

## Produzione commerciale e tecnologie di estrazione verde di fitoterapici gemmoderivati di *Castanea* spp.: il progetto FINNOVER

Dario Donno<sup>1,4\*</sup>, Federica Turrini<sup>2</sup>, Raffaella Boggia<sup>2</sup>, Maddalena Guido<sup>3</sup>, Maria Gabriella Mellano<sup>1,4</sup>, Gabriele Loris Beccaro<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari DISAFA, Università di Torino

<sup>2</sup>Dipartimento di Farmacia DIFAR, Università di Genova

<sup>3</sup>Azienda Agricola Geal Pharma, Bricherasio (TO)

<sup>4</sup>Chestnut R&D Center, Chiusa Pesio (CN)

### Introduzione

La fitoterapia nasce dall'osservazione empirica che alcune piante o parti di esse hanno un effetto terapeutico nei confronti di particolari patologie umane. Da alcuni anni si sta assistendo a un rinnovato interesse per la fitoterapia, le cui capacità curative sono state confermate da molti studi scientifici. Secondo l'Istituto Superiore di Sanità, nel 2010, in Europa è stato realizzato il 50% delle vendite mondiali di fitoterapici. Se in Africa, ancora nel 2007, l'80% della popolazione usava erbe medicinali, la percentuale di popolazione che si affidava alla medicina complementare o alternativa in Paesi industrializzati come il Canada, la Francia e il Giappone risultava rispettivamente del 50%, 75% e 85%. Inoltre, l'OMS indica che ancora nel 2010, l'80% della popolazione mondiale si affidava a sistemi di medicina tradizionale e base di erbe. In questo contesto, risulta di sempre più fondamentale importanza un controllo rigoroso su tutta la filiera di produzione almeno quanto quello applicato in campo agroalimentare.

Il progetto Interreg FINNOVER ("Strategie innovative per lo sviluppo di filiere verdi transfrontaliere") propone un percorso tecnico-economico per la creazione e lo sviluppo di nuove filiere per l'estrazione ecosostenibile e l'uso di composti bioattivi naturali in prodotti fitoterapici, alimenti, cosmetici e applicazioni fitofarmaceutiche. È ben noto, infatti, come le piante siano importanti fonti per la preparazione di rimedi naturali contenenti numerosi composti biologicamente attivi; in particolare, nei gemmoderivati sono presenti numerosi composti bioattivi: tutte queste molecole sono piuttosto variabili nel materiale vegetale, a seconda di genotipo (chemodiversità intraspecifica), diverse fasi di raccolta, condizioni pedoclimatiche dei siti di campionamento (selvatici o zone di coltivazione), agrotecniche usate, e manipolazione post-raccol-

ta. Grazie alla loro particolare composizione chimica e all'eccellente aroma, le gemme di castagno sono utilizzate in alcune applicazioni come materia prima per le industrie erboristiche e farmaceutiche. Infatti, il genere *Castanea* è, tra le erbe medicinali, quello più usato e popolare per i suoi effetti sui liquidi stagnanti e vascolari o contro cistiti ricorrente, grazie alle sue proprietà curative, antiossidanti e ricostituenti contro alcuni tipi di malattie cardiovascolari.

Diverse sono le tecniche di preparazione dei prodotti fitoterapici, a seconda della parte di pianta utilizzata; in particolare, un settore in grande espansione è quello dei gemmoderivati, prodotti fitoterapici derivanti da tessuti meristemati vegetali freschi (gemme, giovani germogli), i cui principi attivi vengono estratti mediante un processo di macerazione a freddo (3 settimane) in un solvente costituito da etanolo (95%) e glicerolo. Questa ricerca ha avuto lo scopo di confrontare il profilo di composti bioattivi di preparazioni gemmoterapiche di *Castanea* spp. con estratti eco-sostenibili ottenuti con un'estrazione a ultrasuoni pulsati a partire dagli scarti di lavorazione dei gemmoderivati stessi per valutare la possibilità di ottenere nuovi prodotti usufruibili in campo nutraceutico, terapeutico e fitofarmaceutico con riciclo sostenibile delle risorse naturali.

