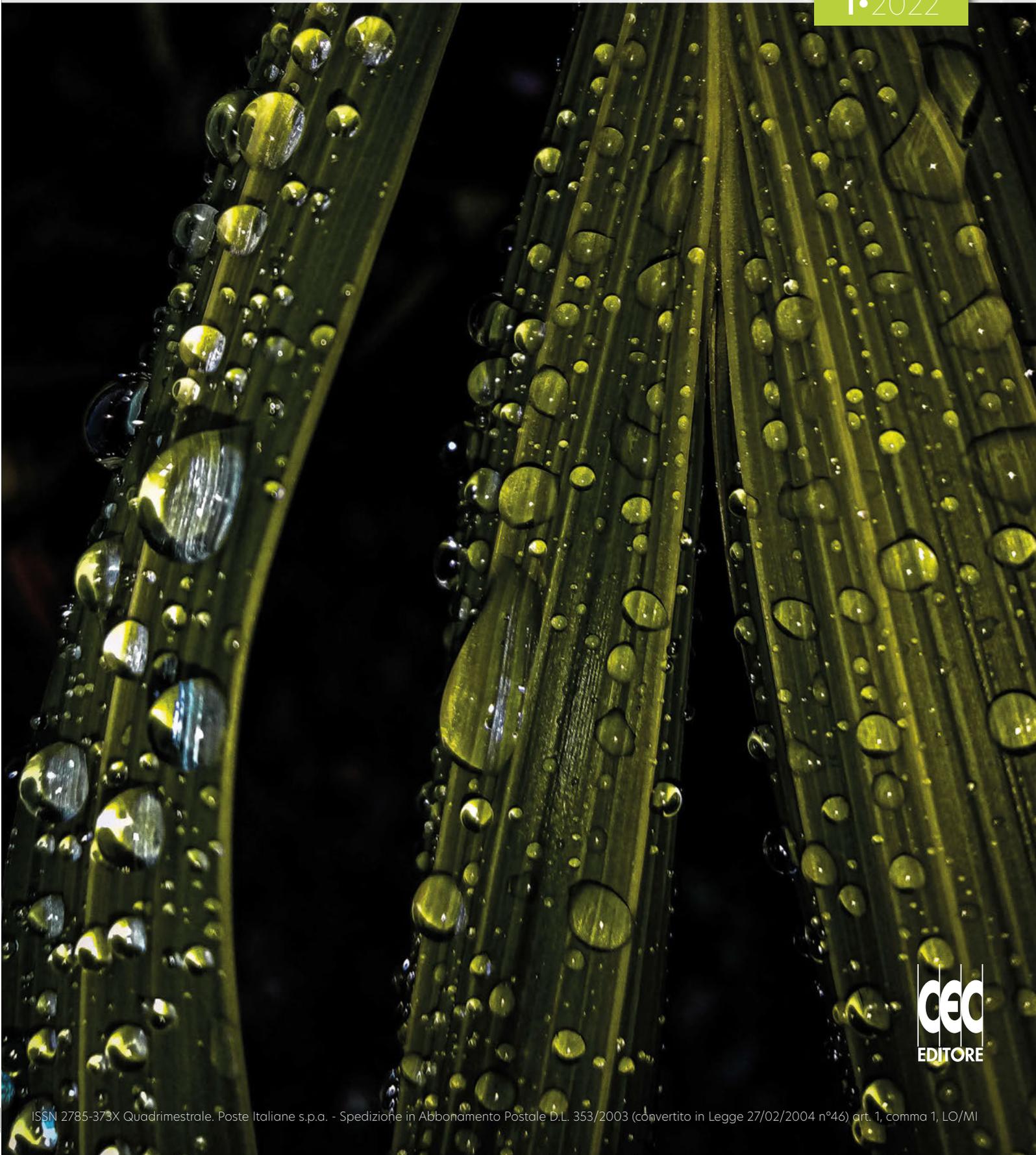


INNOVAZIONE IN

BOTANICALS

1•2022



CEO
EDITORE

BOTANICALS CREATI DALLA NATURA E DALLA TECNOLOGIA



innovative
botanical
tradition

L'efficacia e la sicurezza d'uso della tradizione botanica è valorizzata da un approccio innovativo biotech, la risposta innovativa per la difesa del tuo organismo.

ORIGINE CERTIFICATA

ELEVATA
BIODISPONIBILITÀ

ODORE E SAPORE
NEUTRI

NESSUNA
ADULTERAZIONE
E CONTAMINAZIONE

COMPLETA
TRACCIABILITÀ

PROCESSO
ECO-SOSTENIBILE

FITOCOMPLESSI
STANDARDIZZATI E SICURI



Editoriale

- 3** Ripartire dalla biodiversità • *E. Sgaravatti*

ARTICOLI

- 8** Il microbiota delle piante medicinali
Una nuova fonte di molecole antimicrobiche
G. Semenzato, S. Del Duca, R. Fani
- 18** Le molteplici funzionalità del Carrubo
Da specie antica utilizzata nella dieta alla possibile
valorizzazione nutraceutica dei sottoprodotti
M. Brugaletta
- 30** Il guscio: da biomassa a ingrediente attivo
e funzionale • Nella filiera della Nocciola un caso
studio tutto italiano per applicazioni nutraceutiche
e cosmetiche sostenibili • *E. Ghedini, F. Menegazzo,*
M. Signoretto, S. Tieuli, A. Di Michele, L. Perioli

AGGIORNAMENTI

Economia circolare

- 36** Recupero dei by-products nella filiera della
frutta secca • *C. Danna*

ABS: risorse genetiche, diritti, condivisione

- 40** Il Protocollo di Nagoya e la *due diligence*
dell'utilizzatore • Spunti operativi • *V. Veneroso*

Analisi genetiche

- 45** Il DNA metabarcoding per la filiera di tè, tisane
e infusi • Un approccio multi-marker per il controllo
e la sicurezza di prodotti vegetali miscelati • *J. Frigerio,*
V. Mezzasalma, P. Re

Biofabbriche vegetali

- 53** Utilizzo delle piante come biofabbriche
per la produzione di terapeutici • *L. Avesani*

Botanicals in action

- 58** Minatori silenziosi • *E. Roccotiello*

AZIENDE

Ingredienti

- 62** Botaniplex™ Clear • Dalla natura l'alleato
per combattere l'acne
Active Box • Green Mountain Biotech

Innovazione di prodotto

- 67** Estratto lipidico del *silverskin* • La valorizzazione
di un sottoprodotto del caffè come modello di
economia circolare in cosmetica • *Intercos*

Company news

- 70** Notizie • Il modello Benefit • Il *Future Farming District*
a Capriolo • Arnia intelligente Piana

PROSPETTIVE

Associazioni

- 72** Naturale e biologico • Ritorno al passato o cosmesi
innovativa? • Intervista a Mark Smith (NATRUE)
D. Benelli

Normativa

- 76** Notizie • Sicurezza Aloe • Legge agricoltura
biologica • Officiali alla Conferenza Stato-Regioni

Corsi e congressi

- 78** Piante medicinali e antibiotico-resistenza
Indicazioni multidisciplinari dal webinar ISB-CNR
D. Benelli
- 80** Notizie • Congresso di Etnofarmacologia
a Taiwan • Congresso GA a Salonicco

Direttore responsabile

Francesco Redaelli - fr@ceceditore.com

Direttore scientifico:

Elena Sgaravatti - elenasgaravatti@plantarebiotech.it

Direttore editoriale

Demetrio Benelli - demetrio.benelli@gmail.com

Coordinatore editoriale

Tiziana Mennini - tm@ceceditore.com

Responsabile di redazione

Serena Ponso - sp@ceceditore.com

Progetto grafico e impaginazione

Serena Dori - sd@ceceditore.com

Giulia Gilardi - gg@ceceditore.com

Marketing assistant

Chama Sirvent - cs@ceceditore.com

Stampa e fotolito: Faenza printing industries Spa**Spedizione:** Poste Italiane Spa - spedizione in abbonamento postale D.L. 353/2003 (conv. in 27/02/2004 n.46) art. 1, comma 1, LO/MI**IVA assolta dall'editore****Copyright CEC Editore** - Milano

Tutti i diritti sono riservati. La riproduzione dei contenuti, totale o parziale, è soggetta a preventiva approvazione della CEC Editore.

Legge sulla privacy - L'editore garantisce la massima riservatezza dei dati in suo possesso, forniti dagli abbonati, fatto diritto, in ogni caso, per l'interessato di richiederne gratuitamente la rettifica o la cancellazione ai sensi del D.lgs 196/03. L'Editore non assume responsabilità per le opinioni espresse dagli Autori e per eventuali errori riportati negli articoli. Il materiale pubblicitario si intende essere conforme a standard etici: la stampa di tale materiale non costituisce la garanzia della qualità del prodotto e della veridicità dei claim.**Autorizzazione - Tribunale di Milano n.33 del 28/02/2022**

ISSN 2785-373X N°ROC CEC Editore 24649 del 20/06/2014.

CEC Editore pubblica anche:

MakeUp Technology - L'Integratore Nutrizionale

Cosmetic Technology - Legislazione Cosmetica

Libri scientifici nell'area cosmetica, nutrizionale ed erboristica



Via Primaticcio, 165 - 20147 Milano

tel 02 4152 943 - fax 02 416 737

info@ceceditore.com - www.ceceditore.com

COMITATO SCIENTIFICO

BARBARA BALDAN • Professore ordinario, Botanica Generale, Dipartimento di Biologia Università di Padova**SELENE BASCHIERI** • Ricercatrice ENEA, Laboratorio Biotecnologie, Centro Ricerche di Casaccia**ANNA RITA BILIA** • Professore ordinario, Dipartimento di Chimica Ugo Schiff dell'Università degli Studi di Firenze**GIOACCHINO CALAPAI** • Professore ordinario, Farmacologia e Tossicologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Messina**ANNA CALDIROLI** • Consulente, direttore scientifico-editoriale Cosmetic Technology, CEC Editore**LAURA CORNARA** • Professore Associato di Botanica Generale, DISTAV Università degli Studi di Genova**VINCENZO DE FEO** • Professore ordinario, Biologia Farmaceutica, Università di Salerno; responsabile Gruppo Piante Officinali Società Botanica Italiana; esperto OMS Medicine Tradizionali e Piante Medicinali**FLAVIA GUZZO** • Professore associato, Botanica Generale, Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona**RENATO IGUERA** • Botanico, presidente ASSOERBE**ALBERTO MANZO** • Agronomo, funzionario tecnico Ministero Politiche Agricole Alimentari e Forestali**BARBARA RUFFONI** • Dirigente di ricerca CREA, responsabile sede di Sanremo

ELENCO INSERZIONISTI

AETHERA BIOTECH www.aetherabiotech.it	II Cop
COSMOPROF www.cosmoprof.it	29
KOLINPHARMA www.kolinpharma.com	7
SANA www.sana.it	35
TRUFFINI & REGGÈ FARMACEUTICI www.truffini.it	IV Cop

Ripartire dalla biodiversità



ELENA SGARAVATTI

elenasgaravatti@plantareibiotech.it

Biodiversità: abbreviazione in lingua italiana di *Biological Diversity*. Un termine apparentemente semplice da decodificare, quanto invece complesso e intriso di potenziali vaste conseguenze nella sua declinazione nella realtà biologica. È un termine sul quale è bene soffermarsi a riflettere per più motivi. Innanzitutto, per ricordare Edward O. Wilson, pluripremiato entomologo e naturalista americano che lo conì nel 1986 asserendo che la biodiversità coincide con la "materia stessa della vita". Autore, tra gli altri, del libro *Metà della Terra - Salvare il futuro della vita*, nel quale auspicava che metà della superficie terrestre fosse destinata a una riserva naturale per preservare la biodiversità. È scomparso lo scorso dicembre, a due mesi dall'appello (non certo il primo) lanciato alla vigilia del summit del Cop26, che ha indicato come "il maggiore tentativo globale di unire gli sforzi per un obiettivo chiaramente definibile per l'umanità". E poi ha affermato: "Abbiamo bisogno di cooperazione, armonia, etica e pianificazione per portarlo a buon fine". Parole molto sagge che non possono più rimanere inascoltate, e qui veniamo al secondo motivo.

