Estrazione da residui legnosi per applicazioni alimentari e farmaceutiche

Giovanna Ferrentino – Libera Università di Bolzano
Nabil Haman – Libera Università di Bolzano
Ksenia Morozova – Libera Università di Bolzano
Matteo Scampicchio – Libera Università di Bolzano

Abstract

L'attività antimicrobica degli estratti di *Picea abies*, ottenuti con due diverse tecnologie di estrazione Sohxlet ed anidride carbonica supercritica, è stata valutata sulla crescita di *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus thermophilus*. La calorimetria isoterma è stata utilizzata come tecnica per valutare l'effetto antimicrobico. Il fitting delle curve del flusso di calore della crescita microbica è stato effettuato con l'equazione di Gompertz modificata per ottenere i parametri relativi al tempo di ritardo ed alla velocità di crescita microbica. Inoltre, i composti fenolici responsabili dell'attività antimicrobica sono stati identificati con la spettrometria di massa. I risultati hanno mostrato che, indipendentemente dalla tecnologia utilizzata, entrambi gli estratti hanno attività antimicrobica simile. Tuttavia, tra i due ceppi *S. thermophilus* ha mostrato una maggiore resistenza all'azione antimicrobica dell'estratto rispetto ad *E. faecalis*. I principali composti fenolici responsabili di tale effetto sono stati la catechina, la diidroquercitina, l'astringina e l'isorapontina. I risultati hanno mostrato le potenzialità dell'estratto di *Picea abies* da utilizzare come antimicrobico naturale ottenuto da fonti sostenibili alternativo agli attuali conservanti artificiali.

1. Introduzione

Sin dai tempi antichi, il legno ha sempre avuto un ruolo centrale nella vita degli uomini. Nonostante il suo utilizzo per applicazioni come la generazione di calore, la costruzione di armi o veicoli sia progressivamente diminuito nel

Part of
Tonon, G. (Ed.). (2020). *WOOD-UP – Valorizzazione della filiera di gassificazione di biomasse legnose per l'energia, la fertilità del suolo e la mitigazione dei cambiamenti climatici.* bu,press. https://doi.org/10.13124/9788860461780
CC BY-SA

corso degli anni, ad oggi il legno rimane ancora un materiale essenziale per una miriade di applicazioni, come costruzione di edifici, mobili, produzione di carta, utensili, opere d'arte, e strumenti musicali. Tuttavia, durante le fasi della sua lavorazione e trasformazione, vengono prodotti una grande quantità di residui e sottoprodotti. Spesso, questi sottoprodotti legnosi hanno un valore economico molto limitato. Pertanto, vi è un crescente interesse nel cercare di trovare soluzioni alternative che permettano di riutilizzare e valorizzare i residui legnosi ottenendo nuovi materiali o prodotti.

Un approccio interessante nella valorizzazione di questi sottoprodotti si basa sull'estrazione di alcuni composti, che in esso sono contenuti, e che hanno mostrato interessanti proprietà antimicrobiche ed antiossidanti (Salem et al., 2016; Grassmann et al., 2003). Cortecce e rami di molte specie di alberi, infatti, sono usati da secoli come fonte di aromi, fragranze o pigmenti colorati. Studi recenti hanno indicato il crescente interesse della comunità scientifica nella determinazione di alcune proprietà fisico-chimiche dei composti estratti dai residui legnosi (Bianchi et al., 2014; Kusumoto et al., 2014; Minova et al., 2015; Sahin et al., 2017). Ad esempio, è stato osservato che gli estratti ottenuti dal legno di castagno o ciliegia hanno proprietà antimicrobiche e sono in grado di controllare possibili contaminazioni nei vini (Alañón et al., 2015). Gli estratti ottenuti dall'albero di *Endopleura uchi* hanno riportato un'elevata attività antimicrobica e citotossica (Politi et al., 2011) cosi come gli estratti del legno di eucalipto che hanno evidenziato un'elevata attività nell'inibizione della crescita di batteri e lieviti (Cruz et al., 2011). Recentemente, estratti dalle foglie aghiformi di *Abies alba* ottenuti con tecnologia di cavitazione idrodinamica hanno riportato un'elevata attività antiossidante (Becvárová et al., 2018).

Tra le diverse specie di alberi, i residui legnosi dell'abete rosso (*Picea abies*) stanno ricevendo un grande interesse. Si tratta di una specie ampiamente diffusa in Europa che rappresenta circa il 38% degli alberi presenti nelle foreste europee (Becvárová et al., 2018). La sua diffusione determina anche il suo largo utilizzo in diverse lavorazioni industriali originando in questo modo importanti quantità di sottoprodotti. Da questo scenario nasce la necessità di trovare soluzioni alternative che ne permettano la valorizzazione ed il riutilizzo. Recentemente è stato dimostrato che la corteccia dell'abete rosso presenta un alto contenuto di composti con attività antiossidante (Neiva et al.,

2018). Inoltre, grazie al suo elevato contenuto di emicellulosa, alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di produrre interessanti oligomeri da utilizzare come ingredienti o eccipienti in prodotti commercializzati da industrie nutraceutiche e farmaceutiche. In un altro studio, è stato dimostrato che gli estratti ottenuti dalla corteccia dell'abete rosso hanno una forte attività antimicrobica contro alcuni microrganismi patogeni quali *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tanase et al., 2018). Allo stesso modo, è stato anche riscontrato un importante effetto di inibizione da parte di estratti ottenuti da *Picea abies* contro la specie microbica dello *Streptococcus pneumoniae* (Vainio-Kaila et al., 2015). Tuttavia, sebbene l'attività antimicrobica ed antiossidante degli estratti ottenuti dai residui legnosi è confermata dai risultati pubblicati in numerosi studi, ciò che non è ancora ben chiaro è l'effetto della tecnologia di estrazione e del solvente utilizzato durante l'estrazione sulle proprietà fisico-chimiche degli estratti finali. Ad esempio, l'estratto ottenuto dal *Thymus pectinatus,* utilizzando metanolo come solvente, non ha mostrato alcuna attività antimicrobica. Tuttavia, è stata osservata una certa attività antimicrobica quando lo stesso olio essenziale è stato ottenuto da distillazione in corrente di vapore utilizzando un sistema Clevenger (Vardar-Ünlü et al., 2003). Tali differenze potrebbero essere legate al solvente utilizzato durante il processo di estrazione. Al contrario, una ricerca effettuata da Salem et al. (2016) ha mostrato che l'estratto metanolico di *Picae abies* presenta una forte attività antibatterica e antiossidante (Salem et al, 2016).