### Materiali e metodi

I materiali vegetali (gemme di *Castanea* spp.) sono stati raccolti nella primavera 2018 nel loro momento balsamico (stadio fenologico in cui le gemme massimamente rigonfie, ma non ancora schiuse, sono ricche di composti bioattivi (Donno *et al.*, 2012) da piante cresciute spontaneamente nelle valli di Chisone, Pellice, Germanasca, Bronda e Varaita (Provincia di Torino, Italia).

I gemmoderivati sono stati preparati seguendo il protocollo ufficiale descritto dalla Farmacopea Francese (8° edizione, 1965) (attraverso una macera-

\* dario.donno@unito.it

zione a freddo per 21 giorni in una soluzione di etanolo al 95% e glicerolo seguita da una prima filtrazione, una pressatura manuale dei residui vegetali e una seconda filtrazione, mentre gli scarti di lavorazione sono stati ulteriormente trattati con tecnologie di estrazione verde attraverso un estrattore a ultrasuoni pulsati (Hielscher Ultrasonics UP200 St, Germania). Il protocollo di estrazione (PUAE - Pulsed Ultrasound Assisted Extraction) prevedeva un'ampiezza dell'onda ultrasonica pari al 50%, un ciclo ON/OFF degli ultrasuoni dell'80%, un tempo di estrazione pari a 15 minuti e un rapporto campione/solvente di 1:10.

Sono stati utilizzati differenti metodi cromatografici per identificare e quantificare i principali composti bioattivi (acidi benzoici, acidi cinnamici, catechine, flavonoli e tannini) e per ottenere un profilo fitochimico specifico. Per le analisi cromatografiche è stato impiegato un HPLC Agilent Technologies (serie 1200) composto da pompa quaternaria, valvola d'iniezione manuale e sample loop di 20 µl, accoppiato ad un rivelatore UV-vis a serie di diodi. In tabella 1 sono descritti i metodi cromatografici utilizzati (Turrini *et al.*, 2019).

I composti polifenolici ricercati sono stati suddivisi in cinque classi: acidi benzoici (acido ellagico e acido gallico), acidi cinnamici (acido caffeico, acido clorogenico, acido cumarico e acido ferulico), catechine (catechina ed epicatechina), tannini (castalagina e vescalagina) e flavonoli (iperoside, isoquercitrina, quercitina, isoquercitina, quercitrina e rutina). I risultati sono stati espressi come mg/100 g di prodotto fresco (FW).

I risultati sono stati analizzati mediante SPSS 22.0 Software e sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) per il confronto delle medie con il test di confronto multiplo HSD Tukey (Tukey's Honest Significant Difference), al fine di identificare quali valori medi fossero significativamente differenti fra loro.

## Risultati e discussione

Il presente studio ha evidenziato come le concentrazioni delle molecole bioattive presenti nei gemmoderivati e negli estratti ottenuti dagli scarti di lavorazione di questi prodotti risultino comparabili da un punto di vista sia qualitativo sia quantitativo.

È importante sottolineare che, in media, circa il 10-15% del contenuto del gemmoderivato iniziale è stato riscontrato ancora negli estratti ottenuti dagli scarti di lavorazione e potrebbe perciò essere recuperato. In particolare, gli acidi cinnamici (20,18±0,01 mg/100 g di prodotto fresco per i gemmoderivati e 14,51 ± 0,01 mg / 100 g per gli estratti dagli scarti di lavorazione) e la vitamina C (18,08±0,01 mg / 100 g per il prodotto commerciale e 11,71±0,01 mg/100 g per gli estratti dagli scarti di lavorazione) sono risultati i composti che si sono mantenuti maggiormente, seguiti dai flavonoli (64,22±0,04 mg/100 g di prodotto fresco per i gemmoderivati e 18,10±0,02 mg/100 g per l'estratto ad ultrasuoni) come evidenziato in tabella 2 come già osservato in altri studi (Boggia *et al.*, 2017; Donno *et al.*, 2014).