La perdita di biodiversità, legata allo sfruttamento insostenibile dell'ambiente dovuta al cambiamento dell'uso del suolo e alle sconfinata deforestazioni per dar spazio a nuove colture intensive, è anche direttamente correlata all'aumento del rischio di malattie derivante da un maggiore contatto uomo-bestia-fauna selvatica, quest'ultima considerata un enorme serbatoio di virus: se ne stimano fino a 800 mila in grado di infettare potenzialmente l'uomo. E d'altro canto sono zoonosi il 70% delle malattie emergenti, come ad esempio Ebola, Zika, encefalite di Nipah e quasi tutte le pandemie conosciute, come influenza aviaria, HIV/AIDS e anche COVID-19¹. Il pericolo di una nuova pandemia è quindi determinato dall'aumento esponenziale dei cambiamenti prodotti dall'uomo e dagli impatti di queste attività sull'ambiente. Un motivo per parlare di biodiversità, quindi, che purtroppo conosciamo tutti molto bene. E suggerisco di risentire/rivedere la recente, illuminante e chiara presentazione di Paola di Bernardi, dell'Università degli Studi di Torino, al recente Forum sull'Economia Circolare organizzato a Milano da Tondo, per avere un quadro molto chiaro dei rischi che stiamo correndo.

Urge cambiare l'attuale modello di sviluppo, e qui l'innovazione e le biotecnologie saranno cruciali nel giocare un ruolo determinante; diversamente, il rischio di vedere gli effetti devastanti della nostra mancanza di lungimiranza sulla nostra salute è reale. E infatti, non a caso, l'approccio da adottare è quello *One Health*, nel quale la salute dell'uomo è strettamente correlata alla salute dell'ambiente e del mondo animale. Ma torneremo prossimamente su questo tema, magari.

Il terzo motivo è decisamente più incoraggiante e confortante: all'interno del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR), uno dei cinque Centri Nazionali è dedicato alla biodiversità. Come si legge dal sito del MUR, il Centro "svolge ricerca e promuove lo sviluppo di soluzioni per monitorare, preservare e ripristinare la biodiversità funzionale, al fine di contrastare l'impatto antropico, gli effetti dei cambiamenti climatici e di supportare i servizi ecosistemici. Al tempo stesso, il Centro supporta le attività di ricerca e innovazione per la valorizzazione della biodiversità attraverso processi di economia circolare e di *restoration economy*, capaci di tute-

lare le risorse ambientali e assicurare il benessere della persona.

L'elemento chiave del Centro di Biodiversità sono le *key enabling technologies*, come le biotecnologie, l'intelligenza artificiale e le tecnologie per le scienze della vita, che consentono di comprendere la complessità biologica e di individuare soluzioni ad alto valore tecnologico, per una gestione sostenibile della biodiversità, garantendo la resilienza degli ecosistemi e promuovendo uno stile di vita più sostenibile".

Obiettivi che davvero da tempo vogliamo condividere anche come imprese, sebbene le premesse (e in generale di tutto il PNRR) sembrano tenere queste ultime piuttosto imbrigliate, visto che le modalità di accesso si ripropongono complesse, inibenti e destinate sostanzialmente solo a grandi aziende, escludendo di fatto PMI e start up (che oltre ad essere le più numerose, sono anche quelle più inclusive di giovani e di donne). Tuttavia, non possiamo che rallegrarci della costituzione del Centro Nazionale della Biodiversità, consapevoli che in Italia, così come vantiamo il primato mondiale dei patrimoni UNESCO dell'umanità, possiamo vantare la presenza del 50% di tutta la biodiversità presente in Europa.

Una condizione privilegiata e un'opportunità tanto unica quanto preziosa, da tradurre efficacemente in un rilancio del Paese, non solo economico, ma anche un'occasione portatrice di una nuova cultura, che contiamo acceleri di fatto un radicale cambiamento dei nostri modelli di sviluppo.

¹IPBES Report luglio 2020: Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services

INNOVAZIONE IN BOTANICALS

GUIDA ALLA LETTURA

Parlamo molto di frutta secca su questo numero. Più che dei semi, del loro apporto nutrizionale e dei loro oli cosmetici, ci occupiamo delle strutture legnose: *by-products* oggetto di molti studi di grande utilità. È il caso del Nocciolo, la cui coltura è diffusa qui in Italia, dove sta crescendo una filiera competitiva per qualità e varietà con i Paesi del Medio Oriente (è la Turchia a dominare il mercato mondiale). Il guscio è abbondantemente disponibile dalla lavorazione dell'industria alimentare, e interessante è sapere che proprio dal guscio si può ottenere un derivato con caratteristiche efficienti come carrier di principi attivi in formulazioni cosmetiche. È l'oggetto dello studio dell'Università di Venezia che pubblichiamo, e che nasce proprio con l'intento di sviluppare applicazioni innovative di questi derivati in diretto collegamento con la filiera produttiva locale, con i produttori agricoli e industriali. Un modello che potrebbe un domani estendersi anche ad altre specie: sono diverse, infatti, le tipicità di frutti secchi che oltre al Nocciolo caratterizzano il territorio italiano, come ci ricorda il nostro spazio dedicato all'economia circolare. E tra queste fa la sua comparsa un gigante del paesaggio mediterraneo, il Carrubo, a cui dedichiamo un'ampia monografia. Protagonista nei secoli scorsi dell'economia agraria del nostro Sud, è diventato poi una coltura povera, ma torna ora in luce per la rinnovata richiesta del mercato del suo principale derivato come ingrediente di preparazioni alimentari (anche in questo caso non tanto per proprietà nutrizionali ma per la funzione strutturale). Una premessa alla ricerca di una valorizzazione di questa pianta in campo nutrizionale e cosmetico, sulla quale sono già avviati vari studi. Si affaccia su questo numero un settore, quello delle biofabbriche vegetali, che per lo sviluppo che ha avuto negli ultimi anni siamo certi occuperà molto spazio nel prossimo futuro, in relazione anche alla attività scientifica dedicata al contrasto della pandemia di COVID -19. Su queste esperienze apriamo un nuovo spazio di approfondimento, con un primo inquadramento generale dello stato dell'arte.

In tema regolatorio, è bene tornare sul Protocollo di Nagoya che, anche se non sembra, in effetti è già vigente anche in Italia, ed è bene che le industrie interessate ne siano consapevoli. Mentre il contributo delle analisi molecolari compie un importante passo in avanti affrontando una sfida decisiva: quella che riguarda il loro impiego per matrici complesse, composte da diversi prodotti, come nel caso delle miscele in commercio.

A proposito di complessità, un'attenzione particolare desta in questo numero l'articolo che viene dall'Università di Firenze e che introduce una particolare linea di studio e di ricerca: quella dell'interazione del microbiota con la pianta nella produzione dei principi attivi.

Se ne è cominciato a parlare a partire dall'analisi del problema dell'antibiotico-resistenza, per l'azione antagonista osservata tra diversi ceppi batterici presenti sull'organismo vegetale. Ma ne è subito derivata la domanda su quanto il sistema ecologico che unisce la pianta al suo ambiente e agli altri organismi che con essa convivono possa contribuire alla produzione dei principi attivi funzionali per cui la conosciamo. Un'idea che trova eco anche nella comprensione dei fenomeni biologici che caratterizzano le specie di "minatori vegetali", i nostri *botanicals in action* di questo numero.

Demetrio Benelli
demetrio.benelli@gmail.com





Linda Avesani

linda.avesani@univr.it

Linda Avesani è Professoressa associata presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona in Genetica Agraria. La sua attività di ricerca riguarda l'utilizzo delle piante per la produzione di molecole ad alto valore aggiunto, mediante approcci biotecnologici. È autrice di 40 articoli su riviste internazionali, 3 brevetti ed è leader di unità del progetto europeo *Pharma-Factory* focalizzato sugli sviluppi industriali del *plant molecular farming*, ovvero l'utilizzo delle piante come biofabbriche per la produzione di biofarmaceutici.



Sara Del Duca

sara.delduca@unifi.it

Sara Del Duca, laureata in Biologia, ha appena completato il terzo anno di Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Firenze, ed è risultata vincitrice della borsa di studio bandita dalla Fondazione Adriano Buzzati-Traverso. Ha esperienza nello studio dei meccanismi molecolari di evoluzione delle vie metaboliche e nella caratterizzazione delle comunità microbiche ambientali, da un punto di vista sperimentale e bioinformatico. Ha presentato poster e comunicazioni orali a congressi nazionali e internazionali ed è coautrice di pubblicazioni scientifiche su giornali internazionali con IF e di un brevetto.



Massimiliano Brugaletta

massibruga@gmail.com

Massimiliano Brugaletta è un agronomo libero professionista, ha ottenuto il titolo di dottore di ricerca in scienze e tecnologie tropicali e subtropicali presso l'Università degli Studi di Catania. Presidente dell'Associazione CAREX, impegnata nella tutela e valorizzazione del Carrubo, nonché vicepresidente del Distretto della Frutta Secca di Sicilia riconosciuto dalla Regione Siciliana, si occupa altresì di progettazione per lo sviluppo rurale a servizio di enti pubblici e privati con particolare predilezione per le azioni di sostegno alla conservazione delle risorse genetiche in agricoltura ed alla preservazione della biodiversità, di specie fruttifere. Coautore di vari articoli scientifici inerenti al Carrubo, presta, con particolare passione, la sua esperienza e la sua preparazione per numerose attività che riguardano questa specie.



Renato Fani

renato.fani@unifi.it

Renato Fani è Professore ordinario di Genetica presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Firenze e dirige il Laboratorio di Evoluzione Microbica e Molecolare. L'attività scientifica è attestata da oltre 250 pubblicazioni (H-index >40) e da più di 500 comunicazioni a congressi nazionali e internazionali. Ha organizzato numerosi congressi e simposi sia in Italia che all'estero, ed è stato invitato in programmi televisivi e radiofonici. È curatore della Collana Scientifica Pianeta Redi edita dalla Firenze University Press, e coautore dei libri *Dalla genetica classica alla genomica* (Carocci Editore) e *Genetica* (Edises). La sua ricerca si focalizza sullo studio dei meccanismi molecolari responsabili dell'evoluzione delle vie metaboliche, così come sull'analisi della variabilità genetica e dei meccanismi che ne sono responsabili in comunità microbiche isolate da ambienti naturali (estremi e non). Una particolare attenzione è rivolta ai microrganismi produttori di sostanze bioattive (antibiotici, antivirali, antitumorali), isolati da ambienti estremi e da piante medicinali.



Cristina Danna

cristina.danna@edu.unige.it

Cristina Danna, biologa, è dottoranda per il corso in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio (STAT), curriculum Biologia applicata all'Agricoltura e all'Ambiente, presso l'Università di Genova. Precedentemente laureata con laurea magistrale in Monitoraggio Biologico (UniGe), e inoltre diplomata con percorso formativo livello magistrale indirizzo Scienze e Tecnologie della Sostenibilità (IANUA-ISSUGE), è membro della Società italiana di Fitoterapia (S.I.Fit.) e della Società Botanica Italiana (S.B.I.). Campi di Interesse: Etnobotanica, Sviluppo sostenibile, Economia circolare, Permacultura.



Elena Ghedini

gelena@unive.it

Elena Ghedini è ricercatrice presso il Dipartimento di Scienze Molecolari di Nanosistemi dell'Università Ca' Foscari di Venezia, e la sua attività è, principalmente, focalizzata sullo sviluppo di materiali e processi indirizzati alla valorizzazione di biomasse e scarti industriali. Da diversi anni si occupa, anche, dello sviluppo di *Drug Delivery Systems* per applicazioni farmaceutiche, cosmetiche ed in ambito nutraceutico. Dal 2018 è socio fondatore e direttore scientifico della Start Up Ve Nice la cui *mission* è innovare il settore cosmetico proponendo soluzioni Hi Tech all'insegna della sostenibilità.