Gli studi pubblicati in questo ambito evidenziano, inoltre, che non solo il solvente, ma anche la tecnologia può avere un effetto significativo sulle proprietà funzionali degli estratti. Ad esempio, è stato riportato che l'estrazione effettuata con liquidi in pressione utilizzando metanolo come solvente da residui legnosi di *Phyllanthus emblica* L. ha prodotto un estratto con attività antiossidante superiore rispetto a quello ottenuto con estrazione con fluidi supercritici oppure con estrazione convenzionale con solvente (Liu et al., 2009). Altri lavori riportano invece che l'estrazione con fluidi supercritici, grazie alle basse temperature utilizzate durante il processo e all'aggiunta di co-solventi come etanolo o metanolo, ha permesso di ottenere oli essenziali con una forte attività antimicrobica. Ad esempio, gli estratti di Agarwood (Aquilaria crassna)

hanno inibito la crescita di *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Wetwitayaklung et al., 2009). Inoltre, estratti dal legno di cedro (Eller et al., 2000) e dagli sottoprodotti di lavorazione di *Pinus taeda* (Pasquini et al., 2005) ed eucalipto ottenuti con la tecnologia di estrazione con fluidi supercritici hanno mostrato notevole attività antiossidante (González-Vila et al., 2000).

Sulla base di queste considerazioni riportate nei diversi lavori scientifici, in questo capitolo gli autori hanno concentrato le loro ricerche sulla valutazione dell'attività antimicrobica di estratti ottenuti da sottoprodotti di lavorazione di *Picea abies*. Per valutare l'effetto della tecnologia di estrazione sulle proprietà finali dell'estratto, sono state utilizzate due diverse tecniche: un'estrazione con sistema Soxhlet usando etanolo come solvente ed un'estrazione con fluidi supercritici con anidride carbonica come solvente. La scelta di questi due tipologie di estrazione si basa essenzialmente sulla diversa polarità dei solventi. L'estrazione con sistema Soxhlet utilizzando etanolo generalmente porta ad ottenere un estratto caratterizzato dalla presenza di composti fenolici polari. Al contrario, gli estratti ottenuti con l'anidride carbonica supercritica forniscono oli essenziali più ricchi in composti apolari (Cao et al., 2007; Caredda et al., 2002). Queste due tecnologie di estrazione sono state applicate ai residui legnosi di *Picea abies* e gli estratti ottenuti sono stati testati su due microrganismi gram-positivi quali *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus thermophilus*. Per monitorare l'attività antimicrobica degli estratti si è scelta la tecnica della calorimetria isoterma, un metodo innovativo che fornisce un segnale in continuo nel tempo proporzionale alla quantità di calore prodotta dai microrganismi durante la loro attività metabolica.

È stata, inoltre, eseguita un'analisi degli estratti con tecniche cromatografiche (HPLC-MS) in assenza e presenza dei microrganismi per identificare i composti fenolici responsabili dell'azione antimicrobica.

2. Materiali e Metodi

2.1 Preparazione dei sottoprodotti legnosi

La raccolta dei residui di abete rosso (*Picea abies*) è stata effettuata nella regione dell'Alto Adige (Italia). All'arrivo in laboratorio, i campioni sono stati macinati per ottenere una polvere fine con una granulometria di 300-800 μm. Il contenuto finale di umidità della polvere è risultato pari a 7.8 ± 1.2 mentre l'attività dell'acqua pari a 0.4 ± 0.1.

2.2 Estrazione con anidride carbonica supercritica

Un impianto pilota ad alta pressione (Super fluidi s.r.l., Padova, Italia) è stato utilizzato per eseguire le estrazioni con anidride carbonica supercritica dai residui legnosi di *Picea abies*. Il sistema comprende un estrattore e due separatori gravimetrici. All'interno dell'estrattore è presente un contenitore di acciaio inossidabile (volume di 800 ml), le cui estremità sono chiuse con filtri porosi di acciaio inossidabile. Una pompa a membrana ad alta pressione (Lewa LDC - M - 9XXV1, Milano, Italia) è stata utilizzata per pompare l'anidride carbonica all'interno dell'estrattore. Per effettuare gli esperimenti, 80 ± 1 grammi di polvere di *Picea abies* sono stati caricati nell'impianto. Le condizioni di estrazione sono state scelte sulla base di un piano sperimentale in cui sono state definite le condizioni di pressione (da 10 a 30 MPa), temperatura (da 35 a 50°C) e tempo (da 10 a 180 minuti) per ottenere la massima resa di prodotto alla fine dell'estrazione. È stato aggiunto etanolo come co-solvente in percentuale pari al 10% (p/p) per aumentare la capacità dell'anidride carbonica di estrarre composti fenolici polari. L'anidride carbonica è stata pompata all'interno dell'impianto con una portata di 2 L / h per garantire tempi di contatto prolungati tra il solvente e il campione.

2.3 Estrazione con apparato Soxhlet

L'estrazione con solvente è stata eseguita con un sistema Soxhlet utilizzando etanolo. Circa 150 mL di etanolo sono stati usati e fatti percolare attraverso 10 grammi di polvere di *Picea abies*. L'estrazione è durata 6 ore alla temperatura di ebollizione del solvente.

2.4 Determinazione dell'attività antimicrobica degli estratti

2.4.1 Crescita microbica

Gli estratti ottenuti dai residui legnosi di *Picea abies* sono stati testati su due microrganismi gram-positivi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus thermophilus* (ATCC 19258). I ceppi microbici sono stati conservati in brodo di coltura (Tryptone soy broth, TSB) e glicerolo (20:80 p/p) a -80°C fino al momento degli esperimenti. Per gli esperimenti, le colture microbiche sono state conservate su terreno solido (Tryptone soy agar, TSA) a 4°C e rigenerate mensilmente.

2.4.2 Inibizione della crescita microbica determinata con calorimetria isoterma

L'attività antimicrobica degli estratti di *Picea abies* è stata valutata sulla crescita di *E. faecalis* ed *S. thermophilus* mediante calorimetria isoterma (Thermal Activity Monitor, Model 421 TAM III, TA Instruments). Per eseguire l'esperimento, una colonia dei due ceppi microbici è stata trasferita in 10 mL di brodo di coltura (TSB) ed incubata a 37°C per *E. faecalis* e 40°C per *S. thermophilus*. Il tempo di incubazione è stato fissato a 18 ore per ottenere le cellule in fase di crescita stazionaria. Le sospensioni microbiche con una concentrazione finale di 10^8 UFC/mL (unità formanti colonie per mL) sono state diluite in TSB ottenendo soluzioni con una concentrazione microbica finale pari a 10^5 UFC/mL. Anche gli estratti di *Picea abies* ottenuti con estrazione con fluidi supercritici ed estrazione Soxhlet sono stati diluiti in brodo di coltura TSB sterile. Quindi, sono stati miscelati con le colture microbiche raggiungendo concentrazioni finali pari a 1, 3 e 5 mg/mL. Circa 1 mL dei campioni preparati sono stati successivamente trasferiti in provette di acciaio inossidabile (precedentemente sterilizzate) per iniziare l'analisi con calorimetria isotermica. Il calore generato durante le crescite microbiche in assenza e presenza di estratti è stato monitorato per 24 ore alle temperature di crescita dei microrganismi. Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato.

