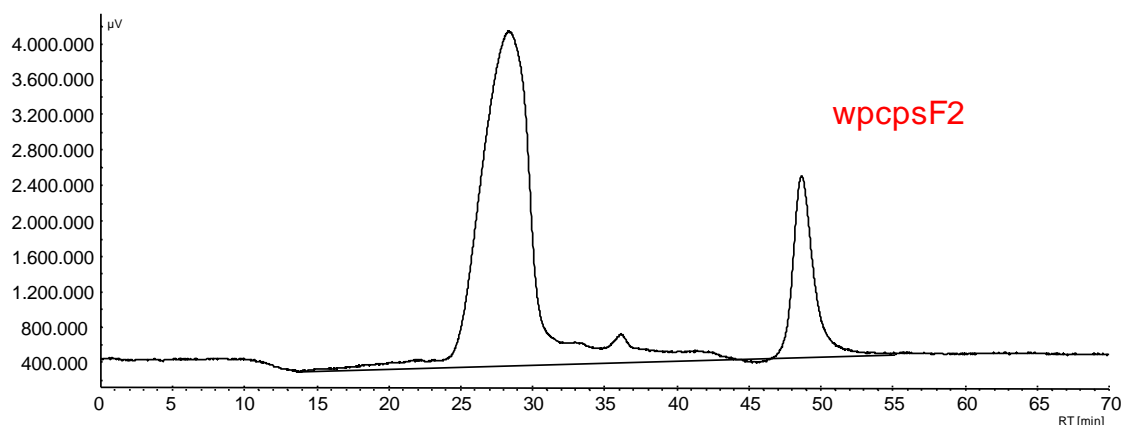
Emerge immediatamente che le frazioni 5 e 7 presentano quasi esclusivamente un grande picco cromatografico con tempi di ritenzione fra 25 e 30 minuti, mentre la frazione 1 presenta diversi picchi in tutto l'intervallo cromatografico di interesse e inoltre una scarsa risoluzione dei picchi. In particolare nella prima frazione si nota la presenza di quattro picchi, con tempi di ritenzione 27,5 minuti, 36,8 minuti, 46,2 minuti, e circa 51 minuti. Il picco a 27,5 minuti rappresenta il picco a intensità maggiore ed è

relativo ai polisaccaridi con massa molecolare di circa 2000 KDa; tale picco presenta anche una spalla destra, che indica la presenza di un altro picco non completamente risolto. Gli altri tre picchi presentano intensità molto minore, evidenziando concentrazioni più basse.

Il confronto fra le tre frazioni deve necessariamente tenere in considerazione il fatto che le frazioni 5 e 7 sono state dializzate prima di essere sottoposte ad analisi SEC e quindi molecole a peso molecolare minore quali disaccaridi e monosaccaridi non erano più presenti al momento dell'analisi; pertanto, l'assenza del picco a circa 48 minuti era prevedibile. Il confronto rimane però valido se si tiene in considerazione la componente polisaccaridica: in tal senso si può concludere che, mentre la frazione 1 risulta poco pura e costituita da polisaccaridi di natura e pesi molecolari molto diversi fra loro, nelle frazioni 5 e 7, il picco con un tempo di ritenzione a 28 minuti, rappresenta la quasi totalità della componente polisaccaridica.

Queste osservazioni di carattere puramente qualitativo permettono già di valutare come poco interessante dal punto di vista applicativo la frazione 1, pertanto nel proseguo del lavoro gli studi successivi di caratterizzazione dei polisaccaridi sono stati rivolti principalmente alle frazioni 5 e 7.

A completamento del quadro analitico ottenuto dalla SEC, nella seguente figura 4.8 sono riportati i cromatogrammi relativi alle frazioni 2, 3, 4, 6, 8.



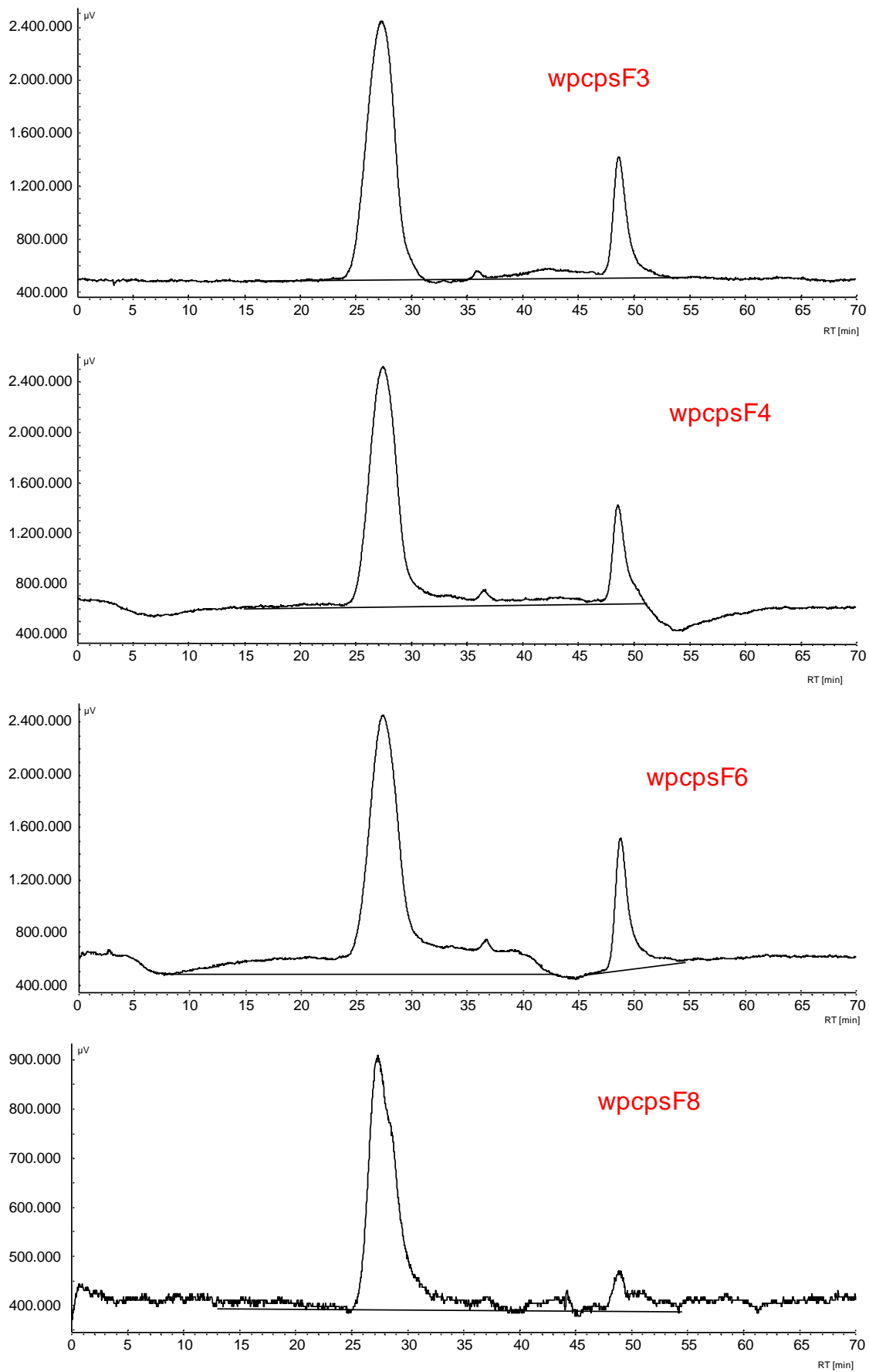


Figura 4.8. SEC delle frazioni 2, 3, 4, 6, 8

In tutte frazioni analizzate si è evidenziata la presenza di un polisaccaride predominante con tempi di ritenzione compresi fra 25 e 30 min.

Nella frazione 2 osserviamo tre picchi, il primo a 28 minuti, che rappresenta il polisaccaride principale; la presenza di un secondo picco a 36,5 minuti e di un terzo picco oltre i 48 minuti, con un'intensità non trascurabile, evidenzia la copresenza di una varietà di polisaccaridi in un ampio range di pesi molecolari e conferma anche la presenza di disaccaridi.

La frazione 3 presenta una situazione molto simile alla frazione 2, ma con intensità dei picchi nettamente inferiori. Infatti, se nella frazione 2 il polisaccaride a 28 minuti aveva intensità di oltre 4.000.000, nella frazione 3 lo stesso picco ha intensità di circa 2.400.000; le stesse considerazioni valgono per gli altri picchi presenti nelle due frazioni. Le frazioni 4 e 6 sono, invece, simili alla frazione 3 sia dal punto di vista qualitativo, che da quello delle intensità dei picchi. Infine, la frazione 8 presenta sempre il picco a più alta concentrazione a un tempo di ritenzione di circa 28 minuti, ma con un valore molto inferiore rispetto a quelli che presentavano le frazioni precedenti (circa 900.000).

Nella tabella 4.4 riportata a pagina seguente sono riportate le percentuali delle aree corrispondenti ai vari range di pesi molecolari presenti nelle varie frazioni.

Tali valori permettono di avere una stima della composizione polisaccaridica percentuale delle varie frazioni. Per tutte le frazioni è nettamente prevalente la frazione polisaccaridica con pesi molecolari compresi fra 1.100 e 2.000 KDa, ma valori uguali o superiori al 90% si sono registrati solamente per le frazioni 5 e 7, oltre alla 8, che tuttavia è risultata essere presente in quantità esigue.