Valerio Mezzasalma

valerio.mezzasalma@fem2ambiente.com

Valerio Mezzasalma in FEM2-Ambiente ricopre il ruolo di responsabile scientifico con l'obiettivo di coordinare le attività scientifiche alla base dei servizi offerti, dei progetti ideati e partecipati, e del comparto R&D sempre pronto ad accogliere nuove sfide, ma anche a lanciarne di nuove. Questo ruolo trasversale permette una buona visione di insieme di tutte le attività condotte, dei servizi offerti e dello sviluppo di nuove proposte commerciali. Inoltre, è grazie alla costante comunicazione con i clienti, con i partner di progetto e con le università e i centri di ricerca che ha la possibilità di avvicinarsi alle richieste ed esigenze di mercato, e di essere sempre aggiornato sulle ultime novità in materia di innovazione e opportunità.



Enrica Roccotiello

enrica.roccotiello@unige.it

Enrica Roccotiello è ricercatrice in Botanica Ambientale e Applicata presso il Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita (DISTAV) dell'Università degli Studi di Genova. È docente nel corso di laurea magistrale in Conservazione e Gestione della Natura e nel corso di laurea in Architettura del Paesaggio Sostenibile. I principali ambiti di ricerca riguardano i meccanismi di tolleranza e accumulo di metalli in piante (da *phytoremediation* o eduli), la bonifica di inquinanti mediante tecniche ecosostenibili di *bioremediation* integrata, la biodiversità di habitat estremi, la risposta delle piante agli stress abiotici nell'ecosistema urbano e l'impiego della componente vegetale nelle *Nature-Based Solutions*. È autrice di numerose pubblicazioni nazionali e internazionali.



Giulia Semenzato

giulia.semenzato@stud.unifi.it

Giulia Semenzato, laureata in Biologia Molecolare e Applicata, è iscritta al primo anno di Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Firenze. Ha esperienza nella caratterizzazione molecolare e fenotipica di batteri endofitici associati a piante medicinali e aromatiche, oggetto del suo progetto di dottorato, nonché di immunoistochimica e proteomica, esperienze acquisite durante i periodi di tirocinio curriculare e tesi.



Valentina Veneroso

avv.veneroso@gmail.com

Valentina Veneroso, avvocato, specializzata in diritto dell'ambiente, con un'esperienza consolidata nella materia dell'*Access and Benefit Sharing*. È stata docente presso la Facoltà di Biotecnologie dell'Università di Siena, dove ha insegnato Diritto in Biotecnologie. Ha collaborato con il Ministero dell'Ambiente fornendo assistenza alla Direzione competente nelle attività finalizzate alla ratifica e all'implementazione del Protocollo di Nagoya a livello nazionale e a livello europeo nella scrittura del Regolamento ABS e atti derivati, partecipando nella qualità di esperto ai relativi lavori in Commissione UE. Durante il semestre di Presidenza Italiana del Consiglio UE (2014) ha fatto parte del team della Presidenza per il coordinamento europeo partecipando al primo Meeting delle Parti del Protocollo di Nagoya. È autrice di articoli e pubblicazioni, nonché relatrice in corsi e convegni sull'argomento presso enti di ricerca e università italiani.

*“Attenzione,
selezione accurata
e controllo,
sono gli ingredienti
della qualità
e del benessere.”*

Rita Paola Petrelli
Presidente



EUROPA



USA



ITALIA

45
BREVETTI
TOTALI



ISRAELE



KOLINPHARMA®

LEADER TO HEALTH

kolinpharma.com



ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification



ISO 22000
BUREAU VERITAS
Certification



Autori

GIULIA SEMENZATO
SARA DEL DUCA
RENATO FANI

Dipartimento di Biologia,
Università degli Studi di
Firenze, Sesto Fiorentino (FI)

renato.fani@unifi.it

Parole chiave

Fitobioma
Biodiversità microbica
Antibiotico-resistenza
Oli essenziali

Il microbiota delle piante medicinali

Una nuova fonte di molecole antimicrobiche

Riassunto

La continua somministrazione di antibiotici che si verifica nel caso di gravi infezioni di origine microbica sta contribuendo ad aggravare il sempre più crescente problema della resistenza di questi organismi patogeni ai comuni farmaci antimicrobici. È quindi fondamentale dare priorità alla ricerca di nuovi antibiotici, di cui il mondo vegetale è un'ottima fonte. Le piante medicinali sono da tempo conosciute e utilizzate per la loro capacità di sintetizzare composti di interesse farmacologico. Negli ultimi anni è emerso come questi macroorganismi rappresentino in realtà un sistema molto più complesso: all'interno dei loro tessuti, una vasta gamma di microrganismi contribuisce alla loro crescita e al loro metabolismo. In particolare, è stato possibile dimostrare il coinvolgimento di questi ultimi nella stimolazione della pianta verso la produzione di metaboliti secondari, nella modifica strutturale delle molecole di origine vegetale, ma anche nella sintesi diretta di composti naturali con applicazioni terapeutiche e farmacologiche. L'obiettivo generale del presente articolo è quello di promuovere lo sfruttamento del potenziale biotecnologico del microbiota endofitico delle piante medicinali e far luce sui meccanismi alla base dell'interazione pianta-microbiota, con lo scopo di identificare nuove molecole bioattive di origine batterica, efficaci contro gli agenti patogeni caratterizzati da una multiresistenza agli antibiotici.

INTRODUZIONE

Il problema della resistenza agli antibiotici

Uno degli eventi chiave nella storia della medicina fu sicuramente la scoperta della penicillina da parte di Sir Alexander Fleming, insignito per questo del premio Nobel nel 1945. Fleming notò che in una piastra di coltura contaminata da una muffa, la crescita delle colonie batteriche in prossimità di essa risultava inibita; questo lo portò a ipotizzare che la muffa (*Penicillium notatum*) producesse una molecola ad azione antimicrobica (1).

Da quel momento, la ricerca di molecole ad azione antibatterica si è focalizzata essenzialmente su prodotti di origine naturale. Tra le nove principali classi di antibiotici, sei sono rappresentate da molecole isolate in natura (β -lattamici, tetracine, macrolidi, aminoglicosidi, glicopeptidi e lincosamidi), mentre i sulfamidici, i fluorochinoloni e gli oxazolidinoni sono il risultato di sintesi chimica (2). Le prin-

cipali modalità con cui questi composti agiscono sono l'inibizione della sintesi della parete cellulare, della sintesi proteica o della duplicazione del DNA; a questi si aggiungono anche il danno alla membrana cellulare e l'interferenza con alcune vie metaboliche, come quella che porta alla sintesi dell'acido folico (2,3).

Nonostante la grande disponibilità di farmaci ad azione antibiotica, le malattie infettive causate da agenti patogeni batterici sono tutt'oggi una delle principali cause di morte nel mondo. Nel corso degli ultimi decenni, la cura delle infezioni microbiche ha visto nascere alcune pericolose tendenze: un'eccessiva prescrizione e somministrazione di antibiotici, anche in caso di infezioni di natura virale, l'uso di dosaggi inappropriati e l'introduzione di antibiotici nella filiera alimentare allo scopo di prevenire patologie a carico di animali da allevamento e piante, con la conseguente diffusione di questi farmaci nell'ambiente. Il fenomeno della resistenza agli antibiotici ne è stata la conseguenza. Molti batteri patogeni hanno infatti sviluppato una o più resistenze verso le sopracitate classi di antibiotici, impedendo di fatto la risoluzione delle infezioni in corso e aggravando le condizioni di salute del paziente (4). La capacità di resistere a un determinato antibatterico può essere acquisita dai microrganismi attraverso due meccanismi genetici: la comparsa di mutazioni spontanee

durante la replicazione del DNA batterico, in grado di modificare la struttura dei bersagli contro cui il farmaco è diretto, e il passaggio di elementi genetici mobili (plasmidi o virus batterici) mediante il trasferimento genico orizzontale; evento che consiste nell'acquisizione di geni preesistenti in grado di conferire una determinata resistenza ai farmaci. Esistono poi dei meccanismi di resistenza intrinseci, come la presenza di una membrana esterna nei batteri Gram-negativi, che conferisce loro una ridotta permeabilità agli antibiotici, la sintesi di enzimi in grado di degradare il farmaco o la maggiore efficienza dei sistemi di trasporto verso l'ambiente extracellulare (pompe di efflusso) (5) (Fig.1).

La resistenza agli antibiotici è ormai diffusa in tutto il mondo.

Alcune delle infezioni precedentemente trattabili rappresentano oggi

un grave problema a causa della mancanza di antibiotici efficaci. La necessità di identificare nuove molecole ad azione antibatterica è un problema ampiamente riconosciuto nel contesto scientifico (2) e sempre più risorse sono indirizzate verso la ricerca di nuovi principi attivi nel mondo vegetale.

Gli oli essenziali delle piante medicinali aromatiche

La medicina tradizionale è definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come "la somma delle conoscenze, abilità e pratiche, basate su teorie, credenze ed esperienze di diverse culture, utilizzate per il mantenimento dello stato di salute e per la prevenzione, diagnosi, miglioramento o trattamento di malattie fisiche e mentali". Ad oggi, in alcune parti del mondo, soprattutto in Cina, India e Africa, la maggior parte della

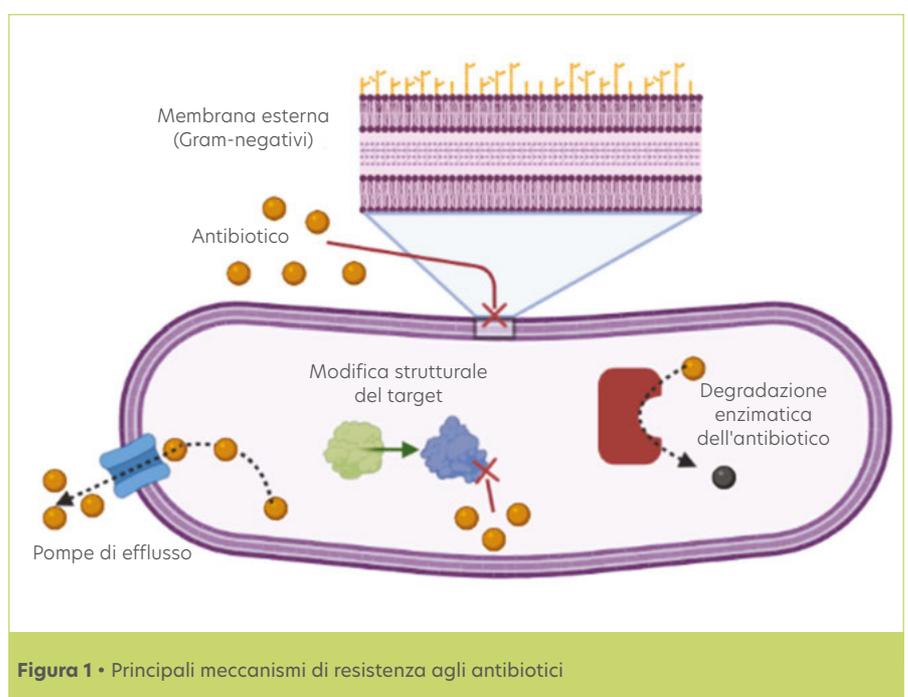


Figura 1 • Principali meccanismi di resistenza agli antibiotici

popolazione continua a fare affidamento sulle pratiche tradizionali per mantenere un adeguato stato di salute primaria. Se adottata al di fuori della sua cultura originaria, la medicina tradizionale viene spesso definita "medicina complementare o alternativa" (6).