2.4.3 Identificazione dei composti fenolici responsabili dell'attività antimicrobica degli estratti

I composti fenolici degli estratti di *Picea abies* sono stati identificati mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPL-MS) utilizzando lo strumento Q-Exactive Orbitrap HRMS (Thermo Scientific, Milano, Italia) accoppiato ad un UHPLC (Ultimate 300). È stata utilizzata una colonna LC Accucore RP-MS (100 mm × 2,1 mm id, 2,6 μm) con una precolonna (Thermo Scientific, Milano, Italia) per ottenere la separazione dei composti fenolici. Le diverse masse dei composti sono state selezionate nel range da 100 a 1.000 m/z con una risoluzione di 70.000 ad un valore di 200 m/z, controllo del guadagno di $1 \cdot 10^6$, massimo tempo di iniezione di 175 ms. I composti fenolici presenti negli estratti sono stati identificati in base al tempo di ritenzione e all'assorbanza UV misurata a 280 nm. I tempi di ritenzione sono stati confrontati con quelli di standard analitici. La correlazione delle abbondanze relative dei composti chimici e l'integrazione dell'area sotto ciascun picco sono state eseguite utilizzando il software Compound Discoverer 2.1 (Thermo Scientific, Milano, Italia).

Per identificare i composti fenolici responsabili dell'attività di inibizione, circa 5 mg di estratto sono stati aggiunti ad 1 mL di brodo di coltura (TSB) in presenza ed assenza del ceppo microbico di *E. faecalis* inoculato con una concentrazione pari a 10^6 UFC/mL. Entrambi i campioni sono stati incubati a 37 °C per 24 ore. È stato inoltre preparato un terzo campione aggiungendo 5 mg di estratto ad 1 mL di brodo di coltura (TSB). I tre campioni sono stati analizzati mediante HPLC-MS. Per la fase di preparazione dei campioni, sono stati aggiunti 5 mL di una soluzione MeOH/acqua (70:30) a 500 mg del campione. La miscela è stata agitata su vortex per 5 minuti, sonicata a temperatura ambiente per 15 minuti e centrifugata a 10.000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato filtrato utilizzando filtri per siringa da 0.2 μm prima dell'analisi. Sono state eseguite tre estrazioni indipendenti per ciascun campione. L'analisi è stata effettuata in triplicato ed i risultati sono stati espressi come valori medi e deviazione standard.

3. Risultati e discussioni

3.1 Estrazione con sistema Soxhlet ed anidride carbonica supercritica

In questo paragrafo viene illustrato il processo di estrazione dai residui legnosi di *Picea abies* effettuato con le due diverse tecnologie (Figura 1). Il processo di estrazione con anidride carbonica supercritica è stato effettuato alla temperatura di 45°C, pressione di 20 MPa per un tempo pari a 120 minuti. Alla fine del processo la resa, calcolata come rapporto tra i grammi di estratto e quelli del campione di legno usato per l'estrazione, è risultata pari a 3.4 ± 0.5% (p/p).

L'estrazione con sistema Soxhlet è stata effettuata utilizzando etanolo come solvente. La temperatura è stata impostata a 76°C ed il processo è durato 5 ore. Alla fine dell'estrazione l'estratto è stato recuperato facendo evaporare il solvente. La resa è risultata pari al 2.6 ± 0.7% (p/ p).

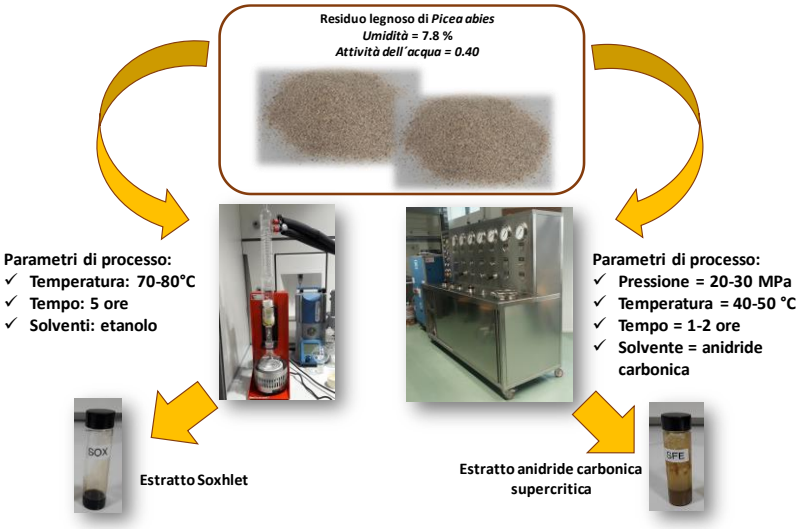

Fig. 1 – Estrazione con sistema Soxhlet e con anidride carbonica supercritica dai residui legnosi di *Picea abies*.

La caratterizzazione chimica di entrambi gli estratti è stata effettuata con HPLC-MS ed è riportata in Tabella 1.
I composti fenolici presenti in maggiore quantità sono: l'acido metilbenzoico, l'acido gallico, la catechina, la diidroquercetina, l'idrossipinoresinolo e l'isorapontina. Tali composti sono stati identificati in entrambi gli estratti.

Tabella 1 – Caratterizzazione chimica degli estratti di *Picea abies* ottenuti con tecnologia Soxhlet ed anidride carbonica supercritica (SFE). La tabella è stata adattata dal lavoro di Haman et al., 2019.

Composto	Formula	$[M-H]^-$ teorica	$[M-H]^-$ misurata	Area estratto SFE $1*10^6$	Area estratto Soxhlet $1*10^6$
Acido 2-Metilbenzoico	$C_8H_8O_2$	135.0452	135.0450	61.8 ± 0.8	50.1 ± 0.5
Acido cinnamico	$C_9H_8O_2$	147.0451	147.0452	2.03 ± 0.1	1.5 ± 0.4
Acido protocatecuico	$C_7H_6O_4$	153.0193	153.0192	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2
Acido cumarico	$C_9H_8O_3$	163.0401	163.0401	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.4
Acido gallico	$C_7H_6O_5$	169.0142	169.0143	4.1 ± 0.3	3.1 ± 0.5
Acido ferulico	$C_{10}H_{10}O_4$	193.0506	193.0507	0.60 ± 0.13	0.55 ± 0.12
(+)-Catechina	$C_{15}H_{14}O_6$	289.0718	289.0720	1.6 ± 0.3	0.84 ± 0.01
Diidrossiquercitina (Taxifolina)	$C_{15}H_{12}O_7$	303.0513	303.0513	59 ± 2	42 ± 3
(+)-6-idrossipinoresinolo	$C_{20}H_{22}O_7$	373.1293	373.1293	312 ± 23	201 ± 12
Astringina	$C_{20}H_{22}O_2$	405.1191	405.1196	16 ± 1	10 ± 2
Isorapontina	$C_{21}H_{24}O_9$	419.1348	419.1349	432 ± 56	323 ± 15

3.2 Crescita microbica descritta con la calorimetria isoterma

La crescita microbica in presenza ed assenza di estratti di *Picea abies* è stata monitorata con la tecnica della calorimetria isoterma.