L'analisi SEC ha permesso, in particolare di caratterizzare le frazioni dializzate 5 e 7 come costituite per almeno il 90 % da una frazione polisaccaridica nel range di pesi molecolari 1.100 – 2.000 KDa. Nei prossimi paragrafi l'indagine sulla natura dei polisaccaridi delle varie frazioni sarà focalizzata sia sull'individuazione delle % di metilazione e acetilazione mediante 1H-NMR, sia sulla caratterizzazione del profilo monosaccaridico mediante IEC.

| <b>Frazione</b> | <b>&gt; 2.000 Kda (%)</b> | <b>1.100 - 2.000 Kda (%)</b> | <b>400 - 1.100 Kda (%)</b> | <b>150 - 400 Kda (%)</b> | <b>50 - 150 Kda (%)</b> | <b>&lt; 50 Kda (%)</b> | <b>Disaccaridi (%)</b> |
|-----------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>F1</b>       | n.r.                      | 66.01                        | n.r.                       | 4.59                     | n.r.                    | 16.17                  | 9.34                   |
| <b>F2</b>       | 3.22                      | 74.88                        | n.r.                       | n.r.                     | n.r.                    | n.r.                   | 16.01                  |
| <b>F3</b>       | 4.13                      | 70.67                        | n.r.                       | n.r.                     | n.r.                    | 5.60                   | 17.48                  |
| <b>F4</b>       | 4.35                      | 73.81                        | n.r.                       | n.r.                     | n.r.                    | 4.51                   | 13.66                  |
| <b>F5</b>       | <u>n.r.</u>               | <u>89.83</u>                 | <u>n.r.</u>                | <u>n.r.</u>              | <u>n.r.</u>             | <u>3.35</u>            | <u>n.r.</u>            |
| <b>F6</b>       | 13.97                     | 66.72                        | n.r.                       | 2.62                     | 2.07                    | n.r.                   | 13.20                  |
| <b>F7</b>       | <u>n.r.</u>               | <u>92.13</u>                 | <u>n.r.</u>                | <u>n.r.</u>              | <u>n.r.</u>             | <u>3.03</u>            | <u>n.r.</u>            |
| <b>F8</b>       | n.r.                      | 95.16                        | n.r.                       | n.r.                     | n.r.                    | n.r.                   | 3.79                   |

**Tabella 4.4.** Composizione percentuale dei range di pesi molecolari dei polisaccaridi costituenti le varie frazioni

#### **4.5. IEC**

Per quanto riguarda la IEC, le analisi delle frazioni ottenute in questo lavoro sono ancora in fase di esecuzione e non è stato possibile avere i risultati dei nostri campioni entro la fine del mio lavoro di tesi. L'analisi ha previsto comunque l'idrolisi acida delle due frazioni più significative (F5 e F7) al fine di idrolizzare i polisaccaridi e liberare i monosaccaridi che li costituiscono; la composizione monosaccaridica così ottenuta è in corso di analisi tramite IEC

In questa fase si può ipotizzare un'analogia fra la F3\* relativa ai dati preliminari riportati nel paragrafo 4.1 e la F5 e fra la F4\* e la F7. Una prima conferma di tale ipotesi arriva dai dati <sup>1</sup>H-NMR (vedi prossimo paragrafo) che hanno confermato un'alta percentuale di metilazione della F5. Sembra quindi realistica l'idea che tale frazione sia in buona parte costituita da pectine a prevalenza omogalatturonica. I dati IEC permetteranno di confermare questa ipotesi.

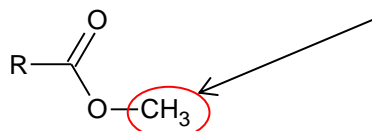
#### **4.6. <sup>1</sup>H-NMR (nuclear magnetic resonance)**

Grazie all'analisi <sup>1</sup>H-NMR è stato possibile caratterizzare ulteriormente i polisaccaridi presenti nelle frazioni ottenute, con particolare riferimento ai gradi di acetilazione e metilazione; inoltre, sulla base di una preventiva caratterizzazione dei monosaccaridi è stato possibile anche indagare la presenza di ramnosio. Infatti, queste porzioni, generalmente presenti in % diverse nei vari polisaccaridi, danno segnali NMR caratteristici e ben definiti, che possono essere usati sia a scopo qualitativo che, talvolta, quantitativo.

Per quanto riguarda l'aspetto quantitativo, le analisi sono state condotte in presenza di uno standard interno, il cui unico segnale risuona in una zona dello spettro NMR libera dai segnali di mono o polisaccaridi; lo standard interno ideale a tal fine è stato individuato nell'acido maleico, che presenta un solo segnale relativo ai due idrogeni olefinici, chimicamente e magneticamente equivalenti, a  $\delta \approx 6,3$  ppm.

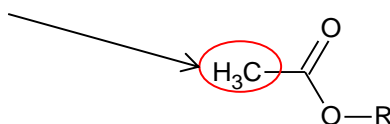
In particolare, i segnali utili alla caratterizzazione delle porzioni menzionate hanno le seguenti caratteristiche:

- O-metile: singoletto a  $\delta \approx 3,7$  ppm tipico degli idrogeni sul carbonio legato all'ossigeno del residuo alcolico degli esteri.



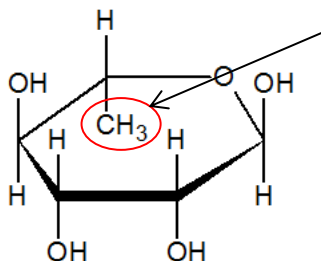
**Figura 4.9.** Origine molecolare del segnale caratteristico per l'O-metile

- O-acetile: singoletto a  $\delta \approx 1,9 - 2,1$  ppm tipico del CH<sub>3</sub> dell'acetile. In alcuni spettri è presente un segnale principale e uno a minore intensità, probabilmente derivanti da -OH acetilati in diverse posizioni delle strutture polisaccaridiche.



**Figura 4.10.** Origine molecolare del segnale caratteristico per l'O-acetile

- ramnosio: doppietto relativo al CH<sub>3</sub> indicato in figura e all'accoppiamento con l'idrogeno sul carbonio adiacente.  $\delta \approx 1,2$  ppm



**Figura 4.11.** Origine molecolare del segnale caratteristico per il ramnosio

Per l'assegnazione del segnale nella regione a  $\delta 1,3 - 1,1$  ppm al ramnosio, è stato fatto un confronto con gli spettri <sup>1</sup>H-NMR dei principali monosaccaridi che potrebbero essere presenti: L-arabinosio (figura 4.12), D-fruttosio (figura 4.13), D-glucosio (figura 4.14), D-mannosio (figura 4.15), L-ramnosio (figura 4.16), D-galattosio (figura 4.17) e D-xilosio (figura 4.18). Da tale confronto, risulta che in nessuno dei monosaccaridi sono presenti segnali intorno ad 1,1 – 1,3 ppm, ad eccezione del ramnosio, che presenta un caratteristico doppietto. Pertanto, i segnali di doppietto che compaiono in quella zona dello spettro nell'analisi dei polisaccaridi sono stati utilizzati per l'identificazione e la quantificazione di residuo di ramnosio.

La presenza di fucosio, un desossi zucchero anch'esso dotato dello stesso gruppo metilico del ramnosio, è stata esclusa perché i dati ottenuti dall'idrolisi acida delle frazioni polisaccaridiche ottenute dal frazionamento preliminare non hanno evidenziato la presenza di questo zucchero.

Oltre al segnale a 1,1 – 1,3 ppm, utile per l'identificazione del ramnosio, solo xilosio e glucosio mostrano un tripletto a  $\delta$  3,15 ppm, mentre tutti gli spettri protonici dei vari monosaccaridi mostrano segnali fra 3,3 e 5,3 ppm. Nei polisaccaridi, quindi, questa zona dello spettro risulta molto complicata e non diagnostica.