Sono abbondanti le testimonianze storiche sull'utilizzo delle piante a scopo medicinale. Vengono definite "piante medicinali" tutti gli organismi vegetali che, in uno o più dei loro organi, producono sostanze terapeutiche o preventive o che possono essere sfruttate come precursori di emisintesi chemio-farmaceutiche. Circa un quarto dei farmaci approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) e/o dall'*European Medical Agency* (EMA) ha infatti un'origine naturale o è derivato di molecole ottenute da piante o microrganismi (7). Da un punto di vista chimico, stupisce la diversità delle molecole che possiamo ritrovare in natura. Nel corso dell'evoluzione, le piante sono riuscite ad assemblare una vasta gamma di composti dalla struttura chimica complessa che, molto probabilmente, hanno conferito loro un vantaggio competitivo all'interno dell'ecosistema di cui facevano parte (8). Non avendo la possibilità di fuggire dagli stress a cui sono costantemente sottoposte, le piante hanno acquisito la capacità di produrre metaboliti secondari (composti non essenziali per la crescita, lo sviluppo o la riproduzione dell'organismo) per

proteggersi dall'attacco di animali, fitopatogeni e stress ambientali (7). Questa stessa tipologia di molecole conferisce alle piante medicinali aromatiche il loro peculiare odore e gusto.

L'attività terapeutica delle piante medicinali molto spesso dipende dall'azione simultanea e sinergistica dell'insieme dei composti chimici da esse prodotte: il fitocomplesso. Gli oli essenziali prodotti dalle piante aromatiche, ad esempio, contengono complesse miscele di composti organici volatili, per lo più terpeni e fenoli, che possono essere ottenuti mediante distillazione o spremitura. I componenti degli oli essenziali possono essere sintetizzati da tutti gli organi della pianta e vengono immagazzinati in cellule secretorie, cavità, canali, cellule epidermiche o tricomi ghiandolari (9). Il profilo chimico degli oli essenziali dipende da numerosi fattori abiotici quali il clima, la composizione del suolo, lo stato vegetativo e dal tipo di estrazione.

A causa di questa estrema variabilità, gli effetti biologici a essi associati possono cambiare notevolmente. Tra questi ricordiamo l'ottima attività antiossidante, antisettica, antifungina, analgesica, antinfiammatoria, spasmolitica e citotossica nei confronti di alcune linee cellulari tumorali umane (9). Nonostante molti risultati scientifici ottenuti da studi *in vitro* e *in vivo* dimostrino l'efficacia di alcune singole molecole isolate

da oli essenziali (come timolo, carvacrolo, eugenolo, beta-cariofillene e mentolo), molto spesso l'attività biologica dei singoli composti risulta inferiore rispetto a quella riscontrata nel fitocomplesso; inoltre, sono ancora pochi gli studi che ne hanno dimostrato l'applicabilità clinica (10). Per la loro natura lipofila, i componenti degli oli essenziali sono in grado di destabilizzare l'integrità e la struttura della membrana delle cellule batteriche. Questo evento interferisce con numerose funzioni cellulari, incluse la produzione di energia, alcune reazioni metaboliche, il mantenimento del potenziale di membrana e i sistemi di trasporto (11). In un recente studio, è stata dimostrata l'azione antibatterica di oli essenziali estratti da sei diverse piante aromatiche (*Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula hybrida*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*) nei confronti di ceppi Gram-negativi appartenenti al cosiddetto *Burkholderia cepacia complex* (Bcc), un gruppo di patogeni opportunistici particolarmente pericolosi nei confronti di pazienti affetti da fibrosi cistica, nei quali possono indurre gravi infezioni, spesso letali (12). Grazie alla presenza di una membrana esterna e l'espressione di pompe di efflusso in grado di impedire l'accumulo di farmaci e composti tossici all'interno della cellula, questi batteri sono dotati di una resistenza intrinseca nei confronti una vasta

gamma di antibiotici, rendendo inefficaci i più comuni trattamenti. Oltre all'inibizione della crescita esercitata dagli oli essenziali, è stato interessante verificare come, durante gli esperimenti, non sia mai stato isolato alcun mutante in grado di resistere ai fitocomplessi testati. Questo rappresenta un dato molto importante da un punto di vista delle loro potenziali applicazioni terapeutiche e suggerisce che l'attività antimicrobica degli oli essenziali sia dovuta alla presenza di diverse molecole che funzionano in modo sinergico e che molto probabilmente agiscono su più bersagli all'interno della cellula (12). La probabilità che in seguito alla somministrazione di un fitocomplesso, come nel caso degli oli essenziali, si origini un mutante in grado di resistere e fronteggiare l'azione simultanea di più componenti che agiscono su più target si rivela dunque estremamente bassa.

Dati questi presupposti e considerata la loro generale bassa tossicità (diversi oli essenziali sono inseriti nella lista dei composti *Generally Recognised As Safe*, GRAS, dalla FDA), questi prodotti naturali si propongono come ottimi candidati per contrastare il sempre più diffuso problema della resistenza agli antibiotici.

Il contributo del fitobioma

Per poter sfruttare al meglio il potenziale farmacologico degli oli essenziali è però necessario considerare le

piante aromatiche medicinali come dei sistemi complessi e dinamici (10). Come tutti i macrorganismi, anche le piante medicinali possiedono un microbiota, il cosiddetto fitobioma.

Si tratta dell'insieme dei microrganismi in grado di colonizzare i tessuti interni della pianta (definiti quindi endofiti) senza causare alcun tipo di danno o manifestazione patologica nei confronti del loro ospite (13). La maggior parte degli endofiti proviene dalla rizosfera, ossia la porzione di suolo che circonda le radici della pianta, le quali possono secernere essudati in grado di attrarre i batteri presenti nel terreno. Il successivo raggiungimento dei vari distretti della pianta avviene principalmente attraverso il sistema vascolare xilematico, che consente il trasporto di acqua e sali in essa disciolti dalle radici fino alle foglie (14). Alcuni rappresentanti della comunità endofitica, i cosiddetti commensali, non influenzano in alcun modo la crescita della pianta, ma utilizzano semplicemente i metaboliti del loro ospite per la propria sopravvivenza. Esistono poi microrganismi patogeni e microrganismi benefici. Questi ultimi ricevono nutrimento e protezione dal loro ospite e, allo stesso tempo, promuovono la crescita della pianta (*Plant Growth Promoter Bacteria*, PGPB) mediante la produzione di fitormoni o incrementando l'assunzione di nutrienti, come nel caso della fissazione dell'azoto; inoltre, sono in grado di proteggere la pianta da

predatori e fitopatogeni, attraverso l'induzione di una risposta immunitaria sistemica in grado di aumentare la tolleranza della pianta verso i suoi aggressori (15). Infine, è stata dimostrata la capacità di questi microrganismi di produrre essi stessi composti ad azione antimicrobica e metaboliti secondari coinvolti nei processi di difesa e di interazione con l'ospite, così come la loro influenza nel metabolismo secondario della pianta (14).

Le attività tipiche dei PGPB possono essere sfruttate nel contesto agricolo, con lo scopo di ridurre l'uso di fertilizzanti chimici e passare a un approccio economico, sostenibile e rinnovabile (16). Le proprietà antimicrobiche degli endofiti e la loro capacità di indurre la produzione di metaboliti secondari da parte della pianta potrebbero essere invece sfruttate in ambito farmacologico e terapeutico, allo scopo di ottenere nuovi principi attivi di origine naturale.

Dato il dimostrato coinvolgimento della comunità endofitica nel metabolismo della pianta e la diretta produzione di composti bioattivi da parte degli stessi microrganismi, ci si può chiedere se le proprietà terapeutiche degli oli essenziali dipendano anche dalla presenza di molecole di origine batterica (17). Una maggiore comprensione delle interazioni che sussistono tra le piante medicinali e gli endofiti può rappresentare una vera e propria rivoluzione nel campo

della biologia vegetale, aprendo la strada verso nuove prospettive, come l'opportunità di modulare e amplificare la produzione di fitocomposti, ma anche la possibilità di ottenere molecole dotate di attività biologica direttamente dagli endofiti isolati dalla pianta. Relativamente facili da manipolare, i batteri endofitici potrebbero dunque rappresentare una fonte sostenibile di nuove molecole naturali.

METODI

Come studiare la comunità endofitica delle piante medicinali

Lo studio della composizione delle comunità batteriche endofitiche può trarre vantaggio dalle moderne tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) del DNA. L'approccio più diffuso si basa sull'estrazione del DNA totale dalle diverse matrici vegetali e sul sequenziamento massivo di alcune regioni del gene batterico codificante l'rRNA 16S. Questo metodo permette di ottenere il quadro generale della composizione della comunità batterica indipendentemente dall'effettiva coltivabilità dei ceppi. In altre parole, è possibile dare un "cognome" (genere) e un "nome" (specie) ai singoli batteri della comunità endofitica, e anche quantificarne la presenza. Se però l'obiettivo è quello di approfondire lo studio sulle proprietà

intrinseche degli endofiti, risultano allora di fondamentale importanza le tecniche coltura-dipendenti: la messa in coltura dei batteri endofitici garantisce la possibilità di approfondire le indagini tassonomiche fino a livello di ceppo e permette di identificare eventuali tratti genetici di interesse, quali, ad esempio, la produzione di metaboliti specifici, il loro profilo di resistenza agli antibiotici e le relazioni di antagonismo nei confronti di altri microrganismi; inoltre, offre numerose prospettive indirizzate verso lo studio delle interazioni metaboliche tra il microbiota e la pianta, e delle forze selettive alla base della strutturazione e distribuzione della comunità microbica all'interno dei tessuti dell'ospite.

Isolamento e caratterizzazione molecolare dei ceppi coltivabili

Con lo scopo di ottenere informazioni sulla distribuzione degli endofiti all'interno del loro ospite e studiare le interazioni tra microrganismi e i singoli microambienti vegetali, le parti anatomiche delle piante medicinali (fiori, foglie, stelo, radici e rizosfera) vengono separate e considerate come campioni indipendenti. Il tessuto vegetale fresco viene quindi sterilizzato esternamente con lo scopo di rimuovere i batteri epifitici, quella componente del microbiota vegetale che risiede sulla superficie esterna della pianta.

I campioni sono poi omogeneamente pestati in un mortaio sterile o, nel caso del suolo, trattati in modo da permettere il distacco dei batteri. Gli estratti ottenuti sono quindi seminati su piastre contenenti terreno di crescita massimo, allo scopo di determinare il numero di cellule batteriche/millilitro ottenute dai vari tessuti e di isolare i ceppi coltivabili (18).

Per studiare la struttura del microbiota coltivabile e definire gli aplotipi (cioè i singoli genotipi) presenti, è possibile ottenere un fingerprint (letteralmente "impronta digitale") molecolare dei batteri isolati mediante un'analisi *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), tecnica che consiste nell'amplificazione casuale di segmenti del DNA genomico in presenza di un singolo primer breve (8-10 nucleotidi). Poiché la reazione avviene in condizioni di bassa stringenza, le molecole del primer potranno appaiarsi anche a moltissime sequenze non perfettamente complementari. L'amplificazione produrrà, perciò, non un singolo amplicone, ma una serie di frammenti, dando origine a un profilo elettroforetico paragonabile a un qualsiasi codice a barre. Isolati batterici che esibiscono lo stesso profilo (aplotipo) RAPD corrisponderanno allo stesso ceppo (Fig.2). Per ogni aplotipo RAPD riconosciuto sarà scelto un unico rappresentante di cui amplificare e sequenziare l'intero gene codificante l'rRNA 16S; ciascuna sequenza sarà poi utilizzata per l'affiliazione tassonomica,

confrontandola con le sequenze presenti nei database (19).

Test di resistenza agli antibiotici e test di antagonismo

La resistenza agli antibiotici dei vari ceppi isolati è valutata strisciando gli endofiti su un terreno massimo contenente diverse concentrazioni di antibiotico. Generalmente il test viene effettuato utilizzando antibiotici appartenenti a classi diverse e con bersagli cellulari diversi. La resistenza dei ceppi è valutata sulla base dei livelli di inibizione della crescita batterica (20).