La Figura 2 (linea tratteggiata) mostra il tipico segnale calorimetrico che si può ottenere durante una crescita microbica in presenza di aria e nutrienti presenti ad libitum. L'andamento del flusso di calore (*dq/dt* in funzione del tempo) presenta una forma caratteristica che può essere spiegata qualitativamente dividendo il segnale in tre fasi distintive:

- una prima fase costituita da un tempo di ritardo iniziale durante la quale la quantità di calore generato è trascurabile;
- una seconda fase durante la quale il flusso di calore aumenta esponenzialmente associata alla crescita metabolica delle cellule;
- una terza fase in cui si osserva una rapida diminuzione del flusso di calore che si verifica quando l'ossigeno oppure i nutrienti necessari diminuiscono inibendo la crescita dei microrganismi.

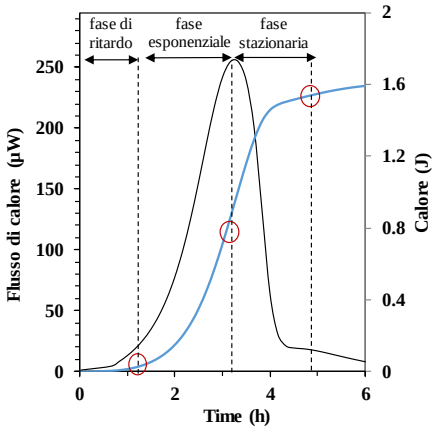

Fig. 2 – Flusso di calore generato durante la crescita microbica di *S. thermophilus* in presenza di ossigeno a concentrazione di 10^7 log(UFC/mL) (linea continua nera). Calore generato durante la crescita microbica di *S. thermophilus* (linea continua blu) ottenuto integrando l'area delimitata dalla curva del flusso di calore. I cerchi rossi indicano, rispettivamente: il tempo di inizio della crescita esponenziale, il massimo valore del calore generato durante la crescita, il calore totale sviluppato durante la crescita. Sono, inoltre, indicate le tre fasi della crescita microbica: la fase di ritardo, la fase di crescita esponenziale e la successiva fase di crescita stazionaria.

3.2.1 Determinazione Parametri Termocinetici della Crescita Microbica

La Figura 3-A mostra i tracciati della crescita microbica di *S. thermophilus* ottenuti con la calorimetria isoterma a 37°C. La concentrazione iniziale di carica microbica varia da 10^1 a 10^7 UFC/mL. La Figura 3-B, invece, rappresenta i valori del calore totale sviluppato durante la crescita microbica ottenuto integrando l'area delimitata dalla curva del flusso di calore per le diverse concentrazioni iniziali di carica microbica.

Gli andamenti del calore in funzione del tempo possono essere descritti dalla funzione di Gompertz modificata riportata di seguito:

$$q(t) = Q_{tot} \cdot exp[-exp(\mu_{max} \cdot e) \cdot (\lambda - t) + 1]$$

in cui Q_{tot} è il calore totale prodotto durante l'intero processo di crescita, calcolato come l'area sottesa dalla curva del flusso di calore; λ è il tempo di ritardo, definito come il periodo iniziale durante il quale la quantità di calore generato dalla crescita microbica è trascurabile; μ_{max} è la massima velocità di crescita calcolata come la pendenza più alta misurata lungo la curva del flusso di calore.

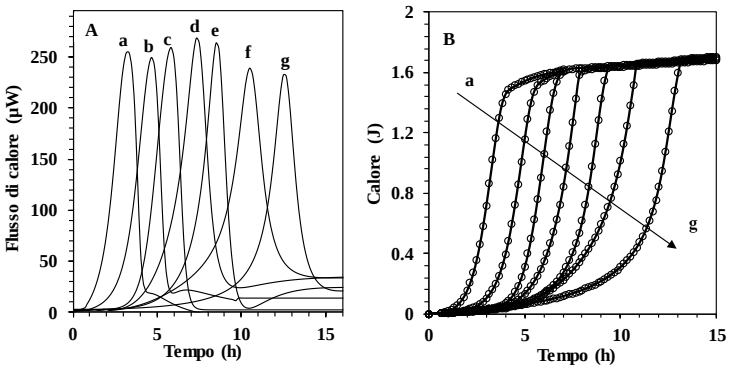

Fig. 3 – (A) Flusso di calore generato durante la crescita di *S. thermophilus* in presenza di ossigeno a diverse concentrazioni da 10^7 (a) a 10^1 log(UFC/mL) (g). (B) Calore sviluppato durante la crescita microbica ottenuto integrando le aree delimitate dalle curve del flusso di calore.

Inoltre, dalle curve del flusso di calore in funzione del tempo è stato possibile misurare il valore massimo del flusso di calore (Φ_{max}) ed il tempo al quale questo valore è stato misurato (t_p). Tutti i valori ottenuti per entrambi i microrganismi sono riportati nella tabella seguente (Tabella 2).

Tabella 2 – Parametri termocinetici ottenuti dai tracciati calorimetrici della crescita microbica di *S. thermophilus* ed *E. faecalis*.

Microrganismo	Concentrazione microbica iniziale	$100^*\mu_{max}$ h^{-1}	λ h	Q_{tot} J	t_p h	Φ_{max} μW
S. thermophilus	10^7	6.7 ± 0.1^{ab}	2.3 ± 0.2^{g}	1.68 ± 0.31^{b}	4.0 ± 0.4^{e}	254 ± 12^{ab}
	10^6	6.3 ± 0.1^{ab}	3.5 ± 0.3^{f}	1.69 ± 0.24^{b}	4.7 ± 0.3^{de}	249 ± 19^{ab}
	10^5	6.5 ± 0.1^{ab}	4.8 ± 0.3^{e}	1.61 ± 0.43^{c}	5.8 ± 0.3^{d}	259 ± 11^{a}
	10^4	6.3 ± 0.1^{ab}	6.5 ± 0.4^{d}	1.60 ± 0.54^{c}	7.3 ± 0.3^{c}	268 ± 15^{ab}
	10^3	6.1 ± 0.1^{ab}	7.4 ± 0.3^{c}	1.62 ± 0.61^{b}	8.5 ± 0.4^{c}	263 ± 25^{ab}
	10^2	6.1 ± 0.1^{ab}	8.7 ± 0.4^{b}	1.61 ± 0.91^{a}	10.5 ± 0.4^{b}	239 ± 23^{ab}
	10^1	5.5 ± 0.1^{c}	10.9 ± 0.6^{a}	1.63 ± 0.72^{b}	12.3 ± 0.6^{a}	232 ± 28^{b}
E. faecalis	10^7	6.1 ± 0.1^{a}	3.1 ± 0.2^{f}	2.38 ± 0.31^{ab}	5.1 ± 0.2^{f}	239 ± 10^{a}
	10^6	6.3 ± 0.1^{a}	3.4 ± 0.2^{f}	2.38 ± 0.33^{ab}	5.3 ± 0.4^{f}	242 ± 12^{a}
	10^5	5.7 ± 0.2^{a}	4.5 ± 0.3^{e}	2.44 ± 0.22^{ab}	6.5 ± 0.3^{e}	245 ± 19a
	10^4	5.5 ± 0.1^{b}	6.4 ± 0.3^{d}	2.76 ± 0.41^{b}	8.2 ± 0.2^{d}	229 ± 11^{a}
	10^3	5.1 ± 0.1^{b}	7.7 ± 0.4^{c}	2.29 ± 0.54^{ab}	9.7 ± 0.3^{c}	220 ± 15^{a}
	10^2	5.2 ± 0.1^{b}	10.7 ± 0.4^{b}	2.94 ± 0.62^{a}	11.5 ± 0.4^{b}	215 ± 25^{a}
	10^1	5.4 ± 0.1^{b}	12.5 ± 0.4^{a}	2.95 ± 0.89^{a}	13.2 ± 0.4^{a}	207 ± 23^{a}