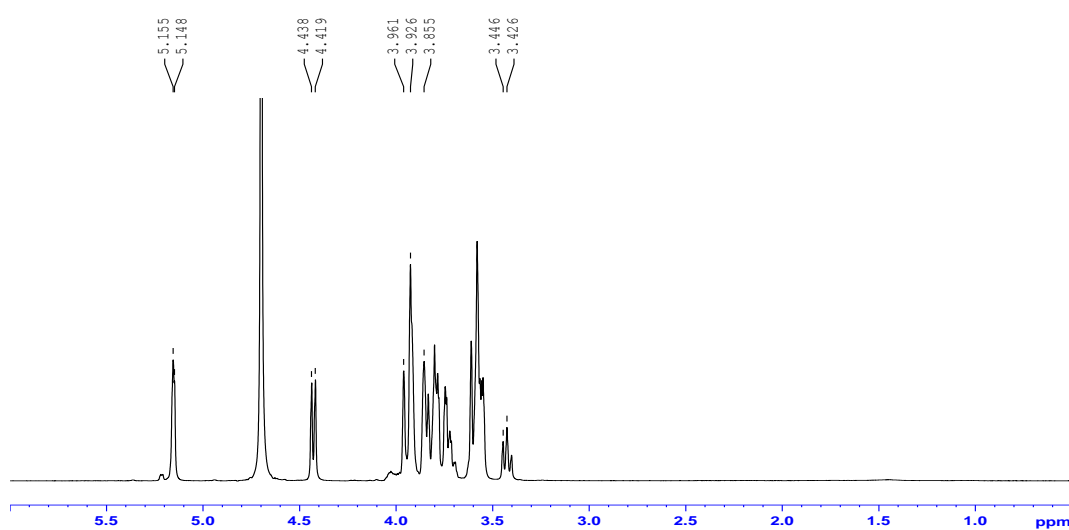


Figura 4.12. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di L-Arabinosio

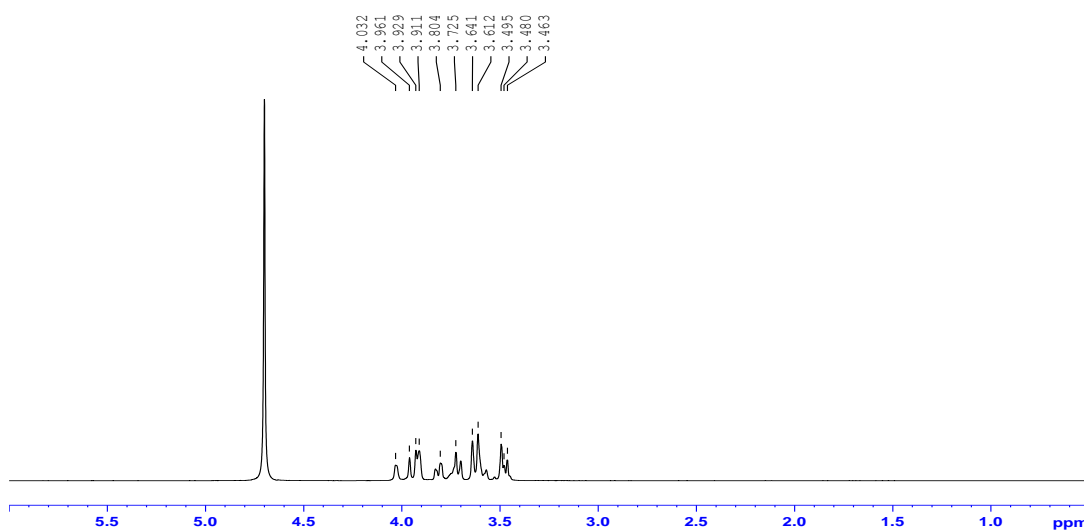


Figura 4.13. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di D-Fruttosio



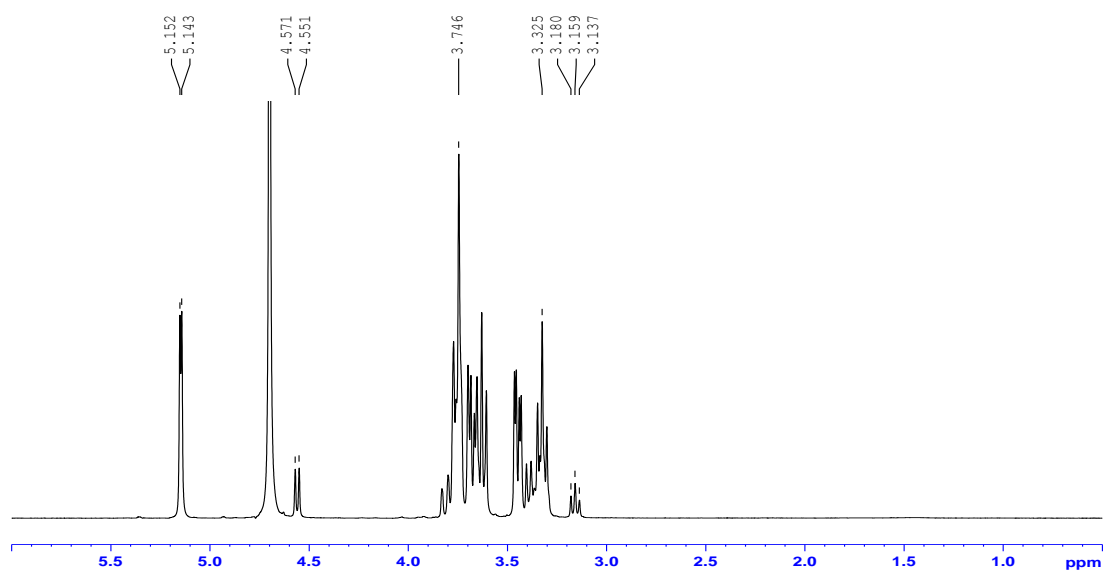


Figura 4.14. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di D-Glucosio

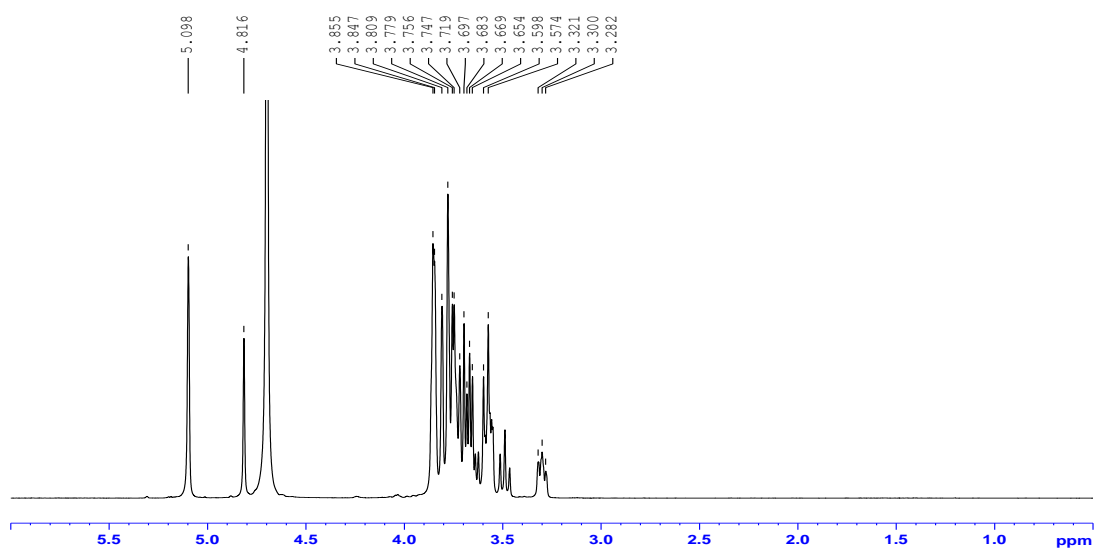


Figura 4.15. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di D-Mannosio

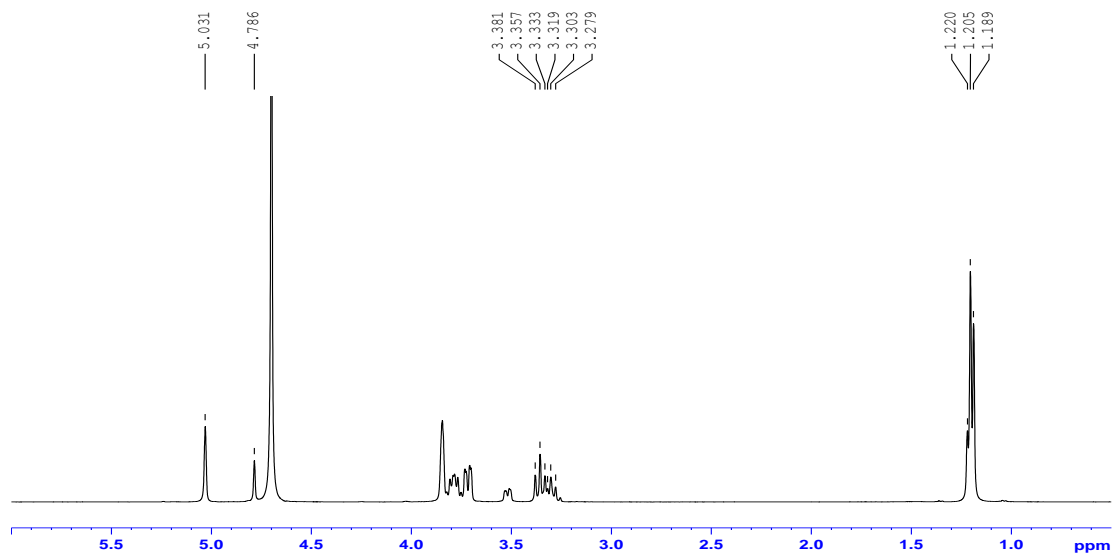


Figura 4.16. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di L-Ramnosio monoidrato