La capacità degli endofiti (ceppi tester) di produrre molecole in grado di antagonizzare la crescita di altri microrganismi (ceppi target) è saggiata mediante test di inibizione della crescita su piastra (test di antagonismo) (Fig.3). L'avvenuta inibizione si osserva quando si ha una crescita ridotta o assente del target in presenza del tester (21). I tester sono rappresentati da tutti gli isolati endofitici ottenuti dai compartimenti della pianta e la loro attività antibatterica è saggiata nei confronti degli endofiti appartenenti al loro stesso compartimento o a compartimenti differenti oppure nei confronti di microrganismi patogeni per l'uomo.

Modello in vitro

Attraverso la messa in coltura di piante medicinali in ambiente sterile è possibile ottenere un modello

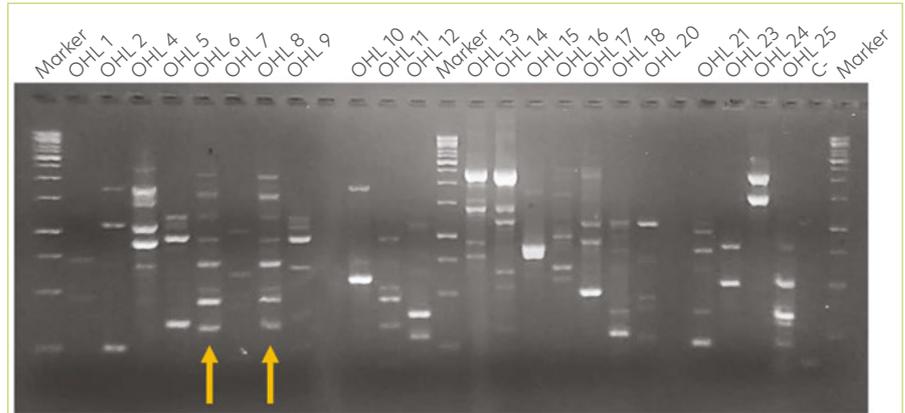


Figura 2 • Profili RAPD degli endofiti isolati dalle foglie della pianta *Origanum heracleoticum*. Gli isolati OHL6 e OHL8 (freccie) condividono lo stesso fingerprint molecolare, e quindi lo stesso apotipo

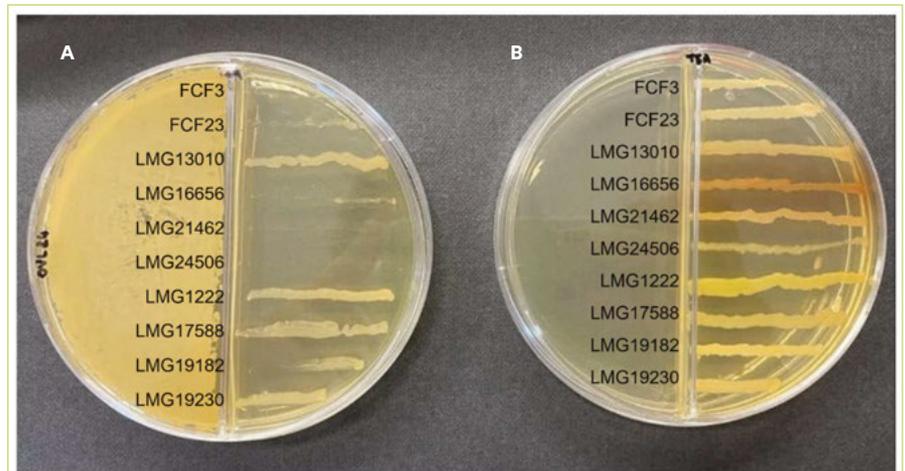


Figura 3 • Test di antagonismo. I ceppi target, appartenenti al Bcc, sono stati fatti crescere in presenza (A) e in assenza (B) del ceppo tester, un batterio endofita della pianta *O. vulgare*. L'attività inibitoria dell'endofita è molto forte nei confronti dei ceppi FCF3, FCF23, LMG16656, LMG21462, LMG24506; forte nei confronti di LMG19182 e debole o assente verso LMG13010, LMG1222, LMG17588 e LMG19230

in grado di dare informazioni sulle interazioni che si instaurano tra la pianta e il suo microbiota.

I semi ottenuti dalle piante medicinali sono sterilizzati in superficie al fine di prevenire qualsiasi crescita fungina o batterica indesiderata.

I semi sono fatti poi germinare in tubi di coltura al buio e, in seguito alla formazione delle radici, le piantine sono trasferite in terreno solido e mantenute in camere di crescita con illuminazione e temperatura controllate. Le piante così ottenute possono

essere re-infettate con i batteri endofiti isolati da individui delle stesse specie vegetali, per studiare gli effetti dell'interazione tra microbiota e pianta (22) (Fig.4).

RISULTATI

Gli endofiti sono stati ottenuti da piante medicinali cresciute nello stesso terreno e una vicina all'altra in un giardino all'aria aperta (Il Giardino delle Erbe, Casola Valsenio); in

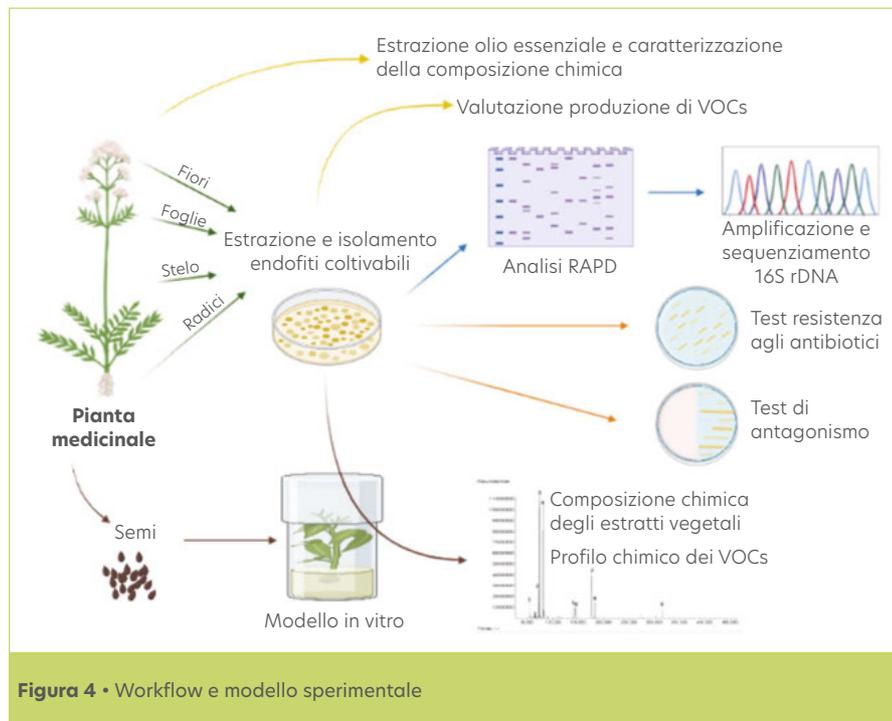


Figura 4 • Workflow e modello sperimentale

particolare, sono state analizzate le comunità endofitiche di *Lavandula angustifolia* (17), *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* (18,20,21,23,24), *Thymus vulgaris*, *Thymus citriodorus* (25) e *Origanum vulgare* (19).

Quello che si evidenzia dalla caratterizzazione molecolare del fitobioma delle piante medicinali prese in esame è un'elevata biodiversità microbica, contraddistinta da un basso livello di condivisione di ceppi tra i vari compartimenti (17-19). Un altro tratto in comune tra le diverse piante è una maggiore concentrazione di microrganismi a livello delle radici e del suolo che le circonda (rizosfera) rispetto alle parti aeree (18,19,25). Come già accennato, la via preferenziale che gli organismi scelgono per poter entrare all'interno della pianta sembra essere quella delle radici, anche se l'ingresso dagli stomi pre-

sentì sulle foglie rimane comunque una possibilità (26). La pianta è in grado di produrre degli essudati radicali che attirano i batteri presenti nel suolo: diverse tipologie di essudato richiamano diversi microrganismi, portando a comunità microbiche che possono differire molto tra specie e specie, anche quando queste sono molto vicine da un punto di vista filogenetico e sono cresciute a pochi centimetri l'una dall'altra, come è stato dimostrato per le due specie del genere *Echinacea* (18) e per diverse specie del genere *Origanum*. A partire dalle radici, i microrganismi penetrano nei tessuti interni del loro ospite e, come già ribadito, la loro distribuzione varia tra un distretto e l'altro. Se è plausibile immaginare che piante medicinali diverse possano «richiamare» batteri diversi dallo stesso suolo, meno plausibile è il fatto che compartimenti diversi

della stessa pianta, che sono in continuità tra di loro, ospitino comunità microbiche molto diverse, visto che, in linea di principio, una volta entrate all'interno della pianta, le cellule batteriche potrebbero fluire liberamente nei tessuti della stessa dando origine a una comunità microbica omogenea. Ma, come abbiamo visto, così non è.

Questi risultati suggeriscono perciò l'esistenza di ulteriori forze selettive che determinano la distribuzione degli endofiti all'interno dei tessuti del loro ospite: le caratteristiche fitochimiche e anatomiche della pianta creano delle specifiche nicchie ecologiche e sulla base della capacità dei microrganismi di tollerare e di adattarsi a questi microambienti verrà determinata la composizione della comunità microbica (18). La sintesi di oli essenziali, per esempio, rappresenta un fattore in grado di esercitare una pressione selettiva nei confronti dei microrganismi. Come dimostrato per due specie del genere *Thymus*, gli endofiti isolati dai diversi compartimenti, in particolare dalle parti anatomiche della pianta dove avviene la produzione degli oli essenziali, sono più resistenti all'olio essenziale ottenuto dalla specie di provenienza rispetto all'olio essenziale dell'altra pianta, al quale non sono solitamente esposti (25). Non è inoltre da escludere che l'adattamento dei microrganismi all'olio essenziale possa essere dovuto al coinvolgimento degli endofiti stessi

nella produzione di alcune molecole che lo compongono (25).

Uno degli approcci sperimentali in grado di dare informazioni riguardo le forze responsabili della strutturazione del fitobioma all'interno del suo ospite è il test per la resistenza agli antibiotici. In più casi è stata infatti evidenziata una maggiore tolleranza agli antimicrobici da parte dei batteri isolati dalla rizosfera rispetto agli endofiti veri e propri; in generale, diversi compartimenti mostrano diversi profili di resistenza (19,20). Questo potrebbe essere sempre dovuto alle caratteristiche fitochimiche dei vari distretti: a livello del suolo sicuramente esiste una maggior competizione tra i microrganismi che lo popolano, ma anche una maggiore probabilità che essi siano già stati esposti agli antibiotici dispersi nell'ambiente (19,20). La cosa interessante è che il diverso profilo di resistenza dimostrato dagli isolati di *E. purpurea* non è correlato all'affiliazione tassonomica dei ceppi: i profili di resistenza differiscono sulla base del compartimento di appartenenza, come a testimoniare l'esistenza di una coevoluzione tra la pianta medicinale e gli endofiti, adattatisi ai singoli microambienti (20).

Il fattore che permette di generare microambienti diversi all'interno delle parti anatomiche dell'organismo vegetale è molto verosimilmente rappresentato dalla presenza di principi attivi ad azione antibatterica. Esperimenti di cross-antagonismo

hanno permesso di confermare la capacità degli endofiti di produrre sostanze antimicrobiche in grado di inibire la crescita di batteri ottenuti dalla stessa pianta (19,21). Anche in questo caso, i compartimenti delle radici e della rizosfera sono risultati i meno sensibili all'azione antibiotica dei ceppi provenienti dallo stesso distretto o da distretti diversi. Inoltre, le differenze tra profili di resistenza non dipendevano dall'appartenenza degli isolati a un determinato genere, ma sembravano nuovamente essere correlate al compartimento di origine: i batteri isolati dallo stesso distretto presentavano livelli di sensibilità simili tra loro. Le interazioni antagonistiche tra batteri rappresentano dunque un'ulteriore pressione selettiva in grado di influenzare la strutturazione della comunità microbica. È la pianta a determinare l'ingresso dei batteri al suo interno, ma sono poi le forze antagonistiche e sinergiche tra microrganismi a definire la struttura e la composizione del fitobioma (24).