3.2.2 Correlazione tra i parametri termocinetici della crescita microbica

La Tabella 3 riporta i coefficienti di correlazione di Pearson tra la concentrazione microbica iniziale ed i parametri ricavati dai tracciati calorimetrici e riportati in Tabella 2. La correlazione più forte è stata osservata tra il logaritmo della concentrazione microbica ed il tempo di ritardo (λ) o il tempo al quale il massimo flusso di calore è stato misurato (t_p), con valori dei coefficienti di Pearson pari a -0.995 e -0.990 (n = 7, p = 0,01), rispettivamente.

Tabella 3 – Indici di correlazione di Pearson tra la concentrazione microbica iniziale ed i parametri termocinetici ottenuti dai termogrammi della crescita microbica. **Correlazione significativa a livello 0.01.

	Concentrazione microbica iniziale (UFC/mL)	μ_{max} (h^{-1})	λ (h)	Q_{tot} (J)	t_p (h)
μ_{max} (h^{-1})	0.632	-			
λ (h)	-0.995**	-0.625	-		
Q_{tot} (J)	-0.439	-0.358	0.402	-	
t_p (h)	-0.990**	-0.600	0.993**	0.497	-
Φ_{max} (μW)	0.488	0.237	-0.505	-0.740	-0.580

I risultati hanno, inoltre, dimostrato che, all'interno dell'intervallo di concentrazioni microbiche utilizzate in questo studio compreso tra 10^1 a 10^7 UFC/mL, il tempo di ritardo della crescita microbica è aumentato in modo significativo ($p < 0.01$) con valori che sono passati da 2.3 ± 0.2 a 10.9 ± 0.6 ore. I dati mostrano una correlazione lineare tra il logaritmo della concentrazione microbica iniziale ed il tempo di ritardo della crescita ($R^2 = 0.99$) con equazione pari a λ = -

1.39*C + 11.11 (C indica il log(UFC/mL)) per *S. thermophilus*. Risultati simili sono stati ottenuti anche per la crescita microbica di *E. faecalis*. Anche in questo caso, è stata osservata una relazione lineare (R^2 = 0.99) con l'equazione pari a λ = -1.59*C + 19.57. Le altre variabili, quali il calore totale (Q_{tot}), la massima velocità di crescita (μ_{max}) ed il massimo flusso di calore (Φ_{max}), non hanno mostrato alcuna correlazione con la concentrazione iniziale di carica microbica. Per questi motivi, il tempo di ritardo della crescita (λ) è stato utilizzato come indice di crescita microbica per spiegare i successivi risultati in cui gli estratti di *Picea abies* sono stati aggiunti alle colture microbiche.

3.3 Attività antimicrobica degli estratti di *Picea abies*

Di seguito vengono riportati i risultati dell'attività antimicrobica degli estratti di *Picea abies* sui ceppi microbici di *Streptococcus thermophilus* ed *Enterococcus faecalis*. Sono stati effettuati dodici esperimenti in doppio per testare l'attività antimicrobica degli estratti (n = 12) ottenuti dall'estrazione con sistema Soxhlet ed anidride carbonica supercritica. Per ogni tecnologia di estrazione, il tempo di ritardo nella crescita dei due ceppi microbici è stato ottenuto utilizzando tre concentrazioni di estratto aggiunte alle colture microbiche.
La Figura 4-A mostra i risultati del flusso di calore ottenuti per *S. thermophilus* in assenza e presenza di concentrazioni crescenti di estratto di *Picea abies* ottenuti dal processo con anidride carbonica supercritica. In modo simile, la Figura 4-B mostra i risultati del flusso di calore ottenuti per lo stesso microrganismo a cui sono stati aggiunti concentrazioni crescenti di estratto ottenuto con il sistema Soxhlet utilizzando etanolo come solvente. In entrambi i casi, in presenza dell'estratto la crescita microbica è stata rallentata come dimostrano i valori dei tempi di ritardo (λ) che aumentano aggiungendo concentrazioni crescenti di estratto.

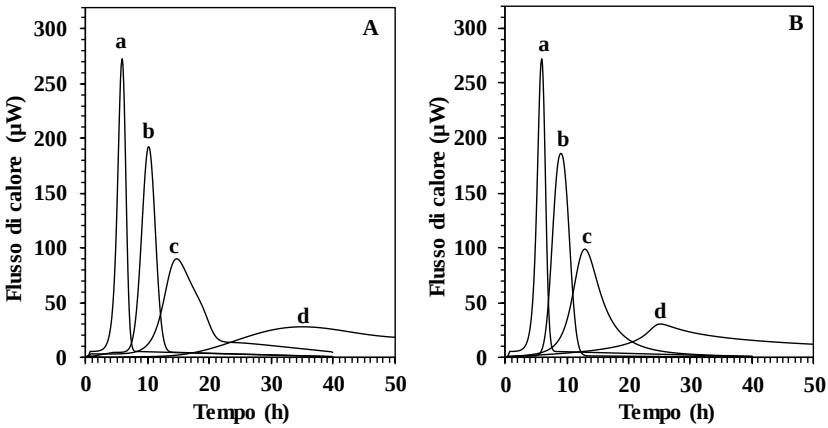

Fig. 4 – Termogrammi relativi alla crescita microbica di *S. thermophilus* in assenza (a) e presenza di concentrazioni crescenti di estratto di *Picea abies* ((b) 1 mg/mL (c) 3 mg/mL (d) 5 mg/mL)). Estratti ottenuti con anidride carbonica supercritica (A) ed estrazione Soxhlet (B).

Inoltre, i tracciati calorimetrici ottenuti per la crescita microbica in presenza di estratto sono stati caratterizzati un valore più basso del calore sviluppato durante la crescita (Q_{tot}) ed conseguentemente anche da un valore minore del massimo flusso di calore massimo (Φm_{ax}). I risultati hanno anche indicato una velocità di crescita microbica minore all'aumentare della concentrazione di estratto aggiunta alla coltura microbica (μ_{max}).