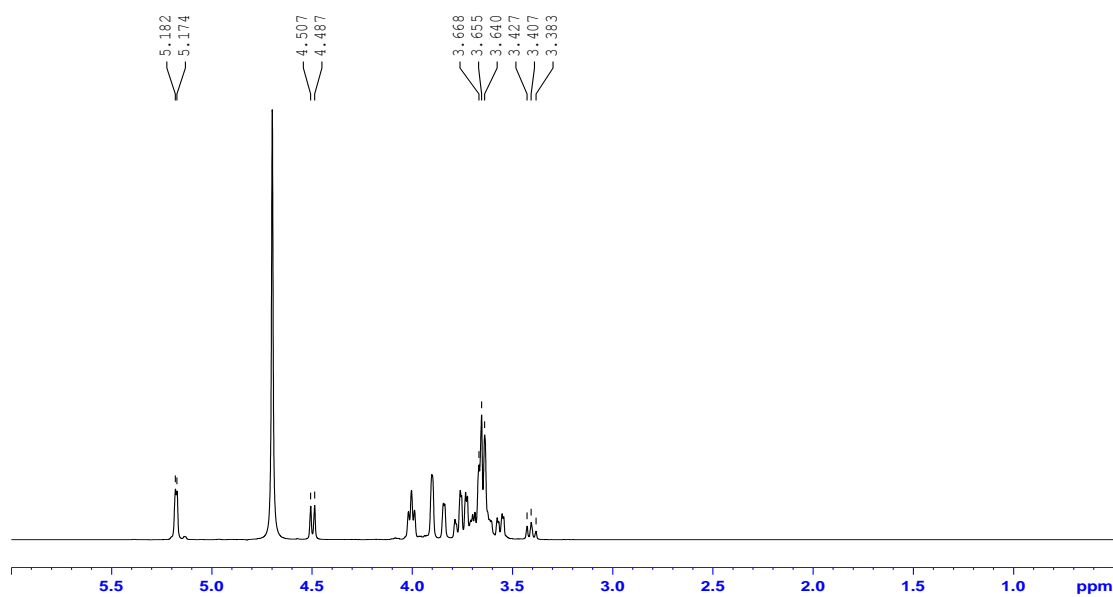


Figura 4.17. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di D-Galattosio

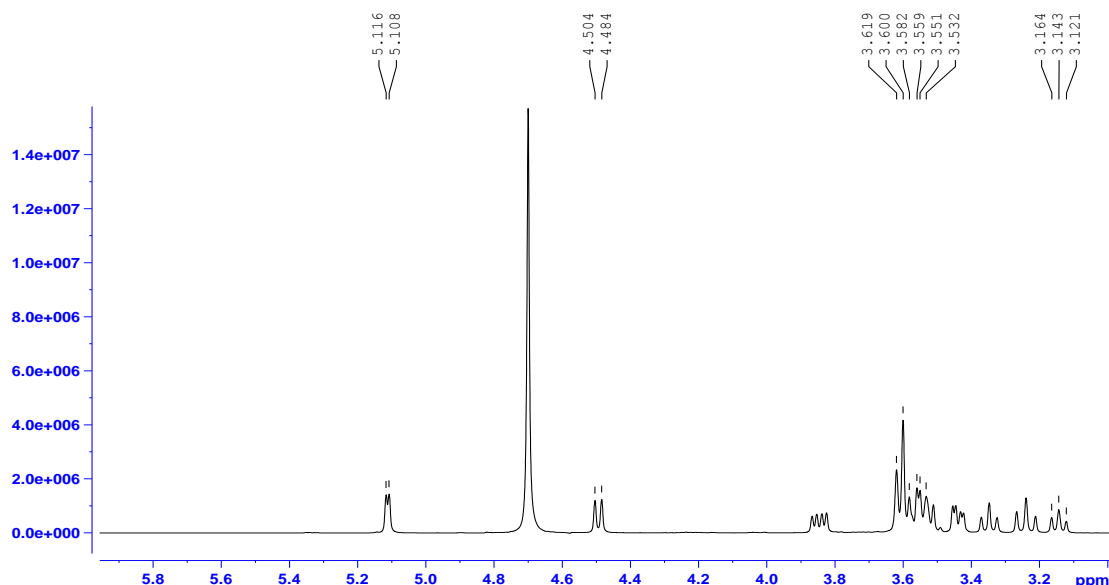
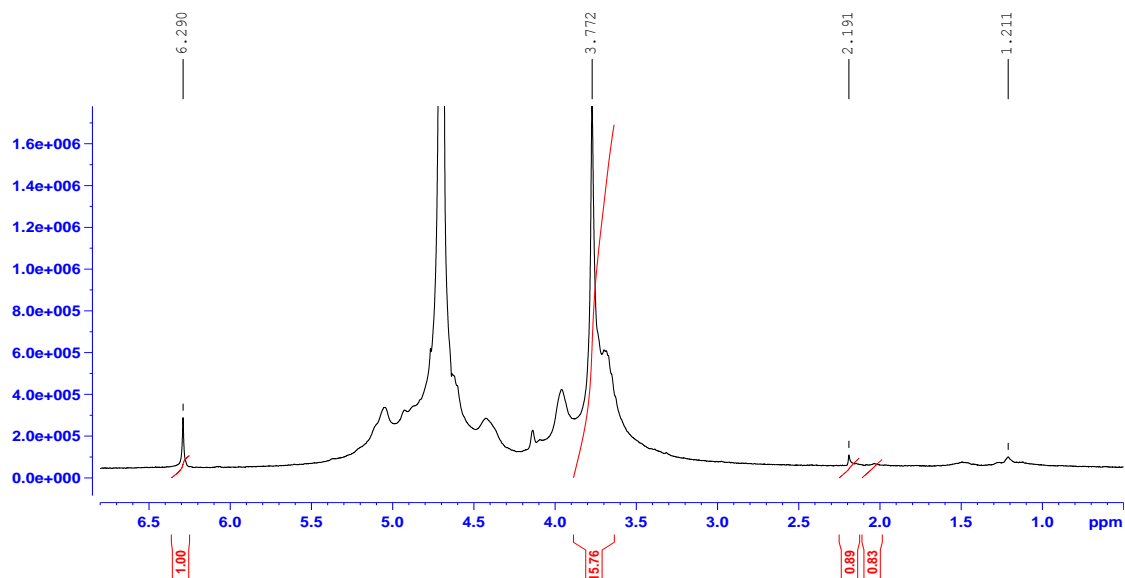


Figura 4.18. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di xiliosio

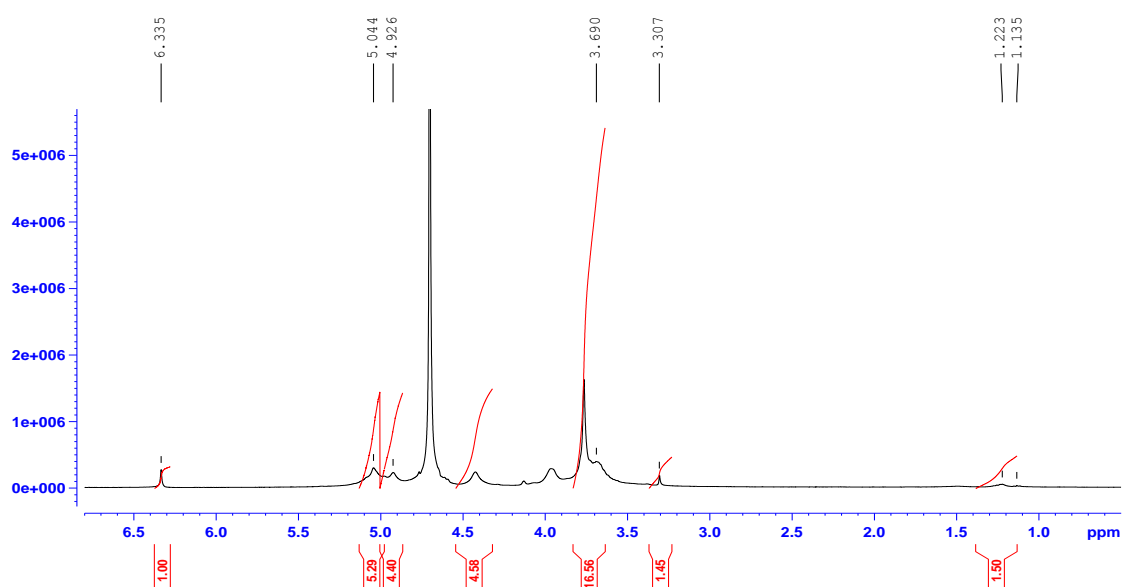
Prima di analizzare le varie frazioni sono stati registrati gli spettri protonici di pectine commerciali a diverso grado di metilazione sempre in presenza di acido maleico come standard interno. L'obiettivo era confrontare gli spettri delle nostre frazioni con quelli delle pectine. In particolare, nelle seguenti figure 4.19 e 4.20, sono riportati gli spettri di pectine a grado di esterificazione 55-70% e a grado di esterificazione > 85% (Sigma Aldrich). In entrambi gli spettri è nettamente prevalente il segnale relativo all'*O*-metile a circa 3,7 - 3,8 ppm; negli spettri riportati è stata tentata una sua integrazione di massima, ma la presenza di molti segnali in quella zona rende troppo imprecisa tale misura e pertanto, dal punto di vista quantitativo, risulta difficile discriminare le due pectine sulla base di questo segnale. La differenza più evidente fra le due pectine commerciali naturali è data dal piccolo segnale a circa 2,19 ppm, che è presente nella pectina a grado di esterificazione 55-70% e assente in quella a grado di esterificazione > 85%. Tale segnale è, con ogni probabilità, relativo al  $\text{CH}_3$  dell'acetile.

Sulla base di questi spettri, gli elementi per la valutazione degli spettri relativi alle varie frazioni isolate dal melograno sono legati:

- un segnale molto intenso intorno a 3,7 ppm, la cui presenza è necessaria per confermare la presenza di pectina;
- un segnale intorno a 2 ppm, relativo al  $\text{CH}_3$  dell'acetile, la cui presenza sembra indicare pectine a più basso grado di metilazione.



**Figura 4.19.** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di pectine con grado di esterificazione 55-70%



**Figura 4.20.** Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di pectine con grado di esterificazione > 85%

L'analisi è stata eseguita dopo dialisi sulle frazioni F5 e F7, mentre tutte le altre frazioni non sono state dializzate. Le frazioni F5 e F7 sono state scelte in quanto più abbondanti rispetto alle altre.

Gli spettri ottenuti sono riportati nelle figure successive. In ogni spettro sono riportati gli integrali e le frequenze di risonanza dei segnali più significativi.

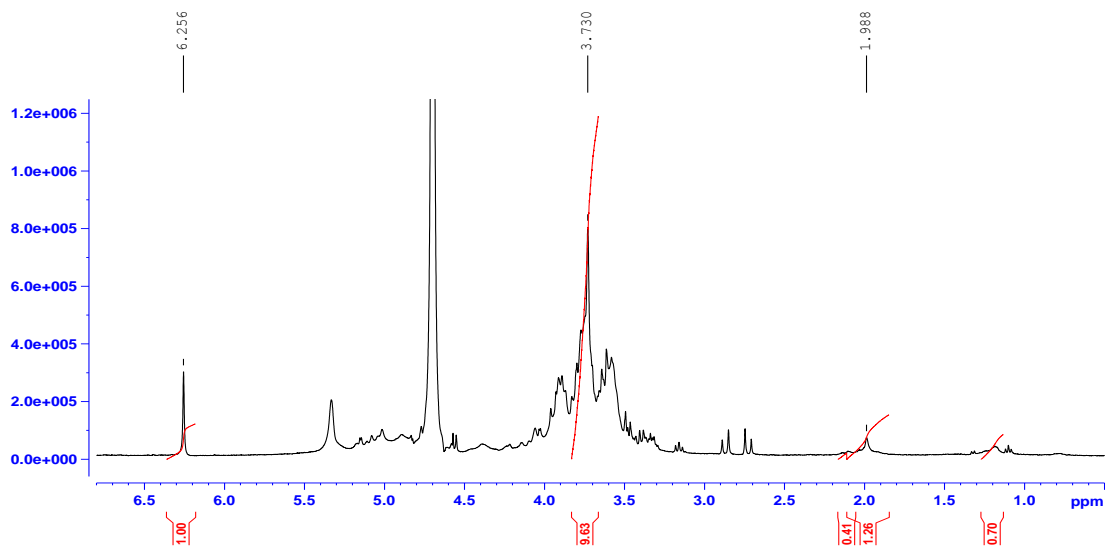


Figura 4.21. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della frazione 1