Da un punto di vista biotecnologico e farmacologico, il microbiota delle piante medicinali rappresenta una fonte ancora poco esplorata di nuovi antibiotici. La capacità di alcuni endofiti (ottenuti da *L. angustifolia*, *E. purpurea* e *O. vulgare*) di inibire la crescita di ceppi con una multiresistenza agli antibiotici appartenenti al Bcc è, in questo contesto, un risultato molto promettente (17,19,23). Inoltre, alcuni endofiti isolati da *O. vulgare* hanno dimostrato livelli di-

versi di inibizione della crescita di ceppi patogeni per l'uomo: la più alta sensibilità alle molecole antimicrobiche prodotte dagli endofiti saggiati è stata riscontrata nei confronti degli stafilococchi coagulasi negativi, mentre i ceppi di *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* si sono rivelati meno sensibili (19). L'analisi delle interazioni antagonistiche delle comunità endofitiche coltivabili delle piante medicinali nei confronti di patogeni umani potrebbe quindi permettere l'identificazione di ceppi di interesse, caratterizzati geneticamente e fenotipicamente, per i quali ottimizzare la produzione di composti antimicrobici.

L'intrigante e affascinante questione che si pone a questo punto è la seguente: le molecole bioattive (antimicrobiche e non) presenti nell'olio essenziale o nell'estratto della pianta medicinale sono sintetizzate a) dalle sole cellule vegetali, b) dai batteri endofiti, c) da entrambi oppure d) i batteri influenzano in qualche modo il metabolismo della pianta spingendola a produrre queste molecole. Ma come è possibile discernere tra queste alternative? Un possibile sistema sperimentale prevede che dalla stessa pianta dalla quale sono stati ottenuti gli endofiti venga estratto anche l'olio essenziale, di cui determinare la composizione chimica. Successivamente, è valutata la capacità di produrre composti organici volatili (VOCs) anche da

parte degli endofiti stessi. Recenti risultati preliminari, ottenuti nei nostri laboratori in collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Palermo, hanno dimostrato che alcune molecole volatili presenti nell'olio essenziale sono presenti anche nei profili chimici ottenuti dall'analisi dei VOCs di origine batterica. Questo suggerisce fortemente un ruolo attivo degli endofiti nella sintesi di almeno alcuni dei composti che costituiscono l'olio essenziale.

Un'altra possibile applicazione biotecnologica e terapeutica degli endofiti è rappresentata dalla loro capacità di stimolare il metabolismo della pianta ospite. Lo studio delle interazioni tra microbiota e pianta medicinale può avvalersi di modelli *in vitro*, ossia piante sterili nelle quali poter introdurre gli endofiti coltivabili isolati in precedenza dalla stessa specie. Questa analisi è stata portata avanti su un modello *in vitro* di *E. purpurea*. Oltre a dimostrare nuovamente l'esistenza di più forze in grado di determinare la distribuzione dei microrganismi all'interno della pianta (gli endofiti inoculati all'interno della piantina tendono a occupare il loro compartimento di origine), l'analisi degli estratti vegetali e dei composti volatili emessi in presenza e in assenza degli endofiti ha messo in luce la capacità di questi ultimi di influenzare il metabolismo della pianta. In particolare,

l'aumento dei livelli di alcanamidi e di acido cicorico negli estratti ottenuti dalle parti anatomiche del modello infettato e il cambiamento del suo profilo fitochimico rispetto ai controlli non infettati dimostrano il coinvolgimento degli endofiti nel metabolismo secondario della pianta, supportando l'idea di utilizzare i batteri endofitici per la produzione di piante di *E. purpurea* arricchite in composti bioattivi e, di conseguenza, dagli effetti terapeutici migliorati (22,27,28).

CONCLUSIONI

I dati finora ottenuti offrono un esempio preliminare, ma molto promettente, del potenziale biotecnologico dei batteri endofitici isolati da piante medicinali. La maggior parte dei ceppi testati ha rivelato un marcato effetto antagonistico tra i diversi compartimenti, una diffusa resistenza agli antibiotici e una forte capacità di inibire la crescita di patogeni umani dotati di multiresistenza agli antibiotici. Quest'ultimo risultato è di fondamentale importanza: al giorno d'oggi la ricerca di nuove molecole attive contro i patogeni umani rappresenta uno degli obiettivi più importanti da raggiungere. Sono sempre più frequenti le infezioni batteriche per le quali la somministrazione dei più comuni farmaci antibiotici risulta inefficace.

Su questo fronte, le piante medicinali e il loro microbiota rappresentano un

serbatoio naturale di composti bioattivi di elevato interesse farmacologico. Tra le prospettive future, auspichiamo che le molecole prodotte da alcuni endofiti particolarmente attivi, una volta purificate, possano essere saggiate per la loro bioattività anche *in vivo*, in modelli animali o su linee cellulari umane.

Inoltre, una volta definite le relazioni metaboliche tra la pianta e il suo microbiota, potrebbe concretizzarsi la possibilità di ottenere piante medicinali dagli effetti terapeutici potenziati.

BIBLIOGRAFIA

1. Ligon BL (2004) Penicillin: its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis* 15(1):52-57
2. Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM (2017) Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. *Chem Rev* 117(19):12415-12474
3. Fernández-Villa D, Aguilar MR, Rojo L (2019) Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *Int J Mol Sci* 20(20), doi:10.3390/ijms20204996
4. MacLean RC, Millan AS (2019) The evolution of antibiotic resistance. *Science* 365(6458):1082-1083
5. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ et al (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13(1):42-51
6. Che CT, George V, Ijiru TP et al (2017) Traditional Medicine. In: *Pharmacognosy Fundamentals, Appli-*

- cations and Strategies. Academic Press, pp.15-30
7. Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A *et al* (2018) Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int J Mol Sci* 19(6):1578
 8. DeCorte BL (2016) Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. *J Med Chem* 59(20):9295-9304
 9. Buriani A, Fortinguerra S, Sorrenti V *et al* (2020) Essential Oil Phytocomplex Activity, a Review with a Focus on Multivariate Analysis for a Network Pharmacology-Informed Phylogenomic Approach. *Molecules* 25(8), doi:10.3390/molecules25081833
 10. Castronovo LM, Vassallo A, Mengoni A *et al* (2021) Medicinal Plants and Their Bacterial Microbiota: A Review on Antimicrobial Compounds Production for Plant and Human Health. *Pathogens* 10(2), doi:10.3390/pathogens10020106
 11. Tariq S, Wani S, Rasool W *et al* (2019) A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog* 134:103580
 12. Maida I, Lo Nostro A, Pesavento G *et al* (2014) Exploring the Anti-Burkholderia cepacia Complex Activity of Essential Oils: A Preliminary Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014:573518
 13. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF *et al* (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43(10):895-914
 14. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G *et al* (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79(3):293-320
 15. Zamioudis C, Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* 25(2):139-150
 16. Fadji AE, Babalola OO (2020) Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth. *Saudi J Biol Sci* 27(12):3622-3633
 17. Emiliani G, Mengoni A, Maida I *et al* (2014) Linking Bacterial Endophytic Communities to Essential Oils: Clues from *Lavandula angustifolia* Mill. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi:10.1155/2014/650905
 18. Chiellini C, Maida I, Emiliani G *et al* (2014) Endophytic and rhizospheric bacterial communities isolated from the medicinal plants *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia*. *Int Microbiol* 17(3):165-174
 19. Castronovo LM, Calonico C, Ascrizzi R *et al* (2020) The Cultivable Bacterial Microbiota Associated to the Medicinal Plant *Origanum vulgare* L.: From Antibiotic Resistance to Growth-Inhibitory Properties. *Front Microbiol*, doi:10.3389/fmicb.2020.00862
 20. Mengoni A, Maida I, Chiellini C *et al* (2014) Antibiotic resistance differentiates *Echinacea purpurea* endophytic bacterial communities with respect to plant organs. *Res Microbiol* 165(8):686-694
 21. Maida I, Chiellini C, Mengoni A *et al* (2016) Antagonistic interactions between endophytic cultivable bacterial communities isolated from the medicinal plant *Echinacea purpurea*. *Environ Microbiol* 18(8):2357-2365
 22. Maggini V, De Leo M, Mengoni A *et al* (2017) Plant-endophytes interaction influences the secondary metabolism in *Echinacea purpurea* (L.) Moench: an *in vitro* model. *Sci Rep* 7(1), doi:10.1038/s41598-017-17110-w
 23. Chiellini C, Maida I, Maggini V *et al* (2017) Preliminary data on antibacterial activity of *Echinacea purpurea*-associated bacterial communities against *Burkholderia cepacia* complex strains, opportunistic pathogens of Cystic Fibrosis patients. *Microbiol Res* 196:34-43
 24. Maggini V, Miceli E, Fagorzi C *et al* (2018) Antagonism and antibiotic resistance drive a species-specific plant microbiota differentiation in *Echinacea* spp. *FEMS Microbiol Ecol* 94(8), doi:10.1093/femsec/fiy118
 25. Checcucci A, Maida I, Bacci G *et al* (2017) Is the plant-associated microbiota of *Thymus* spp. adapted to plant essential oil? *Res Microbiol* 168(3):276-282
 26. Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M *et al* (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* 183:92-99
 27. Maggini V, Reidel RVB, De Leo M *et al* (2019) Volatile profile of *Echinacea purpurea* plants after *in vitro* endophyte infection. *Nat Prod Res* 34(15):2232-2237
 28. Maggini V, De Leo M, Granchi C *et al* (2019) The influence of *Echinacea purpurea* leaf microbiota on chicoric acid level. *Sci Rep* 9(1), doi:10.1038/s41598-019-47329-8

Autori

MASSIMILIANO
BRUGALETTA

Agronomo, presidente
associazione CAREX,
vicepresidente Distretto
Frutta Secca di Sicilia

massibruga@gmail.com

Parole chiave

Variabilità Carrubo

Locust Bean Gum (LBG)

Ciclitolo

Le molteplici funzionalità del Carrubo

Da specie antica utilizzata nella
dieta alla possibile valorizzazione
nutraceutica dei sottoprodotti

Riassunto

La coltura del Carrubo (*Ceratonia siliqua* L.) nei Paesi del bacino del Mediterraneo ha origini antichissime. Le caratteristiche del frutto di questa specie, in primo luogo quelle nutrizionali, hanno contribuito alla sua diffusione in aree lontane da quelle di origine e ne hanno permesso nei secoli lo sviluppo di impieghi non soltanto per scopi alimentari, ma anche per una serie di funzioni di carattere ambientale, paesaggistico e culturale. La valorizzazione industriale che sfrutta oggi le proprietà della farina ottenuta dall'endosperma ha determinato il riconoscimento, a livello globale, delle sue proprietà nel campo alimentare, farmaceutico e cosmetico. La multifunzionalità che contraddistingue questa specie, così singolare nei suoi aspetti biologici e così variegata nella sua espressione genica, si allinea alla variabilità applicativa dei sottoprodotti del processo produttivo principale grazie agli ultimi contributi scientifici in ambito nutraceutico.

DIFFUSIONE E TRADIZIONE

Il Carrubo, scientificamente conosciuto come *Ceratonia siliqua* L., è una pianta leguminosa che nel sistema tassonomico attuale afferisce alla famiglia delle Fabaceae.

Questa specie è diffusa principalmente lungo le coste del bacino del Mediterraneo, ma è stata altresì introdotta dall'uomo negli Stati Uniti, in Messico, Cile, Argentina, Australia, Sud Africa e India (1), divenendo quindi oggi una specie presente in tutte le zone nel mondo con caratteristiche climatiche simili a quelle mediterranee.

