

Abstract

The growing demand for sustainable functional compounds, bioactive molecules obtained from renewable plant sources, has driven the development of eco-friendly extraction technologies. In this framework, the exploration of wild plants and unconventional parts of common crops as valuable sources of functional compounds is strongly encouraged by EU directives, the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs) and the global transition toward a circular economy.

During the first year of the PhD project, a software-assisted untargeted UHPLC-HRMS/MS workflow was developed and combined with *in vitro* screening assays to assess the antioxidant and enzyme inhibitory potential of various plant matrices. Following a funnel-shaped strategy, data were integrated with literature findings, agri-food value chain relevance, and sustainability criteria, environmental preservation and resource optimization, to identify the most promising natural sources for sustainable extraction. This analysis led to the selection of *Ceratonia siliqua* L. (CSL) and *Glycyrrhiza glabra* L. (GGL) leaves, underutilized biomasses of traditional Italian crops, as valuable resources for the recovery of health-promoting compounds. For their rich metabolic profiles and strong *in vitro* activities, both matrices proved to be promising candidates for the development of novel functional foods and nutraceutical formulations.

The second year focused on green extraction techniques, selected, and carefully optimized for the selective and efficient recovery of CSL and GGL compounds. Pressurized Hot Water Extraction (PHWE) and Ultrasound Probe-Assisted Extraction (probe-UAE) were chosen for the extraction of CSL polar and medium-polar compounds, and Supercritical CO₂ Extraction (SFE) for GGL apolar constituents. Preliminary univariate studies and subsequent Response Surface Methodology (RSM) optimization enabled efficient, solvent-saving and environmentally friendly extraction. These green methods outperformed conventional techniques in terms of yield, selectivity, quality and sustainability and provide a solid basis for future pilot-scale trials and potential industrial exploitation of these health-promoting natural sources.

Building on these results, the third-year research integrated process optimization with biological validation. CSL extracts were tested in cell-based models (HepG2 cells and erythrocytes) to confirm antioxidant efficacy under oxidative stress, providing realistic evidence of their bioactivity and cytocompatibility. In parallel, a PHWE-based spray-dried formulation was developed to enhance compound stability and bioaccessibility, which were further assessed through *in vitro* gastrointestinal digestion. For GGL, antioxidant and anti-aging properties of the extracts were investigated using a *Saccharomyces cerevisiae* model overexpressing human α -synuclein, enabling the evaluation of both oxidative stress resistance and lifespan extension.

Overall, the findings from both plant biomasses underline the effectiveness of a sustainable, multidisciplinary approach that integrates green extraction, metabolite characterization, formulation design and biological validation. Both *C. siliqua* and *G. glabra* leaves represent promising, underexploited sources that can serve as health-beneficial constituents for the development of novel foods, functional ingredients, and nutraceutical formulations.

Abstract

La crescente domanda di composti funzionali sostenibili, ovvero molecole bioattive ottenute da fonti vegetali rinnovabili, ha promosso lo sviluppo di tecnologie di estrazione eco-compatibili. In questo contesto, l'esplorazione di piante spontanee e di parti non convenzionali di colture comuni come fonti preziose di composti funzionali è fortemente incoraggiata dalle direttive dell'Unione Europea, dagli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (SDGs) delle Nazioni Unite e dalla transizione globale verso un'economia circolare.

Durante il primo anno del progetto di dottorato, è stato sviluppato un workflow UHPLC-HRMS/MS untargeted assistito da software, combinato con saggi di screening in vitro per valutare il potenziale antiossidante e l'attività inibitoria enzimatica di diverse matrici vegetali. Seguendo una strategia "a imbuto", i dati sono stati integrati con evidenze di letteratura, rilevanza nella filiera agroalimentare e criteri di sostenibilità, tutela ambientale e ottimizzazione delle risorse, al fine di identificare le fonti naturali più promettenti per un'estrazione sostenibile. Questa analisi ha portato alla selezione delle foglie di *Ceratonia siliqua* L. (CSL) e *Glycyrrhiza glabra* L. (GGL), biomasse sottoutilizzate di colture tradizionali italiane, come risorse di valore per il recupero di composti salutistici. Grazie al loro ricco profilo metabolico e alle marcate attività in vitro, entrambe le matrici si sono rivelate promettenti per lo sviluppo di nuovi alimenti funzionali e formulazioni nutraceutiche.

Il secondo anno è stato dedicato alle tecniche di estrazione green, selezionate e accuratamente ottimizzate per il recupero selettivo ed efficiente dei composti di CSL e GGL. La Pressurized Hot Water Extraction (PHWE) e l'Ultrasound Probe-Assisted Extraction (probe-UAE) sono state scelte per l'estrazione dei composti polari e medio-polari di CSL, mentre la Supercritical CO₂ Extraction (SFE) è stata impiegata per i costituenti apolari di GGL. Studi preliminari univariati e una successiva ottimizzazione mediante Response Surface Methodology (RSM) hanno consentito di ottenere processi efficienti, a ridotto impiego di solventi e a basso impatto ambientale. Questi metodi green hanno superato le tecniche convenzionali in termini di resa, selettività, qualità e sostenibilità, fornendo una solida base per future sperimentazioni su scala pilota e per una potenziale valorizzazione industriale di queste fonti naturali salutistiche.

Sulla base di tali risultati, il terzo anno di ricerca ha integrato l'ottimizzazione dei processi con la validazione biologica. Gli estratti di CSL sono stati testati in modelli cellulari (cellule HepG2 ed eritrociti) per confermare l'efficacia antiossidante in condizioni di stress ossidativo, fornendo evidenze più realistiche della loro bioattività e citocompatibilità. Parallelamente, è stata sviluppata una formulazione spray-dried basata su PHWE per migliorare la stabilità e la bioaccessibilità dei composti, successivamente valutate mediante digestione gastrointestinale in vitro. Per GGL, le proprietà antiossidanti e anti-aging degli estratti sono state investigate utilizzando un modello di *Saccharomyces cerevisiae* sovraesprimente l' α -sinucleina umana, consentendo di valutare sia la resistenza allo stress ossidativo sia l'estensione della lifespan.

Nel complesso, i risultati ottenuti da entrambe le biomasse vegetali evidenziano l'efficacia di un approccio sostenibile e multidisciplinare che integra estrazione green, caratterizzazione metabolomica, progettazione formulativa e validazione biologica. Le foglie di *C. siliqua* e *G. glabra* rappresentano fonti promettenti e ancora poco valorizzate, potenzialmente impiegabili come ingredienti salutistici per lo sviluppo di nuovi alimenti, ingredienti funzionali e formulazioni nutraceutiche.