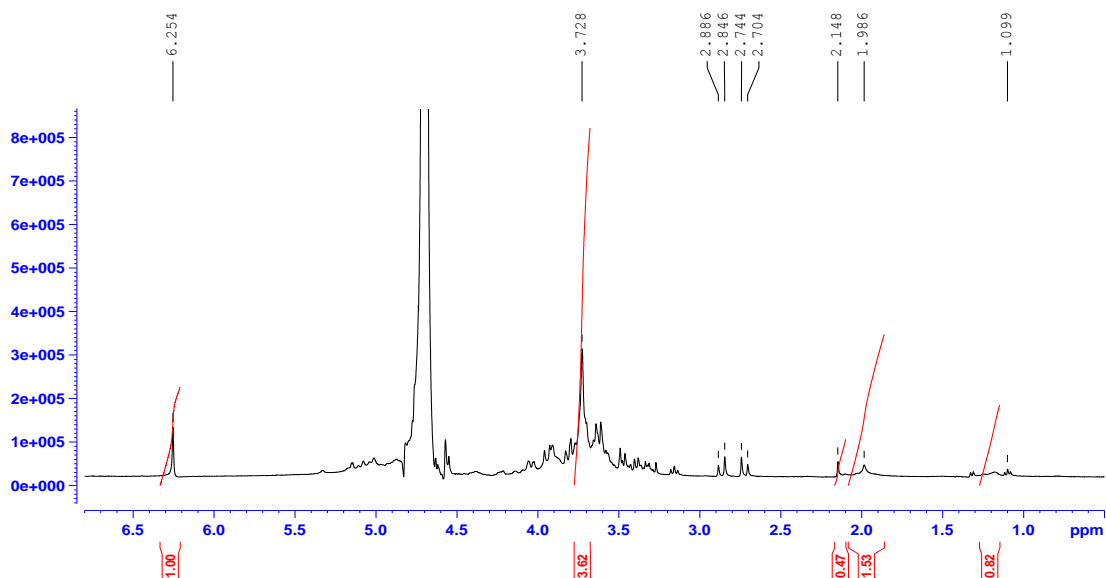


Figura 4.22. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della frazione 2

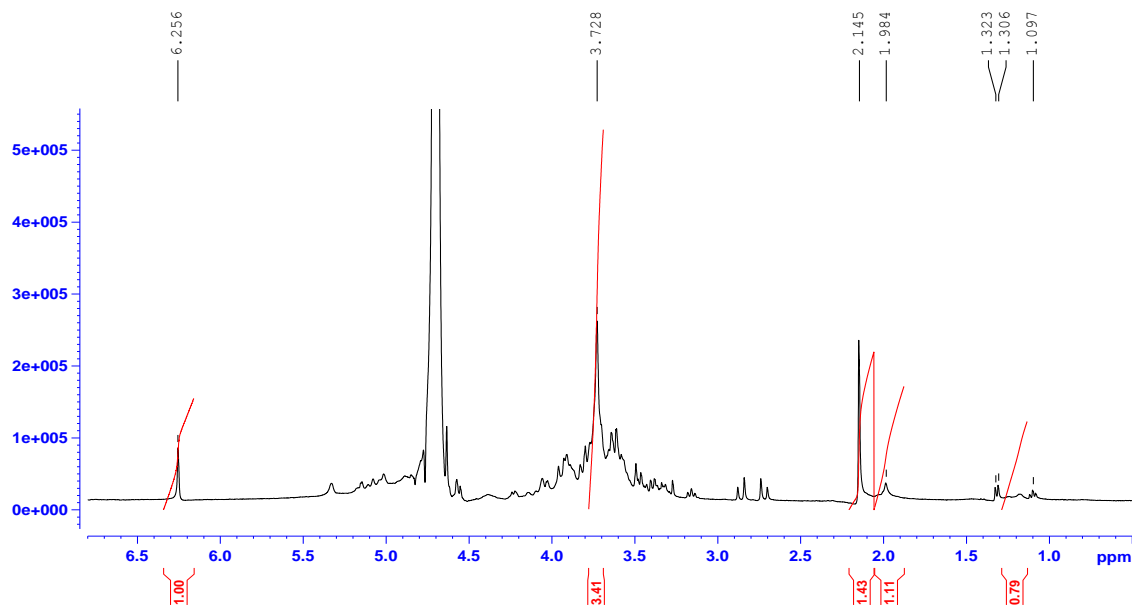


Figura 4.23. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della frazione 3

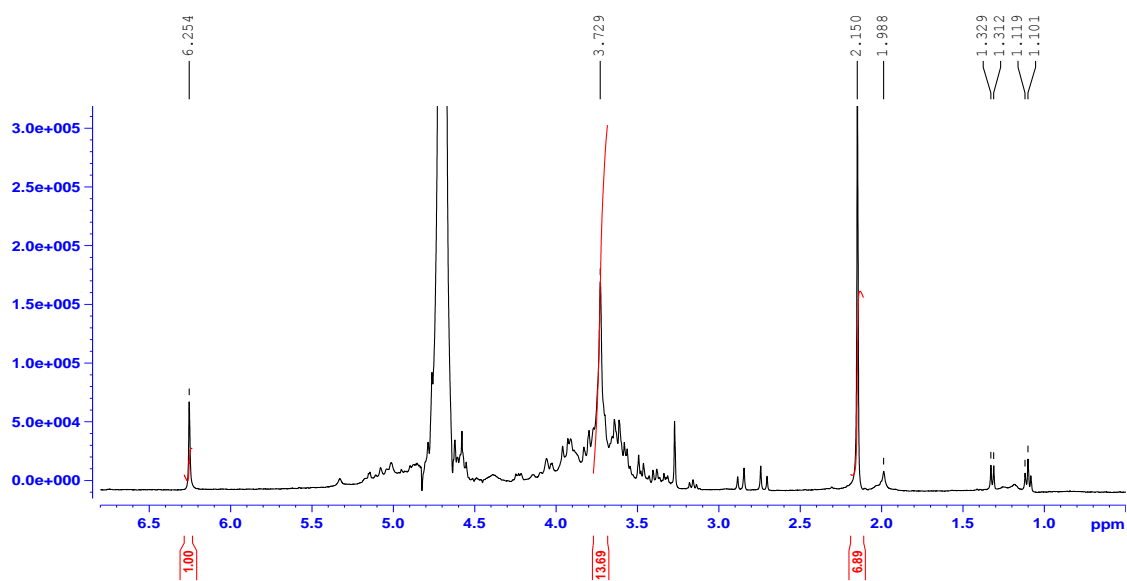


Figura 4.24. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della frazione 4