Per i riferimenti alla carruba nel Vangelo, in cui si cita Giovanni Battista che se ne nutrì nel deserto, è conosciuto anche come "albero del pane di San Giovanni", attribuzione che permane tuttora nelle denominazioni comuni nella cultura inglese e tedesca. Prima ancora, il Carrubo è stato menzionato negli scritti di Teofrasto (371-286 a.C.). Secondo Sprengel, la sua coltivazione era già praticata nell'anti-

chità dagli Ebrei e dagli Egizi, tanto che, come indica questo autore, Mosè sfruttò l'elevato contenuto in zuccheri dei frutti per addolcire le acque amare del mare e dare da bere al suo popolo durante l'esodo; è stato comunque comprovato che la carruba era un frutto che gli Egizi conoscevano e usavano per la mummificazione.

Esistono numerosi riferimenti bibliografici storici in cui viene citato il Carrubo: Plinio il Vecchio nella sua *Naturalis historia*, Strabone, Catone, Virgilio e Plinio il Giovane, Lucas e Scribonio, Galeno, Palladio, Dioscoride, sino ad Avicenna, in tempi più moderni, ne commentano sia la coltura che gli usi, non solo alimentari ma anche medicinali. Quello che è certo, in epoche più recenti, è che gli ispano-arabi lo utilizzavano e lo coltivavano abitualmente.

Nella storia, questa specie ha rappresentato per molti un emblema in svariati e curiosi scritti: alcuni scrittori romani, per esempio, indicano il Carrubo come simbolo di purezza e forza, prediletto da Giove.

Come in quella cristiana, l'albero del Carrubo è presente anche nella tradizione religiosa musulmana.

Curiosa è la relazione dell'albero del Carrubo con la devozione di San Giorgio, che si ritrova dall'Asia Minore, attraverso la Sicilia, fino alla Catalogna.

È probabile che la prima grande espansione della coltivazione del Carrubo fu opera dei Fenici prima e

dei Greci poi, che lo utilizzavano nelle pratiche mediche, come si faceva con altre piante medicinali. Bizantini, Crociati, Normanni, Almogaveri, Genovesi e Veneziani utilizzarono la carruba ed estesero la coltivazione per tutti i loro domini (2).

In molti areali il Carrubo avanzò in epoca post fillosserica, occupando antiche terre a vigneto dove il clima lo permetteva; giacché questa coltivazione è molto sensibile al freddo, anche se ben adattata a suoli poveri essendo una specie anatomicamente e fisiologicamente xerofitica. Il nome *kharrub*, entrato in uso anche in Europa nel Medioevo, è di origine araba. In tempi antichi, i semi del Carrubo, considerato che il loro peso, pur variando da uno all'altro, resta più o meno costante nel tempo, venivano impiegati come unità di misura di polveri e altri prodotti di

farmacia, e in gioielleria di oro e diamanti, con un valore medio di circa 200 mg. Questa misura di peso ha preso la denominazione di "carato", da *qirat*, parola araba da cui deriva anche il termine per indicare agronomicamente il seme del Carrubo.

LA BIODIVERSITÀ DEL CARRUBO

Il Carrubo (**Fig.1**) è una specie alquanto singolare e con un elevato livello di biodiversità intraspecifica (**Fig.2**).

Tra i vari aspetti che la caratterizzano per la sua singolarità, è da rilevare l'espressione della sua sessualità. La specie è definita difatti "trioica", in quanto in natura esistono allo stesso tempo piante femminili, maschili ed ermafrodite.



Figura 1 • Esemplare di Carrubo plurisecolare



Figura 2 • Esempi di variabilità in foglie e frutti di Carrubo

Le infiorescenze del Carrubo sono dei racemi polimorfi e variabili, non solo in funzione del sesso dei loro fiori, ma anche per il colore e le caratteristiche dell'asse, lunghezza, spessore ecc. (Fig.3).

Una caratteristica peculiare di questo albero mediterraneo per eccellenza è rappresentata dalla caulifloria, ovvero l'inserzione diretta delle infiorescenze sulle branche e sul fusto.

Il frutto di questa specie, la carruba, a dispetto del nome scientifico che le è stato attribuito, è rappresentato da un baccello monocarpellare indeiscente (mentre la siliqua è un frutto bicarpellare deiscente).

È contraddistinto da grosse pareti con un elevato accumulo di zuccheri e tannini che, al principio del suo ciclo, gli conferiscono un aspetto carnoso, differente da una varietà all'altra.

Questo legume ha una forma più o meno curva e contorta, che vagamente ricorda un corno, con ingrossamenti marginali nella zona di sutura e asse carpellare pluriloculare, con pareti polpose porose e ricet-

tacolo peculiare per i suoi semi, presenti in numero variabile a seconda della varietà, dello sviluppo, delle condizioni ambientali e dell'efficacia dell'impollinazione.

Con la maturazione il frutto inizia a disidratarsi fino al momento della raccolta, assumendo un colore da rossiccio a marrone scuro a seconda della varietà.

La maturazione si raggiunge, generalmente, ad agosto-settembre, periodo in cui sulla pianta si sovrappone contemporaneamente la presenza di frutti insieme a infiorescenze del ciclo successivo. A maturazione, in funzione della cultivar, la lunghezza media dei frutti varia da 8 a oltre 30 cm (Fig.4).

Al mondo esistono oltre 200 accessioni di rilevanza colturale selezionate dall'uomo nel corso dei secoli, in origine per l'elevata resa in polpa



Figura 3 • Infiorescenze maschili, ermafrodite e femminili di Carrubo



Figura 4 • Infiorescenze di Carrubo prima (A) e dopo (B) la maturazione

e contenuto zuccherino: negli ultimi anni, invece, si tende alla selezione di cultivar con migliori rese in seme e in particolare in gomma.

Nel frutto è possibile distinguere l'esoscarpo o buccia, di natura fibrosa e colorata; il mesocarpo o polpa, di consistenza carnosa, ricco in zuccheri (rappresenta circa il 70-95% in peso del frutto intero); e l'endocarpo, di colore chiaro brillante, di natura fibrosa. Quest'ultimo divide l'interno del frutto in segmenti e logge, costituendo gli spazi carpellari dove si situano i semi.

I semi hanno una dimensione media da 9 a 10 mm di lunghezza e da 6 a 8 mm di larghezza, sono ellittici, affusolati nella zona del micropilo e appiattiti distalmente; in ogni carruba è presente un numero di carati variabile, generalmente da 6 a 18, ubicati all'interno delle logge del frutto. Il loro colore è rossiccio marrone, occasionalmente quasi nero, hanno una superficie liscia, anche se

a volte si rilevano piccole ondulazioni determinate dall'incompleto sviluppo dell'endosperma. Il carato è molto duro e resistente alla compressione.

Nei semi, che nelle cultivar tradizionalmente più diffuse rappresentano approssimativamente il 10% in peso dell'intero frutto, è possibile distinguere tre parti:

- l'episperma (30-33% del peso del seme), che copre i semi ed è costituito principalmente da cellulosa, lignina e tannini. In questo, a sua volta, si distinguono due strati, uno esterno detto "testa", che è colorato e duro, e un altro interno detto "tegmen", che è più bianco e meno compatto;
- l'endosperma (42-46% del peso del seme) che si trova sotto l'episperma e che costituisce il tessuto di riserva dell'embrione è oggi la parte di maggior interesse economico del seme. Presenta un alto contenuto in galattomannani, combinazione molecolare di

unità di mannosio e galattosio in proporzione 1:4 (3);

- il germe (23-25% del peso dei semi), in cui si notano i cotiledoni e l'embrione (Fig.5).

La polpa è ricca in zuccheri (specialmente saccarosio, in una percentuale compresa tra il 37 e il 53%) e in fibre, povera in proteine (tra 2,5 e 6,25%) e grassi (tra 0,24 e 1,25%); come elementi minerali possiede fosforo, calcio e potassio, e in minor quantità magnesio e sodio.

UNA CULTURA SOSTENIBILE

Il Carrubo è una pianta altamente resistente per svariate ragioni e la coltura di questa specie, in funzione dei moderni fattori produttivi, risulta essere pienamente sostenibile.

Una di queste ragioni è rappresentata dal fatto che le piante difficil-



Figura 5 • La carruba e il suo contenuto

mente si ammalano, tant'è che non richiedono quasi mai trattamenti antiparassitari.

Il complesso colturale di questa specie manifesta una resilienza fuori dal comune e la biodiversità che caratterizza le sue popolazioni contribuisce alla sua diffusione favorendone l'adattabilità: vegeta e produce anche in condizioni marginali, potendo adattarsi a diverse condizioni ambientali. Il Carrubo resiste più di altre specie agli incendi e, nei casi più gravi, a volte, è in grado di rivegetare dalla base del fusto.

È un albero xerofitico, di ampia plasticità riguardo la tolleranza ai suoli, anche salini (4), ma richiede condizioni termiche particolari. È un albero molto adattato a regioni aride, dove può considerarsi emblematico.

Negli ecosistemi mediterranei, infatti, l'acqua è il maggiore fattore

limitante per lo sviluppo delle piante. L'efficienza nell'uso dell'acqua dipende dai tassi di assimilazione e di evapotraspirazione, che sono determinati dal genotipo e dall'ambiente. Questa pianta ha un sistema molto efficiente e capace di regolare bene la traspirazione, e per questo ha basse esigenze idriche e sopporta bene le alte temperature (oltre 45°C in estate), vegetando anche in aree marginali grazie alla struttura coriacea delle foglie, tipica delle sclerofille, che ne permette l'adattamento ad ambienti caratterizzati da lunghi periodi asciutti. Il Carrubo è di fatto una pianta aridoresistente perché adotta una particolare strategia *water spending*, ovvero continua a traspirare anche quando la domanda evapotraspirativa dell'atmosfera è elevata. Questo è possibile, in primo luogo, per la capacità di as-

sorbire acqua da strati profondi del suolo grazie alla presenza di un apparato radicale che si sviluppa molto in profondità; in secondo luogo, per la presenza di vasi xilematici relativamente larghi (35% >50 μm) (5) che consentono un rapido riavvicinamento dell'acqua evapotraspirata dalle foglie.

Questa specie ha inoltre la capacità di mantenere il turgore cellulare attraverso un abbassamento del potenziale osmotico (in estate) e un aumento dell'elasticità delle cellule al termine dell'inverno (6).

La strategia adottata dal Carrubo, unita ai meccanismi di resistenza alla siccità, consente un efficiente uso dell'acqua. Come avviene nell'area mediterranea, un regime pluviometrico di 500 mm all'anno è sufficiente per una buona produzione di carrube.

UNA PIANTA MULTIFUNZIONALE

Oltre alla funzione principale legata ai frutti e ai prodotti che ne derivano, la coltura del Carrubo rappresenta oggi una valida alternativa agronomica in zone marginali. Grazie alla sua marcata duttilità, determinata da vari meccanismi di aridoresistenza, si presta per prevenire l'erosione dei suoli e la desertificazione, in quanto contribuisce a mantenere una certa copertura vegetale del suolo, con ricadute positive anche dal punto di vista paesaggistico. Questa

specie rappresenta quindi un'ottima scelta per la riforestazione di aree marginali degradate del bacino del Mediterraneo, processo del resto già avviato da vari imprenditori agricoli attraverso le misure agroambientali cofinanziate dall'Unione europea.

Sempre più spesso, nei Paesi in cui questa specie è presente, viene impiegata nelle alberature di aree a verde, parchi, strade, come pianta da ombra, assolvendo altresì alla funzione ornamentale che le viene attribuita anche in contesti privati, per i quali è ricercata per il suo pregio multifunzionale, non solo in piena terra ma anche in vaso, rappresentando non di rado il simbolo di eventi di carattere culturale.