In figura 1a e 1b si può notare come, tra le molecole polifenoliche a maggiore attività antiossidante, l'acido clorogenico, l'acido cumarico, la quercetina e la castalagina siano risultati i composti presenti nell'estratto da scarto ad aver mantenuto un quantitativo molto alto e comparabile con quello riscontrato nel gemmoderivato iniziale (Turrini *et al.*, 2019).

L'estratto da scarti di lavorazione provenienti dalla produzione di gemmoderivati di *Castanea sativa* possiede, perciò, un fingerprint di composti bioattivi, ed in particolare polifenoli, comparabile con quello del gemmoderivato iniziale, evidenziando così le potenzialità di estrarre con Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction (PUAE) a partire da materiale di scarto. Il protocollo stabilito è risultato semplice, sensibile e affidabile e potrebbe essere utilizzato per la valutazione

Tab. 1 - Condizioni cromatografiche dei metodi usati per la caratterizzazione dei gemmoderivati e degli estratti eco-sostenibili.

Analisi di Acidi Cinnamici e Flavonoli	Analisi di Acidi Benzoici, Catechine e Tannini
<b>Fase Stazionaria:</b> colonna Kinetex C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Phenomenex)	<b>Fase Stazionaria:</b> colonna Kinetex C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Phenomenex)
<b>Fase mobile:</b> A - 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> B - CH <sub>3</sub> CN	<b>Fase mobile:</b> A - H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> OH / HCOOH (5:95:0,1 v/v/v) B - CH <sub>3</sub> OH / HCOOH (100:0,1 v/v)
<b>Tempo di analisi:</b> 20 minuti	<b>Tempo di analisi:</b> 25 minuti
<b>Flusso:</b> 1,5 mL min <sup>-1</sup> (5% B to 21% B in 17 min + 21% B in 3 min + 2 min conditioning time)	<b>Flusso:</b> 0,6 mL min <sup>-1</sup> (3% B to 85% B in 22 min + 85% B in 1 min + 2 min conditioning time)
<b>Lunghezza d'onda (DAD):</b> 330 nm	<b>Lunghezza d'onda (DAD):</b> 280 nm

Tab. 2 - Profili cromatografici del gemmoderivato di *Castanea sativa* e dell'estratto ottenuto con ultrasuoni a partire dagli scarti di lavorazione del corrispondente prodotto fitoterapico. I risultati sono riportati come mg/100 g di prodotto fresco.

	Gemmoderivato	Estratto da scarti
Acidi Cinnamici	20,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	14,51 ± 0,01 <sup>b</sup>
Flavonodi	64,22 ± 0,04 <sup>a</sup>	18,10 ± 0,02 <sup>b</sup>
Acidi Benzoici	143,66 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,23 ± 0,01 <sup>b</sup>
Catechine	32,30 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,53 ± 0,01 <sup>b</sup>
Tannini	481,22 ± 0,07 <sup>a</sup>	30,27 ± 0,05 <sup>b</sup>
Acidi Organici	516,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	73,06 ± 0,01 <sup>b</sup>
Vitamina C	18,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	11,71 ± 0,01 <sup>b</sup>
TBCC	1276,17 ± 0,13 <sup>a</sup>	160,42 ± 0,09 <sup>b</sup>

Le differenti lettere per ogni classe indicano differenze statisticamente significative tra gemmoderivato ed estratto ad ultrasuoni ( $P < 0.05$ ). TBCC = contenuto in composti bioattivi totali.

ne e il controllo di qualità anche di differenti prodotti naturali e relativi estratti eco-sostenibili.

## Conclusioni

Questo studio si svolge nell'ambito del progetto FINNOVER n°1198 (Programma europeo transfrontaliero Alcotra Italia-Francia 2014-2020). I risultati ottenuti hanno mostrato come preparati derivanti da un'estrazione ad ultrasuoni a partire dagli scarti di lavorazione della produzione di fitoterapici da gemme di *Castanea sativa* mantengano una buona percentuale di composti bioattivi, con un profilo simile a quella del prodotto di partenza.