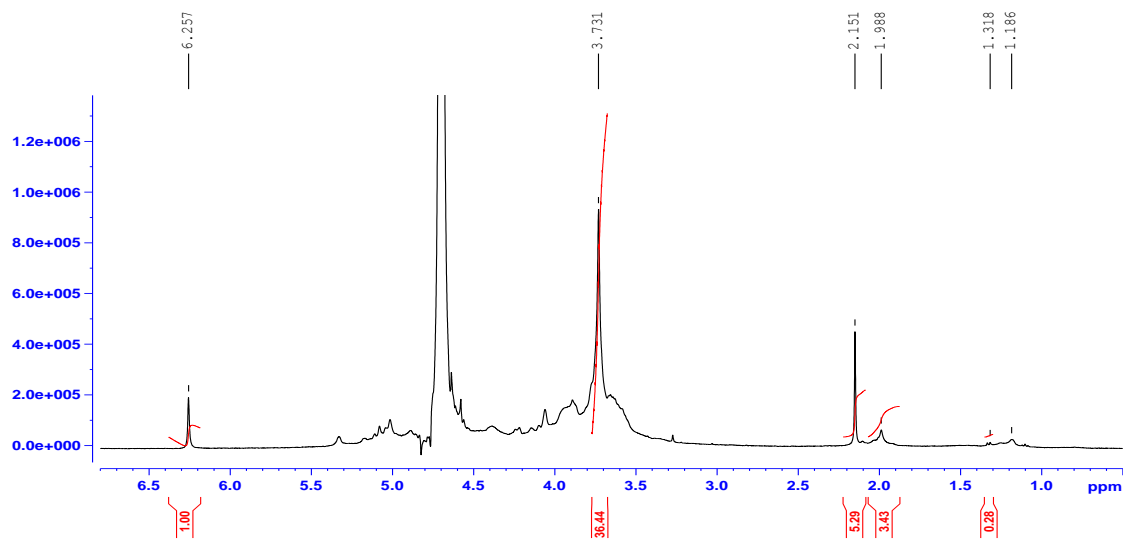


Figura 4.25. Spettro <sup>1</sup>H-NMR della frazione 5

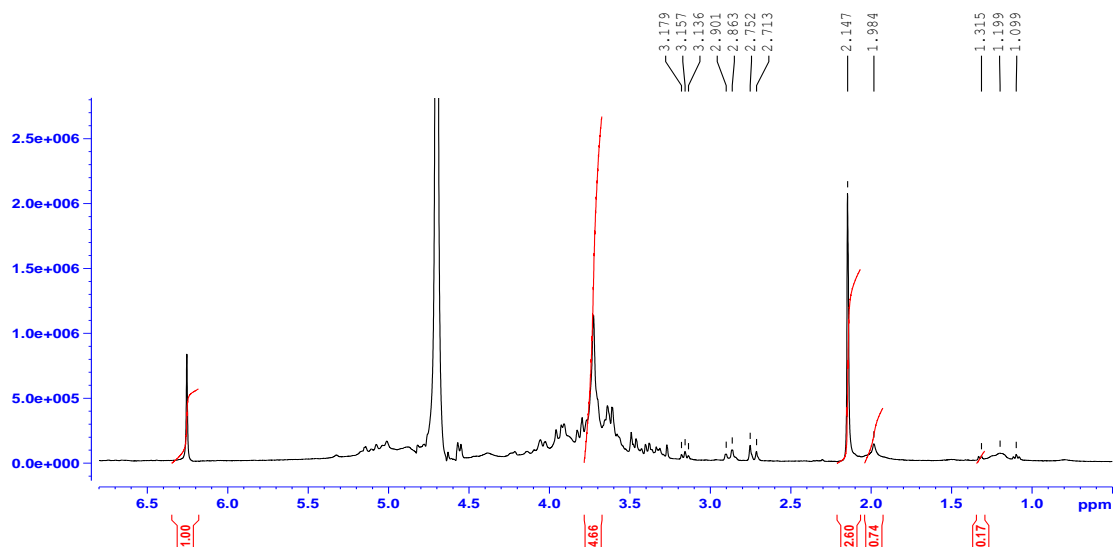


Figura 4.26. Spettro <sup>1</sup>H-NMR della frazione 6

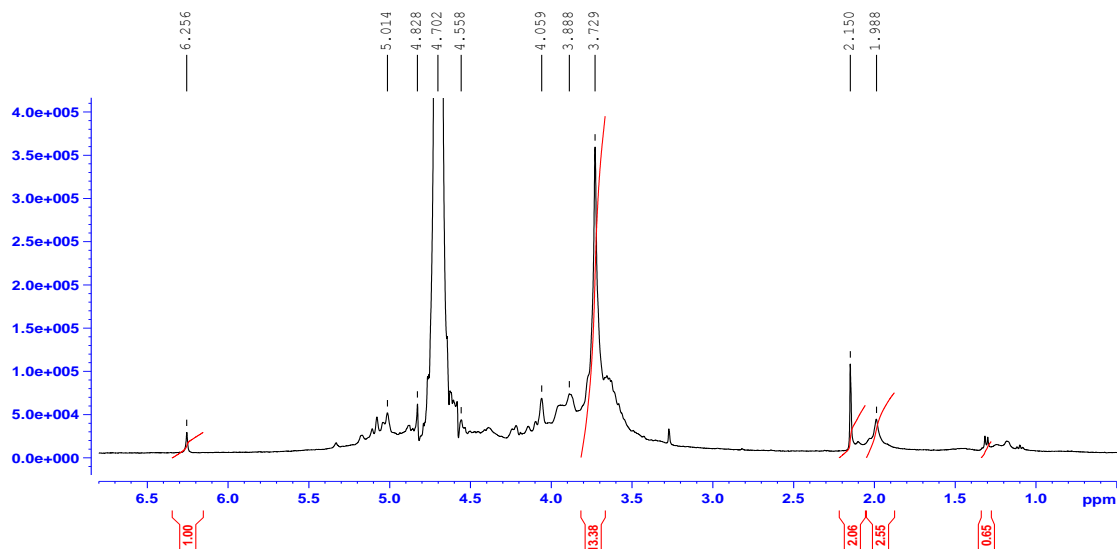


Figura 4.27. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della frazione 7

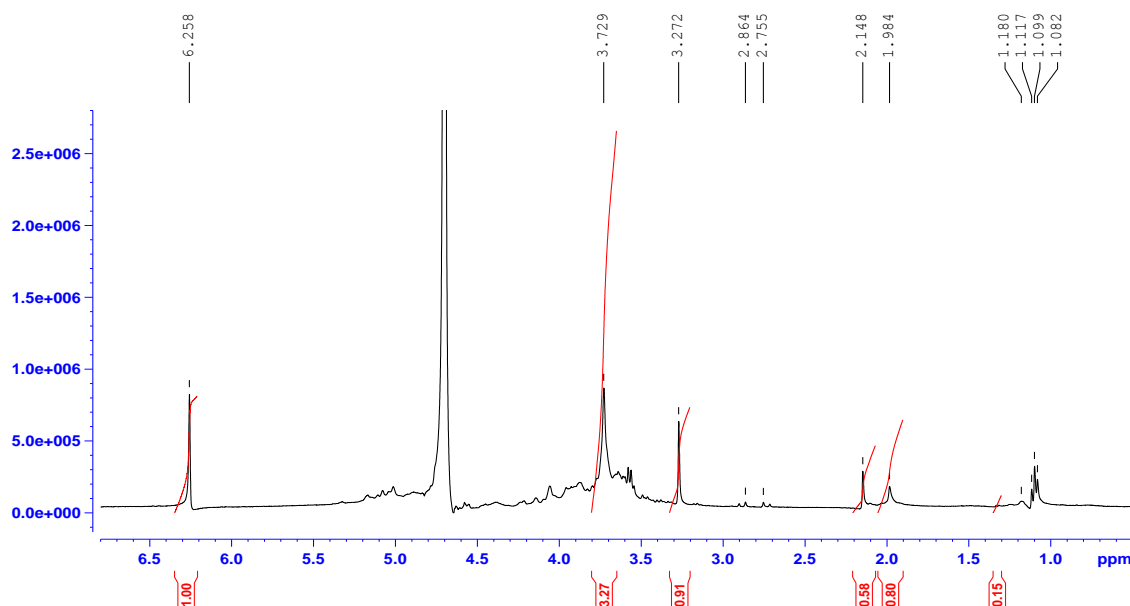


Figura 4.28. Spettro  $^1\text{H-NMR}$  della frazione 8

Il picco dovuto allo standard interno, acido maleico, è presente in tutti gli spettri a  $\delta$  6,3 ppm, mentre il segnale presente a  $\delta$  4,7 ppm è dovuto all'acqua.

Nelle frazioni non dializzate (F1, F2, F3, F4, F6, F8) come era lecito attendersi si è osservato quanto segue:

- in tutte le sei frazioni è presente un doppietto di doppietti nella regione  $\delta$  2,7 – 2,8. Questo segnale non è presente nelle due frazioni dializzate (F5 e F7), e dovrebbe essere ricondotto a una molecola di dimensioni relativamente piccole. Tuttavia in nessuno spettro  $^1\text{H-NMR}$  degli standard dei



monosaccaridi compare un segnale simile, mentre compare un doppietto di doppietti simile in uno spettro della punicalagina riportato in letteratura (Kraszni et al., 2013), anche se non esattamente nella stessa regione riscontrata negli spettri delle frazioni. Il doppietto di doppietti nella punicalagina è assegnato all'idrogeno 6b (figura 4.29), relativo al CH<sub>2</sub> derivante dal residuo glucosidico. Tale gruppo metilenico, nella punicalagina risulta bloccato in una struttura ciclica e non è libero di ruotare come accade nel glucosio libero.

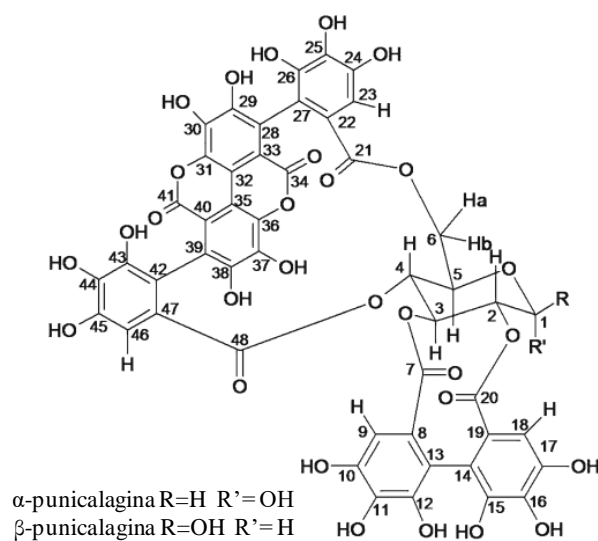


Figura 4.29. Protoni della punicalagina

Si può ipotizzare che il doppietto di doppietti a circa 2,8 ppm negli spettri NMR delle nostre frazioni sia dovuto a strutture in cui il glucosio forma strutture cicliche più o meno grandi che coinvolgono l'OH in posizione 6, e che danno origine a quel tipo di segnali. Peraltro, poiché le punicalagine sono molto idrosolubili si può ipotizzare che una aliquota di questi resti intrappolata nella diverse frazioni anche a causa della consistenza gelatinosa del campione ottenuto soprattutto a seguito del raffreddamento. Un'ulteriore considerazione va fatta in relazione alla dialisi che si è mostrata efficace non solo nel rimuovere le piccole molecole oligosaccaridiche ma evidentemente anche i tannini a peso molecolare più elevato come le punicalagine.

- in tutte le sei frazioni è presente un tripetto a circa 3,15 ppm, che indica la presenza di un monosaccaride. Visto che tale segnale è dato, fra tutti i monosaccaridi di interesse, solamente da glucosio e xilosio, e visto che le

analisi IEC dei vecchi frazionamenti hanno indicato la presenza di piccole quantità di xilosio, è facile ipotizzare che questo segnale indichi la presenza di buone quantità di glucosio nelle frazioni non dializzate.

Considerando la frazione 5 (figura 4.11), notiamo altri segnali caratteristici: il segnale con frequenza di risonanza compresa fra 1,98 e 2,15 ppm riconducibile ai gruppi *O*-acetilici e il singoletto a circa 3,7 ppm, dovuto a gruppo *O*-metilici. Nella frazione 7 troviamo un segnale nella regione  $\delta$  1,9 - 2,1 che evidenzia la presenza di gruppi acetilici (ma in quantità inferiori rispetto a quelli presenti nella frazione 5) ed un picco molto intenso è presente a  $\delta$  3,73 riconducibile alla presenza di gruppi *O*-metilici.

Se consideriamo i segnali relativi ad *O*-metile ed *O*-acetile, che indicano la presenza di pectine nelle frazioni polisaccaridiche, i segnali più intensi sono proprio quelli nelle frazioni 5 e 7 e questo fa pensare che le due frazioni siano molto ricche di questo particolare tipo di polisaccaridi.

## 5. CONCLUSIONI

Il principale scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare i polisaccaridi estratti dal mesocarpo di melograno (*Punica granatum* L.). A tal fine i polisaccaridi sono stati recuperati da un decotto di mesocarpo di melograno di varietà Wonderful coltivata in Puglia e successivamente frazionati mediante precipitazioni successive in etanolo. E' stato possibile ottenere rese in polisaccaridi del 9,0% a partire da mesocarpo liofilizzato.

Le frazioni ottenute sono state poi caratterizzate mediante tecniche strumentali quali SEC (size exclusion chromatography), <sup>1</sup>H-NMR (nuclear magnetic resonance) e IEC (Ion Exchange Chromatography).

In particolare, analisi preliminari condotte su frazioni polisaccaridiche ottenute immediatamente prima dell'inizio di questo lavoro, indicavano la probabile presenza di pectine nelle due frazioni principali; infatti, l'analisi IEC ha evidenziato la presenza di alte percentuali di acido galatturonico in una delle due frazioni, suggerendo la presenza di pectine a prevalenza omogalatturonica; nell'altra frazione, invece, la contemporanea presenza di quantità confrontabili di acido galatturonico, ramnosio e arabinosio, ci ha suggerito la presenza di pectine a prevalenza ramnogalatturonica (tipo I). Un'ulteriore analisi SEC eseguita sulle stesse frazioni ha indicato che tali frazioni erano costituite da una serie di sottofrazioni polisaccaridiche.