Nelle Tabelle che seguono sono stati riportati i parametri termocinetici ricavati dai tracciati calorimetrici per i due microrganismi a cui sono stati aggiunti gli estratti ottenuti con anidride carbonica supercritica e tecnologia Soxhlet (Tabelle 4 e 5).

Tabella 4 – Parametri termocinetici ottenuti dai tracciati calorimetrici della crescita microbica di *S. thermophilus* in presenza di estratto ottenuto dall'estrazione con anidride carbonica supercritica e Soxhlet.

Tecnologia di estrazione	Concentrazione estratto mg/mL	$100*\mu_{max}$ (h^{-1})	λ (h)	Q_{tot} (J)	t_p (h)	Φ_{max} (μW)
	-	6.7 ± 0.1	4.8 ± 0.3	2.2 ± 0.4	6 ± 0.3	259 ± 11
Anidride carbonica supercritica	1	5.3 ± 0.1	7.9 ± 0.7	2.5 ± 0.2	10 ± 4	144 ± 2
	3	4.3 ± 0.2	8.9 ± 0.2	1.4 ± 0.4	15 ± 2	94 ± 8
	5	0.8 ± 0.2	12.4 ± 0.6	1.1 ± 0.3	35 ± 2	30 ± 16
Soxhlet	1	5.1 ± 0.01	7.7 ± 2.0	2.1 ± 0.1	8 ± 1	189 ± 17
	3	3.6 ± 0.01	8.6 ± 0.5	1.8 ± 0.1	12 ± 3	105 ± 22
	5	2.8 ± 0.01	10.5 ± 0.8	1.7 ± 0.1	27 ± 1	24 ± 6

Tabella 5 – Parametri termocinetici ottenuti dai tracciati calorimetrici della crescita microbica di *E. faecalis* in presenza di estratto ottenuto dall'estrazione con anidride carbonica supercritica e Soxhlet.

Tecnologia di estrazione	Concentrazione estratto (mg/mL)	$100*\mu_{max}$ (h^{-1})	λ (h)	Q_{tot} (J)	t_p (h)	Φ_{max} (μW)
	-	6.0 ± 0.1	6.4 ± 0.3	2.8 ± 0.5	8 ± 1	229 ± 11
Anidride carbonica supercritica	1	4.1 ± 0.1	11.2 ± 1.3	2.3 ± 0.3	12 ± 1	153 ± 14
	3	3.6 ± 0.1	18.2 ± 0.4	2.0 ± 0.1	24 ± 2	49 ± 1
	5	0.9 ± 0.4	27.7 ± 1.1	1.7 ± 0.5	37 ± 1	40 ± 13
Soxhlet	1	4.0 ± 0.1	8.5 ± 0.1	2.4 ± 0.2	10 ± 1	149 ± 2
	3	1.5 ± 0.2	12.0 ± 0.9	2.1± 0.2	15 ± 2	42 ± 2
	5	0.5 ± 0.2	24.0 ± 0.9	1.6 ± 0.1	32 ± 2	32 ± 10

3.3.1 Effetto del tipo e quantità di estratto sulla crescita microbica

I risultati ottenuti dai termogrammi riportati nelle Tabelle 4 e 5 sono stati analizzati statisticamente per definire l'effetto (1) della concentrazione di estratto (1, 3 e 5 mg/mL), (2) del tipo di estratto ottenuto con le due diverse tecnologie di estrazione (anidride carbonica supercritica *vs.* Sohxlet) e (3) del tipo di microrganismo (*E. faecalis* vs. *S. thermophilus*). La variabile dipendente scelta per l'analisi statistica è stata il tempo di ritardo della crescita microbica. Come mostrato precedentemente, questa variabile ha mostrato una correlazione lineare con il logaritmo della concentrazione microbica iniziale. I risultati dell'analisi statistica sono riportati in Tabella 6. L'effetto più importante sul tempo di ritardo della crescita microbica è stato dato dalla concentrazione dell'estratto, che rappresentava più del 40% della varianza totale (η^2). Un ulteriore 16% della varianza è stato attributo all'interazione tra la concentrazione di estratto ed il ceppo microbico. La presenza di tale interazione indica che il ceppo microbico di *E. faecalis* risulta più sensibile all'aggiunta dell'estratto di *Picea abies* rispetto al ceppo di *S. thermophilus*. Per ogni concentrazione di estratto aggiunta alle due colture microbiche, i tempi di ritardo medi osservati per il ceppo di *E. faecalis* (M=16.9, SD=7.4) sono risultati significativamente più elevati di quelli ottenuti per il ceppo di *S. thermophilus* (M=9.4, SD=1.9). Questo effetto superiore è risultato ancora più evidente quando concentrazioni più alte di estratto sono state aggiunte ad entrambe le colture microbiche. I risultati indicano chiaramente che il ceppo microbico di *S. thermophilus* ha una maggiore resistenza all'azione antimicrobica dell'estratto di *Picea abies* rispetto a quello di *E. faecalis*. Questa maggiore resistenza potrebbe essere dovuta alla capacità di *S. thermophilus* di formare piccoli fiocchi durante la crescita che in questo modo risultano meno esposte all'azione dell'agente antimicrobico (Hardie et al., 2003). Al contrario, *E. faecalis* forma durante la crescita piccoli filamenti, che risultano, quindi, direttamente esposti all'azione dell'estratto di *Picea abies* (Tenover 2006; Davies et al., 2010).

Tabella 6 – Risultati dell'analisi statistica effettuata sui tempi di ritardo della crescita microbica (λ) in presenza di diverse concentrazioni di estratto ottenute con le due diverse tecnologie di estrazione.

Source	SS	df	MS	F	p	η^2
A: *S.thermophilus* vs. *E. faecalis*	344.78	1	344.78	394.9	<0.001	35%
B: Anidride carbonica supercritica vs. Soxhlet	37.53	1	37.53	43.0	<0.001	4%
C: Concentrazione estratto	403.16	2	201.58	230.9	<0.001	41%
AB:	17.00	1	17.00	19.5	<0.001	2%
AC:	156.75	2	78.37	89.8	<0.001	16%
BC:	3.64	2	1.82	2.1	<0.167	0.4%
ABC:	4.57	2	2.28	2.6	<0.114	0.5%
Errore	10.48	12	0.87			1%
Totale	977.90	23				

Figura 5-A mostra l'effetto della concentrazione di estratto usata sui due ceppi microbici. Questa interazione significativa tra tipo di microrganismo e concentrazione di estratto è stata confermata anche dai risultati dell'analisi statistica riportati in Tabella 5 che mostrano un $F(2,12) = 89.8$ ($p< 0.001$).
L'analisi mostra che la tecnologia di estrazione gioca anch'essa un ruolo significativo ($F(1,12) = 43$, $p< 0.001$) sulla crescita microbica, anche se il suo effetto è inferiore ($\eta^2 = 4\%$). Tale effetto è mostrato in Figura 5-B in cui gli estratti ottenuti con anidride carbonica supercritica hanno un'azione superiore solo se utilizzati sul ceppo microbico di *E. faecalis*. I risultati sembrano indicare che l'estratto ottenuto con anidride carbonica supercritica presenta una composizione che lo rende più efficace verso *E. faecalis* rispetto al ceppo microbico di *S. thermophilus*. Questa ipotesi è stata confermata dall'interazione

significativa tra i ceppi microbici e la tecnologia di estrazione ($F(1,12)=19.5$, $p< 0.001$, $\eta^2 = 2\%$).
La Figura 5-C mostra che per entrambe le tecnologie di estrazione, il tempo di ritardo aumenta con la concentrazione di estratto aggiunta alla coltura microbica. Inoltre, per le due concentrazioni più alte di estratto il tempo di ritardo della crescita microbica per la tecnologia SFE è significativamente più alto di quello della tecnologia Soxhlet (SOX).