E' possibile stabilire così una strategia innovativa di estrazione *green* e riutilizzo degli scarti di lavorazione, applicata alla produzione di preparazioni fitoterapiche da gemme, che possa essere attuata per ottenere nuovi prodotti usufruibili in campo nutraceutico, terapeutico e fitofarmaceutico con riciclo sostenibile delle risorse naturali a partire da sottoprodotti della lavorazione di fitoterapici o integratori alimentari in alternativa all'incenerimento o al compostaggio.

E' importante perciò intensificare i rapporti e intrecciare nuove relazioni tra Università/enti di ricerca e aziende in un'ottica di miglioramento della produzione e delle preparazioni, spendibile a tutela del consumatore, con potenziali vantaggi a livello di certificazione di qualità e marketing, con conseguente sviluppo di un'economia verde e di un'imprenditoria innovativa rivolta alla produzione ed impiego di sostanze di origine naturale.

## Bibliografia

- DONNO D., BECCARO G.L., MELLANO G.M., CERUTTI A.K., CANTERINO S., BOUNOUS G., 2012. International journal of plant research (VEGETOS), 25, 21.
- ORDRE NATIONAL DES PHARMACIENS, 1965; VIII ed.; Ministère de la santé publique et de la population, Ed. Paris.
- TURRINI F., DONNO D., BOGGIA R., BECCARO G.L., ZUNIN P., LEARDI R., PITTALUGA A.M., 2019 Food Research International, 115, 276.
- Boggia R., Turrini F., Anselmo M., Zunin P., Donno D., Beccaro G.L., 2017 Journal of Food Science and Technology 54, 2422.
- DONNO D., BECCARO G.L., MELLANO M.G., BONVEGNA L., BOUNOUS G., 2014. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94, 2863.

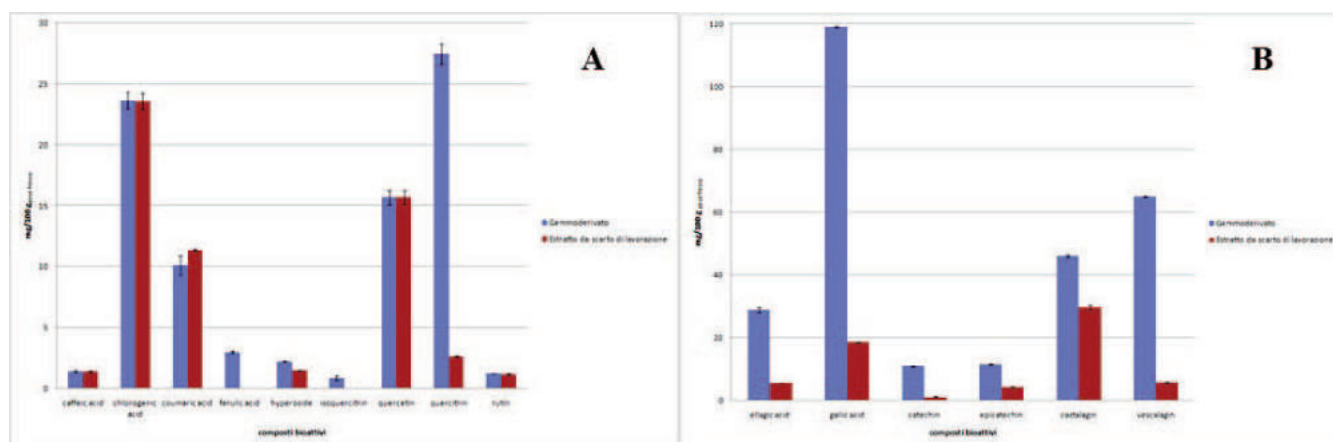


Fig. 1 - Profili polifenolici del gemmoderivato di *Castanea sativa* e dell'estratto ottenuto a partire dagli scarti di lavorazione. I risultati sono riportati come mg/100 g di prodotto fresco.