Partendo da questi dati preliminari si è proceduto a ottimizzare l'estrazione e il frazionamento al fine di ottenere frazioni il più possibile pure.

La procedura di frazionamento ottimizzata ci ha permesso di recuperare 8 frazioni, fra le quali le F1, F5 e F7 costituivano da sole quasi l'80% dell'intero contenuto polisaccaridico del mesocarpo della melagrana. Tuttavia, fra esse, la frazione F1 appariva di colore e consistenza tali da far subito pensare a una frazione ancora molto impura, come confermato dalle analisi strumentali, e in particolare dalla SEC che ha mostrato come questa frazione contenesse quantità significative di polisaccaridi di diversa natura e pesi molecolari molto variabili.

L'analisi SEC effettuata su tutte le frazioni ha fornito altre informazioni:

- tutte le frazioni presentano polimeri predominanti (66-95%) con un peso molecolare compreso tra i 1100 e i 2000 KDa;

- le frazioni F5 e F7, individuate dal frazionamento come le frazioni più caratteristiche e significative, presentano per la quasi totalità polimeri con un peso molecolare compreso tra i 1100 e i 2000 KDa;
- la frazione F1, pari a circa il 30% del peso totale dei polisaccaridi estratti, ha mostrato oltre all'analita principale con peso molecolare tra 1.100 e 2.000 KDa, altri tre picchi, due dei quali corrispondenti a pesi molecolari bassi con una percentuale di circa il 25%;
- la frazione F8 ha mostrato un profilo SEC molto interessante, tuttavia le basse rese (solamente lo 0,3% dei polisaccaridi estratti) hanno impedito ulteriori studi.

L'analisi  $^1\text{H-NMR}$  ha permesso di caratterizzare ulteriormente le frazioni polisaccaridiche. L'attenzione è ricaduta principalmente sul singoletto dell'*O*-metile e su quello dell'*O*-acetile, oltre a eventuali picchi caratteristici dei monosaccaridi, come ad esempio quello del ramnosio. Le analisi hanno messo in luce che:

- gli spettri risultano piuttosto puliti, indice di un buon frazionamento eseguito;
- il segnale dell'*O*-metile a  $\delta$  3,7 ppm è presente in tutti gli spettri;
- il segnale dell'*O*-acetile a  $\delta$  1,9 – 2,1 ppm è presente in tutti gli spettri;
- questi due segnali risultano essere predominanti negli spettri, mettendo in luce la presenza importante di pectine in tutte le frazioni;
- le frazioni maggiormente metilate, e quindi quelle più pure in pectine sono risultate la F5 e la F7.

Andando ad esaminare tutti i dati ottenuti sulle frazioni, possiamo concludere che:

- le frazioni F5 e F7 sono quelle più significative, sia in termini di peso, sia in termini di purezza;
- entrambe queste frazioni sono costituite per la quasi totalità di polisaccaridi a pesi molecolari superiori ad 1.100 KDa;
- la frazione 5 si presenta di aspetto gelatinoso e di colore giallo, mentre la frazione 7 si presenta sempre di aspetto gelatinoso ma trasparente. Tali aspetti sono tipici dei polisaccaridi e in particolare delle pectine;
- entrambe le frazioni presentano segnali relativi ad esterificazioni, in particolare a metilazione e acetilazione, tipiche delle pectine; anche la

presenza di un segnale attribuibile al ramnosio, conferma la presenza di pectina.

La composizione in dettaglio delle due frazioni principali potrà essere definita successivamente grazie alle analisi IEC.

Questo lavoro ha permesso quindi di ottimizzare l'estrazione e il frazionamento di polisaccaridi dal mesocarpo di melograno e di contribuire in maniera significativa alla caratterizzazione delle principali frazioni ottenute. I dati ottenuti da questo lavoro contribuiscono alla valorizzazione di un abbondante prodotto di scarto del melograno, valorizzazione che potrebbe portare ad ottenere preziosi ricavi dal riutilizzo di quello che ad ora è solo un rifiuto.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abd El Wahab S.M., El Fiki N.M., Mostafa S.F., Hassan A.E.B. **1998** ‘Characterization of certain steroid hormones in *Punica granatum* L. seeds’, *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)*, Vol. 36 , 11–15.
- Adams, L.S., N.P. Seeram, B.B. Aggarwal, Y. Takada, D. Sand, and D. Heber. **2006**. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agr. Food Chem.* 54, 980–985
- Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, et al. **2005**. *Punica granatum* L. extracts inhibits IL-1Beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *J Nutr*; 135, 2096-2102
- Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, et al. **2004**. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food.* 7, 274-283.
- Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y. **2000** ‘Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography’, *Journal of Chromatography A*, 891, pp. 183–188.
- Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y. **2000** ‘High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits’, *Journal of Chromatography A*, 896, 87–93.
- Artik N. **1998** ‘Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC’ *Fruit Processing*, 8, 492–499.
- Aviram M, Dornfeld L. **2001**. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis.* 158, 195-198.
- Azadzoï KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. **2005** Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *J Urol.* 174, 386-393
- Beam Home. **2007**. *Punica granatum*. Pomegranate yields showy blooms, then edible fruit. [www.greenbeam.com/features/plant041299.stm](http://www.greenbeam.com/features/plant041299.stm)
- Bellini, E., Giordani, E., & La Malfa, S. **2010**. I fruttiferi minori in Italia, una risorsa tradizionale per l’innovazione frutticola: il kaki e il melograno come casi di studio. *Italus Hortus*, 17(1), 75-90.

- Caceres A, Giron LM, Alvarado SR, Torres MF. **1987**. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for treatment of dermatomucosal diseases. *J Ethnopharmacol.* 20, 223-237.
- California Rare Fruit Growers **1997**. Pomegranate.
- Carvalho, D.N. **1999**. Forty centuries of ink (The World Wide School, Seattle, WA).
- Cattabiani A. **1996**. Florario: miti, leggende e simboli di fiori e piante
- Chandra, R., Babu, D. K., Jadhav, V. T., & da Silva, J. T. **2010**. Origin, history and domestication of pomegranate. In Pomegranate. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol. 4, 1-6.
- Chen, P.S., J.H. Li, T.Y. Liu, and T.C. Lin. **2000**. Folk medicine Terminalia Catappa and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Lett.* 152, 115–122.
- Collins, P.; Ferrier, R. **1995**. Monosaccharides. John Wiley & Sons., New York., 463.
- Costa, Y., Melgarejo, P. **2000**. A study of the production costs of two pomegranate varieties grown in poor quality soils. *Options Méditerranéennes*
- De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. **2000** ‘Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5331–5337.
- Di Gioia, D., Aloisio, I., Mazzola, G., & Biavati, B. **2014**. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(2), 563-577.
- Enciclopedia agraria italiana, n°3540, **1972** , pp 417-418
- Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, et al. **2006**. Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patients with hyperlipidemia. *Int J Vitam Nutr Res.* 76:147-151.
- Fahan, A. **1976**. The leaf. pp. 171–212. The flower. pp. 321–394. The seed. pp. 419–430. In: Plant anatomy. Hakkibutz Hameuhad Publi., Jerusalem.
- Feng, Y.Z., D.J. Chen, M.T. Song, Y.L. Zhao, and Z.H. Li. **1998**. Assessment and utilization of pomegranate varieties resources. *J. Fruit Sci.* 15:370–373.
- Forest CP, Padma-Nathan H, Liker HR. Efficacy and safety of pomegranate juice on improvement of erectile dysfunction in male patients with mild to moderate erectile dysfunction: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Int J Impot Res* **2007**. 19:564-567.

- Frison, E.A., and J. Servinsky. **1995**. Directory of European institutions holding crop genetic resources collections, vol. 1, Holdings. 4th ed. *Int. Plant Genetic Resources*
- Gadd, K. F. *Polymer* **1982**, 23, 1867
- Gil M.L., Tomas-Barberan F., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A., **2000**. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581-4589.
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, et al. **2000**. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 48:4581-4589.
- Gilbert, R. D.; Kadla, J. F. **1998**. In *Biopolymers from Renewable sources*; Kaplan D. L., Ed.; Springer, New York, , 47.
- Goor, A., and J. Liberman. **1956**. The Pomegranate. pp. 5–57. J. Atsmon (ed.), State of Israel, Ministry of Agriculture, Agr. Publ. Section, Tel Aviv
- Guarino, L., T. Miller, M. Baazara, and N. Obadi. **1990**. Socotra: The island of Bliss revisited. *Diversity* 6(3–4):28–31.
- Guo C, Wei J, Yang J, et al. **2008**. Pomegranate, juice is potentially better than apple, juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr Res*;28:72-77.
- Harding, S. E., & Adams, G. G. **2002**. An introduction to polysaccharide biotechnology. *CRC Press*.
- Hartman RE, Shah A, Fagan AM, et al. **2006**. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 24:506-515.
- Haslam E. **1996**. ‘Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action’. *J. Nat. Prod.*, 59, 205-215.
- Hays, W.B. **1957**. *Fruit growing in India*. 3rd ed., p. 408–411. Kitabistan, Allahabad, India.
- Heber, D., Schulman, R. N., & Seeram, N. P. (Eds.). **2006**. *Pomegranates: ancient roots to modern medicine*. CRC press.
- Hernandez F., Melgarejo P., Tomas-Barberan F.A., Artes F. **1999**. ‘Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones’ *European Food Research and Technology*. 210, 39–42.
- Holland, D., Hatib, K., & Bar-Ya'akov, I. (2009). 2 Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural reviews*, 35(2), 127-191.