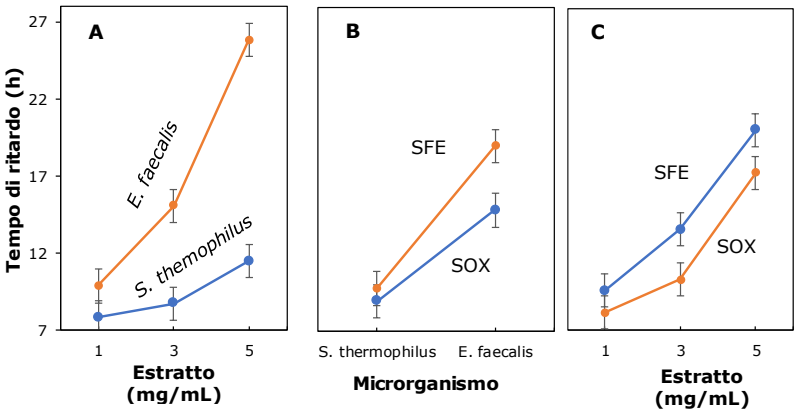

Fig. 5 – Effetto della concentrazione di estratto, tipo di microrganismo e tecnologia di estrazione sul tempo di ritardo della crescita microbica (λ).

3.4 Composti fenolici responsabili dell'azione antimicrobica degli estratti di *Picea abies*

In questo paragrafo vengono riportati i risultati ottenuti con lo scopo di individuare i composti fenolici presenti nell'estratto di *Picea abies* responsabili dell'attività antimicrobica. A questo scopo, due campioni di una coltura microbica di *E. faecalis* (10^6 UFC/mL) sono stati preparati lasciandoli crescere a 37°C per 24 ore in condizioni aerobiche con l'aggiunta di estratti ottenuti (5 mg/mL) con le due diverse tecnologie. Si è scelto questo microrganismo poiché dai risultati precedenti ha dimostrato una maggiore sensibilità all'attività antimicrobica dell'estratto di *Picea abies*. La coltura microbica prima e dopo le 24 ore di incubazione è stata analizzata con HPLC-MS identificando

i principali composti fenolici presenti negli estratti. I risultati sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7 – Composti fenolici presenti in un campione di coltura microbica di *E. faecalis* con una concentrazione pari a 10^6 UFC/mL al quale 5 mg/mL di estratto di *Picea abies* sono stati aggiunti. L'analisi è stata effettuata con HPLC-MS in assenza e presenza di microrganismo in condizioni di crescita aerobica a 37°C dopo 24 ore.

Composto	Inibizione estratto SFE (%)	Inibizione estratto Soxhlet (%)
Acido 2-Metilbenzoico	11 ± 1.3	3.6 ± 0.5
Acido cinnamico	66.5 ± 3.4	26.7 ± 3.2
Acido protocatecuico	66.6 ± 3.1	27.3 ± 2.2
Acido cumarico	6.3 ± 0.5	7.7 ± 1.1
Acido gallico	53.7 ± 3.2	19.4 ± 1.2
Acido ferulico	15 ± 2.3	7.3 ± 0.8
(+)-Catechina	94.4 ± 8.3	58.8 ± 4.1
Diidrossiquercitina (Taxifolina)	67.8 ± 3.5	16.7 ± 1.4
(+)-6-idrossipinoresinolo	15.1 ± 1.8	11.4 ± 1.1
Astringina	92.2 ± 5.4	73.1 ± 1.5
Isorapontina	27.8 ± 3.2	19.8 ± 2.1

Dopo le 24 ore di contatto tra il ceppo microbico e l'estratto, sono stati osservati diminuzioni significative ($p < 0.05$) di alcuni composti fenolici quali catechina, diidroquercitina, astringina e isorapontina. Il consumo di questi composti è probabilmente da attribuire alla loro azione antimicrobica. I valori di inibizione, riportati in Tabella 6, indicano che entrambi gli estratti hanno un'azione antimicrobica. Per alcuni composti fenolici (quali l'acido cinnamico,

l'acido protocatecuico e l'acido gallico) l'inibizione è risultata più alta per gli estratti ottenuti con l'anidride carbonica supercritica.
Alcuni studi hanno mostrato l'effetto antimicrobico degli estratti di *Picea abies* contro funghi e batteri gram-positivi e gram-negativi (Radulescu et al., 2011; Puupponen-Pimiä et al., 2001; Rauha et al., 2000). Gli estratti sono stati ottenuti mediante distillazione in corrente di vapore ed estrazione con solvente. I composti fenolici presenti negli estratti sono la quercetina, il camferolo e la miricetina tutti identificati come principali responsabili dell'attività antimicrobica (Plumed-Ferrer et al., 2013). Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che i composti fenolici presenti nell'estratto di *Picea abies* come la pinosilvina, l'astringina, il piceatannolo, l'isorapontina, e isorapontigenina hanno mostrato attività antimicrobica contro microrganismi gram-negativi quali la Salmonella e batteri gram-positivi quali *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e contro lieviti quali *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisae*. Inoltre, in uno studio recente composti fenolici estratti dal *Pinus sylvestris* e dall'abete rosso *Picea abies* sono stati testati al fine di evidenziare la loro attività antibatterica (Metsämuuronen et al., 2019). È stato dimostrato che i principali composti fenolici presenti nell'estratto di *Picea abies* quali la quercetina, la diidroquercitina e la miricetina hanno ancora una volta riportato un'alta attività antimicrobica contro diversi batteri.

4. Conclusioni

In questo capitolo è stata confrontata l'attività antimicrobica di estratti ottenuti da residui legnosi di *Picea abies*. Sono state testate due diverse tecnologie di estrazione: un'estrazione con anidride carbonica supercritica ed un'estrazione con tecnologia Soxhlet. Entrambi gli estratti hanno indotto un maggiore effetto antimicrobico sulla crescita di *E. faecalis* rispetto a *S. thermophilus*. Per entrambi i ceppi microbici, in presenza di estratto la crescita è stata caratterizzata da un tempo di ritardo più lungho (λ), un calore (Q_{tot}) sviluppato durante la crescita più basso e di conseguenza valori inferiori del massimo flusso di calore (Φ_{max}). Anche la velocità di crescita (μ_{max}) risulta diminuita aumentando la dose dell'estratto aggiunta alla coltura microbica.