- Hon, D. N. S. **1996**In Polysaccharides in Medicinal Applications; Dumitriu, S. (Ed), Marcel Dekker, Inc., New York, , 87.
- Hudson, S. M.; Cuculo, J. A. J. Macromol. **1980**. *Sci. Rev. Mocomol. Chem. Phys.*, C18, 1.
- IPGRI, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Jayaprakasha, G.K., P.S. Negi, and B.S. Jena. **2006**. Antimicrobial activities of pomegranate. pp. 167–183. In: N.P. Seeram, R.N. Schulman, and D. Heber (eds.), Pomegranates: ancient roots to modern medicine. *CRC Press Taylor & Francis Group*, Boca Raton, FL.
- Joseph, M. M., Aravind, S. R., Varghese, S., Mini, S., & Sreelekha, T. T. **2012**. Evaluation of antioxidant, antitumor and immunomodulatory properties of polysaccharide isolated from fruit rind of *Punica granatum*. *Mol Med Report*, 5(2), 489-496
- Joseph, M. M., Aravind, S. R., George, S. K., Varghese, S., & Sreelekha, T. T. **2013**. A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. *Carbohydrate polymers*. 98(2), 1466-1475.
- Jurenka, J. **2008**. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative medicine review*, 13(2), 128.
- Kanke, M.; Koda, K.; Koda, Y.; Katayama, H. *Pharm. Res.* **1992**. 9, 414.
- Kaplan, D. L. **1998**. In Biopolymers from Renewable Resources; Kaplan D. L. (Ed), Springer, New York, 1.
- Karp, D. **2006**. The pomegranate: For one and all. *Fruit Gardener* 38:8–12.
- Kathib M. **2015**. Bioactive compounds into edible Syrian plants: pomegranate and capper
- Khanbabaee K, Van Ree. **2001**. ‘Tannins classification and definition’, *Nat. Prod. Rep.*, 18, T 641-649.
- Kraszni, M., Marosi, A., Larive, C.K. **2013** NMR assignments and the acid-base characterization of the pomegranate ellagitannin punicalagin in the acidic pH-range. *Anal. Bioana. Chem.* 405, 5807-5816.
- Lad V, Frawley D. **1986**. The Yoga of Herbs. Santa Fe, NM: Lotus Press;;135-136.
- Langley P. **2000**. Why a pomegranate. *British Medical Journal* 321, 1153
- Lansky, E., Shubert, S., Neeman, I. **2000**. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. *Options Méditerranéennes Ser. A* 42:231–235.

- Lansky EP, Jiang W, Mo H, et al. **2005**. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs*. 23:11-20.
- La Rue J.H. **1980**. Growing pomegranates in California. Pamphlet of the University of California Division of Agricultural Sciences 2459, 1977
- Lei F, Zhang XN, Wang W, et al. **2007**. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int J Obes*. 31, 1023-1029.
- Levin, G.M., and E.A. Sokolova. **1979**. Materials for the study of *Punica protopunica* (Punicaceae). *Botanicheskii Zhurnal* 64:998–1005.
- Levin, G.M. **2006**. Pomegranate roads: a Soviet botanist’s exile from Eden. pp. 15–183. B.L. Baer (ed.), Floreat Press, Forestville, CA.
- Levin G.M. **2006a** Pomegranate (1<sup>st</sup> Edn), Third Millenium Publishing, East Libra Drive Tempe, AZ, 1-129
- Li, J., Zhang, F., & Wang, S. **2014**. A polysaccharide from pomegranate peels induces the apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Tumor Biology*, 35(8), 7475-7482.
- Lin, C.C., Y.F. Hsu, and T.C. Lin. **1999**. Effects of punicalagin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Am. J. Chin. Med.* 27:371–376.
- Malik A, Mukhtar H. **2006**. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle* 5, 371-373.
- Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, et al. **2005**. Pomegranate fruit, juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 102, 14813-14818.
- Mars, M. **2000**. Pomegranate plant material: Genetic resources and breeding, a review.
- McDonald, J.A. **2002**. Botanical determination of the Middle Eastern tree of life. *Econ. Bot.* 56, 113–129.
- Menezes SM, Cordeiro LN, Viana GS. **2006**. *Punica granatum* (pomegranate) extract is active against dental plaque. *J Herb Pharmacother.* 6:79-92.
- Morton J.F. **1987**. Punicaceae pomegranate. In: Dowling C.F. (Ed) *Fruits of Warm Climates*, Florida Flair Books, Florida, Usa, 352-355
- Nalawadi, U.G., A.A. Farooqi, Dasappa, M.A.N. Reddy, Gubbaiah, G.S. Sulikeri, and A.S. Nalini. **1973**. Studies on the floral biology of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Mysore J. Agr. Sci.* 7:213–225.
- Naqvi SA, Khan MS, Vohora SB. **1991**. Antibacterial, antifungal, and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia.* 62, 221-228.

- Neuhofer H., Witte L., Gorunovic M., Czygan F.C. **1993**. 'Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia'. *Pharmazie*, 48, 389–391.
- Newman R.A., Lansky E.P., Block M.L. **2007**. Pomegranate: The Most Medicinal Fruit (1<sup>st</sup> Edn), Basic Health Publication, Laguna Beach, CA, pp 1-120.
- Nielsen, S. S. (Ed.). **2010**. Food analysis (p. 550). New York: Springer. AOAC Method 969.39, American Association of Cereal Chemists Method 76-13.
- Noda Y., Kaneyuka T., Mori A., Packer L. **2002**. 'Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 166–171.
- Panthaky, R.G.N. **2006**. Significance of pomegranate tree in our religion.
- Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, et al. **2006**. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res*.12, 4018-4026.
- Popa, V. I. **1996**. In Polysaccharides in Medicinal Applications. Dumitriu, S.,Ed.; Marcel Dekker, Inc., New York, 107.
- Poyrazoglu E, Gokmen V, Aruk N. **2001**. 'Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum*) grown in Turkey'. *Journal Food comp*. 15, 567-575
- Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. **2006**. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* 54, 1928-1935.
- Rout, S., & Banerjee, R. **2007**. Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresource Technology*, 98(16), 3159-3163.
- Salminen JP, Roslin T, Karonen M, Sinkkonen J, Pihlaja K, Pulkkinen P. **2004**. 'Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves', *J. Chem. Ecol*. 30, 1693-1711.
- Schubert S.Y., Lansky E.P., Neeman I., **1999**. 'Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids', *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 11–17.
- Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. **1999**. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*. 66, 11-17.

- Seelig R.A. **1970**. Fruit and Vegetables Facts and Pointers Pomegranate, United Fresh Fruit and Vegetable Association, Washington DC
- Seeram, N.P., L.S. Adams, S.M. Henning, Y. Niu, Y. Zhang, M.G. Nair, and D. Heber. **2005**. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.* 16, 360–367.
- Sepulveda, E., Galleti, L., Saenz, C., Tapia, M. **2000**. Minimal processing of pomegranate var. Wonderful. *Options Méditerranéennes Ser. A.* 42, 237–242.
- Sharma, K.K., and W.S. Dhillon. **2002**. Evaluation of evergreen varieties of pomegranate under Punjab conditions. *Agr. Sci. Digest* 22, 42–44.
- Shishodia, S., L. Adams, I.D. Bhatt, and B.B. Aggarwal. **2006**. Anticancer potential of pomegranate. pp. 107–116. In: N.P. Seeram, R.N. Schulman, and D. Heber (eds.). Pomegranates: ancient roots to modern medicine. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Shogren, R. L. **1998**. In Biopolymers from Renewable sources; Kaplan D. L., (Ed), Springer, New York, , 30.
- Singh, D.B., D.K. Samadia, and A.R.P. Kingsly. **2006**. Conservation, characterization and evaluation of pomegranate germplasm under arid ecosystem of India. p. 15. In: ISHS, 1st Int. Symp., Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits, Abstracts contributed papers, 16–19 Oct., Adana, Turkey.
- Singh, S. K., & Gross, R. A. **2001**. Overview: Introduction to polysaccharides, agropoteins, and poly (amino acids).
- Sreelekha, T. T., Vijayan, K. K., & Balaram, P. **2008**. Antimitotic polysaccharide from *Punica granatum*. *Ethnopharmacology–Recent advances* 19, 231-245.
- Stevens, M. P. Polymer Chemistry Oxford University press, New York, **1999**, 484.
- Stevens, M. P. Polymer Chemistry; Oxford University press, New York, **1999**, 489.
- Still D.W. **2006**. Pomegranates: a botanical prospective. In: Seeram N.P., Schullman R.N., Heber D. (Eds) Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, pp 199-209
- Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I. **1986** ‘Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L.’, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 650–655.

- Teot, A. S. **1982**. Encyclopedia of Chemical Technology John Wiley & Sons, New York, 20, 207.
- Toi M, Bando H, Ramachandran C, et al. **2003**. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. *Angiogenesis*. 6, 121-128.
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. **2012**. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 489(7415), 242-249.
- Van Elswijk D.A., Schobel U.P., Lansky E.P., Irth H., Van der Greef J. **2004**. ‘Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry’. *Phytochemistry*. 65, 233–241.
- Vesilek, J. **2016**. The chemistry of food. Wiley Blackwell
- Vidal A., Fallarero A., Pena B.R., Medina M.E., Gra B., Rivera F., Gutierrez Y., Vuorela P.M. **2003**. ‘Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts’, *Journal of Ethnopharmacology*. 89, 295–300.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. **2010**. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654.
- Wang, R.F, Xie, W.D, Zhang, Z., Xing, D.M, Ding, Y., Wang, W., Ma, C., Du, L.J,’ **2004**. Bioactive compounds from seeds of *Punica granatum* (Pomegranate)’. *Journal Of Natural Products*. 67, , pp 2096-2098.
- Wang, H.X. **2003**. The characteristics of Mudanhua pomegranate variety and its cultural techniques. *South China Fruits* 32, 49–50.
- Yamamoto, I.; Takayama, K.; Konma, K.; Gonda, T.; Yamazaki, K.; Matsuzaki, K. Hatanaka, K.; Uryu, T.; Yoshida, O.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Kaneko, Y.; Mimura, T. *Carbohydr. Polym.* **1991**, 14, 53.
- Zukovskij, P.M. **1950**. *Punica*. 60–61. In: Cultivated plants and their wild relatives. State Publ. House Soviet Science, Moscow.