Questa inibizione è stata associata ad alcuni composti fenolici, come la catechina, la diidroquercitina, l'astringina e l'isorapontina, che sono stati rilevati in minore concentrazione dopo 24 ore di contatto tra la coltura microbica e l'estratto.
In conclusione, i risultati riportati in questo capitolo forniscono prospettive interessanti sull'utilizzo di estratti naturali provenienti da fonti sostenibili come alternativa ai composti sintetici ad oggi in uso in prodotti alimentari, cosmetici e farmaceutici.

Bibliografia

Salem MZM, Elansary HO, Elkelish AA, Zeidler A, Ali HM, Yessoufou K (2016): *In vitro bioactivity and antimicrobial activity of Picea abies and Larix decidua wood and bark extracts*. BioResources 11, 9421-9437.

Grassmann J, Hippeli S, Vollmann R, Elstner EF (2003): *Antioxidative properties of the essential oil from Pinus mugo*. J. Agric. Food Chem. 51, 7576-7582.

Bianchi S, Gloess AN, Kroslakova I, Mayer I, Pichelin F (2014): *Analysis of the structure of condensed tannins in water extracts from bark tissues of Norway spruce (Picea abies [Karst.]) and Silver fir (Abies alba [Mill.]) using MALDI-TOF mass spectrometry*. Industrial Crops and Products 61, 430-437.

Kusumoto N, Zhao T, Swedjemark G, Ashitani T, Takahashi K, Borg-Karlson A (2014): *Antifungal properties of terpenoids in Picea abies against H eterobasidion parviporum*. For Pathol. 44, 353-361.

Minova S, Sešķēna R, Voitkāne S, Metla Z, Daugavietis M, Jankevica L (2015): *Impact of pine (Pinus sylvestris L.) and spruce (Picea abies (L.) Karst.) bark extracts on important strawberry pathogens.* Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural Exact and Applied Sciences 69, 62-67.

Sahin HT, Yalcin OU (2017): *Chemical Composition and Utilization of Conifer Needles-A Review*. Journal of Applied Life Sciences International, 1-11.

Alañón ME, García-Ruiz A. Díaz-Maroto M, Pérez-Coello MS, Moreno-Arribas M (2015): *Antimicrobial and antioxidant activity of pressurized liquid extracts from oenological woods.* Food Control 50, 581-588.

Politi FA, de Mello JC, Migliato KF, Nepomuceno AL, Moreira RR, Pietro RC (2011): *Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities and determination of the total tannin content of bark extracts Endopleura uchi.* International journal of molecular sciences 12, 2757-2768.

Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H, Parajó JC (2011): *Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials*. J Agric Food Chem 49, 2459-2464.

Becvárová P, Horváth M, Sarapatka B, Zouhar V (2018): *Dynamics of soil organic carbon (SOC) content in stands of Norway spruce (Picea abies) in central Europe*. Forest Biogeosciences and Forestry 11, 734-742.

Neiva DM, Araújo S, Gominho J, de Cássia Carneiro A, Pereira H (2018): *An integrated characterization of Picea abies industrial bark regarding chemical composition, thermal properties and polar extracts activity*. PloS One 13, e0208270.

Tanase C, Cosarca S, Toma F, Mare A, Cosarca A, Mare A (2018): *Antibacterial activities of spruce bark (Picea abies L.) extract and its components against human pathogens*. Rev Chim. 69, 1462-1467.

Vainio-Kaila T, Kyyhkynen A, Rautkari L, Siitonen A (2015): *Antibacterial Effects of Extracts of Pinus sylvestris and Picea abies against Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, and Streptococcus pneumoniae*. BioResources 10, 7763-7771.

Vardar-Ünlü G, Candan F, Sökmen A, Daferera D, Polissiou M, Sökmen M (2003): *Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of Thymus pectinatus Fisch. et Mey. Var. pectinatus (Lamiaceae).* J Agric Food Chem. 51, 63-67.

Liu X, Zhao M, Wang J, Luo W (2009): *Antimicrobial and antioxidant activity of emblica extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction and methanol extraction*. J Food Biochem 33, 307-330.

Wetwitayaklung P, Thavanapong N, Charoenteeraboon J (2009): *Chemical constituents and antimicrobial activity of essential oil and extracts of heartwood of Aquilaria crassna obtained from water distillation and supercritical fluid carbon dioxide extraction*. Silpakorn University Science and Technology Journal 3, 25-33.

Eller FJ, King JW (2000): *Supercritical carbon dioxide extraction of cedarwood oil: a study of extraction parameters and oil characteristics.* Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques 11, 226-231.

Pasquini D, Pimenta MTB, Ferreira LH, da Silva C, Aprigio A (2005): *Extraction of lignin from sugar cane bagasse and Pinus taeda wood chips using ethanol–water mixtures and carbon dioxide at high pressures*. The Journal of supercritical fluids 36, 31-39.

González-Vila FJ, Bautista JM, Gutierrez A, Del Rio J, González A (2000): *Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from Eucalyptus globulus wood*. J. Biochem Biophys Methods 43, 345-351.

Cao H, Xiao JB, Xu M (2007): *Comparison of volatile components of Marchantia convoluta obtained by supercritical carbon dioxide extraction and petrol ether extraction*. Journal of Food Composition and Analysis 20, 45-51.

Caredda A, Marongiu B, Porcedda S, Soro C (2002): *Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of Laurus nobilis essential oil*. J Agric Food Chem. 50, 1492-1496.

Haman N, Morozova K, Tonon G, Scampicchio M, Ferrentino G (2019): *Antimicrobial Effect of Picea abies Extracts on E. coli Growth*. Molecules 24, 22.

Hardie JM, Whiley RA (2003): *Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology. Blackwell Science Ltd.

Tenover FC (2006): *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*. The American Journal of Medicine 119, S3-S10.

Davies J, Davies D (2010): *Origins and evolution of antibacterial resistance*. Microbiology and molecular biology reviews 74, 417-433.

Radulescu V, Saviu S, Chifiriu C, Oprea E, Ilies DC, Marutescu L, Lazar V (2011): *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Shoots Spruce (Picea abies L).* Rev. Chim. 62, 69-74.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM (2001): *Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. Journal of Applied Microbiology* 90, 494-507.

Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P (2000): *Antimicrobial effect of Finnish plant extracts*

containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology 56, 3-12.

Plumed-Ferrer C, Väkeväinen K, Komulainen H, Rautiainen M, Smeds A, Raitanen J-R, Eklund P, Willför S, Alakomi H-L, Saarela M, Wright A (2013): *The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms*. International Journal of Food Microbiology 164, 99-107.

Metsämuuronen S, Siren H (2019): *Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce*. Phytochem Rev. 18, 623–664.