LE CARRUBE NELLA DIETA MEDITERRANEA

Le carrube hanno assolto per lungo tempo il ruolo di fonte nutritiva a basso costo e di alto valore energetico nell'alimentazione delle popolazioni mediterranee, ma negli ultimi decenni l'uso alimentare è progressivamente diminuito al crescere del tenore di vita, determinando una graduale scomparsa degli alberi di Carrubo dal panorama floristico italiano (7).

La coltivazione del Carrubo, la produzione, trasformazione e commercializzazione dei baccelli e dei derivati sono attività economiche tipiche

dell'area dell'altopiano ibleo, interessando il comparto agricolo e zootecnico, quello commerciale e quello della trasformazione eseguita sia a livello artigianale che industriale.

Le province di Ragusa e Siracusa negli ultimi anni raccolgono circa il 95% della superficie nazionale.

Nei primi decenni del Novecento le carrube venivano in massima parte utilizzate per l'alimentazione dei bovini e degli equini. Dopo gli anni Trenta, a causa della graduale sostituzione degli animali con i mezzi meccanici per lo svolgimento di diverse operazioni colturali in agricoltura, il prodotto destinato all'alimentazione del bestiame subì una significativa riduzione della domanda e il collocamento delle carrube sul mercato divenne più difficile. Tutto ciò provocò da un lato il crollo dei prezzi e dall'altro una notevole riduzione delle superfici coltivate, e la coltura rischiò l'estinzione (8).

In seguito, la nascita di nuove forme di utilizzazione delle carrube (distillazione del prodotto per la produzione di alcol etilico e, in un secondo tempo, l'estrazione dalle carrube di sostanze pectiche e farine neutre, e l'utilizzazione come addensanti nell'industria alimentare) determinò la crescita della domanda e una ripresa del mercato.

Negli ultimi decenni si registrarono alterne vicende condizionate, da un lato, dall'elevazione delle imposte sull'alcol etilico e dall'avvento nell'industria chimica di procedi-

menti di sintesi per l'ottenimento di prodotti in sostituzione di quelli tradizionalmente ricavati dalle carrube; dall'altro, da nuove e distinte possibilità di impiego dei frutti e dei semi, favorendo la nascita di alcune imprese di prima e seconda trasformazione, e una ripresa del mercato delle relative produzioni (9).

La composizione chimica della polpa dipende dalla cultivar, dalle condizioni pedoclimatiche e dal grado di maturazione della carruba. Contiene in media il 48-52% di carboidrati, principalmente costituiti da saccarosio (32-38%), glucosio (5-6%) e fruttosio (5-7%); il 18% di cellulosa ed emicellulosa e il 2-3% di ceneri, in cui prevalgono il potassio (1,1%) e il calcio (0,31%). Sono altresì presenti piccole quantità di lipidi (0,2-0,6%), con eguale proporzione di acidi grassi saturi e insaturi (10), e di proteine contenenti gli aminoacidi alanina, fenilalanina, glicina, leucina, prolina, tirosina e valina (1). Costituisce un alimento alquanto nutriente, considerati gli elevati contenuti di zuccheri e di proteine; è fonte di diverse vitamine (A, B1, B2, B3, D) e di minerali come calcio, magnesio e potassio (11).

Il saccarosio può essere estratto dalle polpe con particolari tecnologie e si presenta di ottima qualità se ricristallizzato. Il contenuto di saccarosio dei frutti aumenta rapidamente dalla fine del mese di maggio fino a raggiungere il massimo livello a metà agosto.

Molto interessante è il contenuto in pectine e tannini: le prime conferiscono proprietà curative e preventive di forme patologiche a carico dell'apparato digerente; i secondi, grazie al loro potere astringente, possono coadiuvare nella terapia antidiarroica. Dalla polpa si possono ottenere diversi prodotti: tra questi uno sfarinato, macinato a una granulometria simile alla semola di mais, e uno frantumato con particelle di dimensioni 6-20 mm; entrambi impiegati nella produzione di mangimi composti per l'alimentazione animale.

Dalla tostatura e successiva micronizzazione della polpa è possibile produrre una farina particolare, destinata al consumo umano o animale, in funzione degli standard di produzione, che trova largo impiego nelle produzioni dolciarie o nei mangimi, notevolmente apprezzata per il gusto gradevole e l'elevato contenuto di zuccheri.

In ambito alimentare, le sue caratteristiche di base ne fanno un surrogato della polvere di cacao, con il vantaggio di avere un contenuto di grassi molto basso, un'assenza quasi totale di teobromina (3,7-dimetilxantina, alcaloide naturale) e un elevato contenuto in zuccheri invertiti. Questa farina di polpa di carruba è ampiamente impiegata sia nella produzione di alimenti dietetici sia nel settore dei dolci; può essere utilizzata da sola o in combinazione con il cacao, in quanto non ne modifica né il gusto né il colore.

Le popolazioni della Sicilia un tempo preparavano i mustazzoli o mostaccioli (biscotti morbidi), pasta, dolci, mostarda e marmellata di polpa macinata.

Con il frutto intero torrefatto, in diversi Paesi europei si ottiene un gustoso surrogato del caffè e del cioccolato. In Turchia dalla polpa si ricavano liquori e nei Paesi arabi paste, sorbetti e sciroppo.

GLI IMPIEGHI INDUSTRIALI MODERNI

Il principale interesse della coltivazione del Carrubo oggi è rivolto alla produzione della farina di semi, *Locust Bean Gum* (LBG) o *Carob Bean Gum* (CBG), che trova ampia applicazione come additivo tecnologico in diverse preparazioni alimentari, facendo così riscoprire e rivalutare questo frutto spesso dimenticato, che invece racchiude un'enorme ricchezza e potenzialità di utilizzo, e che meriterebbe maggiore riconoscimento come coltura da impiantare. Attualmente sono numerosi, infatti, i prodotti alimentari di larghissima diffusione che contengono farina di semi di carruba, da sola o in combinazione con altri ingredienti.

Come già ricordato, i semi di carruba sono costituiti dall'episperma (30-33% in peso), dall'endosperma o gomma (42-46%) e dal germe (23-25%) (12).

Il tegumento è costituito da lignina e cellulosa, e contiene anche pigmenti e sostanze antiossidanti, mentre l'endosperma è caratterizzato da un elevato contenuto di galattomannani, una classe di polisaccaridi che possiede la proprietà di legare l'acqua formando soluzioni viscosose e stabili già a basse concentrazioni ($\leq 1\%$), in un ampio intervallo di pH e temperatura.

L'embrione è ricco di proteine (50-56%), di carboidrati (18-20%), di lipidi (6-8%) e fibre (18-22%), costituendo pertanto un alimento idoneo per l'alimentazione umana e animale.

La notevole variabilità della composizione del seme, oltre che alla cultivar, è dovuta anche al metodo di lavorazione adottato per separare le varie parti che lo compongono.

Il seme di carruba è particolarmente duro; il tegumento, formato da tre strati incrociati, infatti, è impermeabile e non si lascia scalfire facilmente. La parte più importante del seme è quindi l'endosperma, composto dalla combinazione di mannoni e galattoni idrosolubili. Tale sostanza fornisce pseudo soluzioni di altissima viscosità e ha la proprietà di assorbire acqua fino a 40 volte il suo peso secco. Sul mercato è presente anche come farina di semi di carruba (LBG) allo stato secco.

Caratteristica tipica dell'LBG, inclusa nella lista positiva degli additivi autorizzati nell'Unione europea (codice E 410), è l'elevata stabilità a caldo che ne fa un additivo insostituibile

per molte applicazioni nell'industria alimentare. La sua dose giornaliera accettabile (DGA) è senza limite perché i risultati di studi biochimici, tossicologici e nutrizionali hanno dimostrato che è esente da rischi per la salute umana quando il suo impiego è condotto secondo buona tecnica.

La sua principale funzione d'uso è quella di migliorare le proprietà addensanti dei prodotti alimentari, incrementandone la consistenza e la sofficità, per questo trova vasto impiego nel settore delle tecnologie alimentari, da sola o in combinazione con altri ingredienti.

Altre importanti funzioni riguardano la prevenzione della formazione dei cristalli di ghiaccio negli alimenti congelati e surgelati, la stabilizzazione delle fasi liquide immiscibili (emulsioni), delle fasi liquido-gas (schiume) e delle fasi liquido solide (dispersioni). Inoltre, ha la capacità di abbassare l'attività dell'acqua, contribuendo alla prevenzione dello sviluppo della carica microbica e dell'insorgenza di indesiderate trasformazioni a carico dei costituenti alimentari, come la degradazione dell'amido.

Le applicazioni della farina di seme di carruba sono varie. Tra le principali si annoverano i gelati, con impieghi nell'ordine dello 0,1-0,3%, a cui conferisce una struttura uniforme e vellutata, evitando la formazione di cristalli di ghiaccio. L'LBG non altera le proprietà organolettiche al momento del consumo, e rende lenta

e cremosa la fusione. L'E410 è poi impiegato in salse, condimenti, maionese e prodotti in scatola. L'LBG, da sola o in combinazione con altri additivi, ha ottime proprietà stabilizzanti e addensanti in tutti i prodotti emulsionati, specialmente quando tali emulsioni sono sottoposte a trattamenti termici e meccanici, come richiesto dalle moderne tecnologie di conservazione. La struttura conferita a questi prodotti risulta notevolmente più leggera e palatabile rispetto a quella ottenuta con l'utilizzo di soli amidi e farine.

La resistenza di questa farina ai trattamenti termici (sterilizzazione) la rende ormai indispensabile anche per prodotti a base di carne in scatola, in combinazione con agar-agar o carragenine.

Nei prodotti surgelati l'LBG esercita un'azione protettiva sulla struttura del prodotto finito migliorandone la stabilità agli shock termici (congelamento e scongelamento) e contribuisce a dare al prodotto finito un aspetto più gradevole.

Nei formaggi e in altri prodotti derivati dal latte, l'utilizzo di addensanti, quali l'LBG, per la preparazione di alcuni tipi di prodotti freschi è pratica comune in alcuni Paesi europei (Germania, Inghilterra e Stati Uniti): l'utilizzo dell'LBG conferisce caratteristiche di cremosità e spalmabilità notevolmente migliori. Inoltre, è possibile eseguire su questi prodotti dei trattamenti termici, senza incorrere in sgradevoli coagulazioni o cambia-

menti della struttura del formaggio.

Negli yogurt, oltre che addensare il prodotto, l'LBG funziona da stabilizzante, evitando la separazione di siero.

In molti dessert a struttura gelatinizzata come i budini, l'aggiunta dell'LBG permette di evitare fenomeni di sineresi.

Per le sue spiccate proprietà leganti e stabilizzanti delle emulsioni grasso-acqua, in alcuni Paesi europei l'LBG viene utilizzata per la produzione di insaccati quali salsicce, wurstel, ecc. Permette di ottenere una pasta più omogenea, con maggiore stabilità e con una struttura più morbida. Inoltre, il suo effetto lubrificante facilita le operazioni di estrusione e insaccamento.

Nei semilavorati di frutta, destinati all'industria lattiero casearia e in pasticceria, l'LBG permette di mantenere la stabilità durante i processi di trasformazione cui sono sottoposti.

L'LBG trova impiego anche nel settore dell'alimentazione animale, in quanto è utilizzata in combinazione con altri gelatinizzanti (carragenine) per la preparazione di alcuni tipi di pet-food (cibi pronti in scatola per cani e gatti).

L'LBG è utilizzata inoltre nell'industria tessile e cartaria come addensante per la stampa.

Nell'industria farmaceutica trova impiego come legante e disintegrante per compresse e pillole, come addensante per pomate e ungenti, e come emolliente per colliri.

Altri usi si registrano nell'industria di esplosivi, nella concia delle pelli e nella formulazione di detergenti (13).

LA VALORIZZAZIONE INDUSTRIALE DEGLI ALTRI DERIVATI

Il processo di produzione della farina di seme, oltre che il prezioso addensante ricavato dall'endosperma, restituisce un sottoprodotto composto dall'episperma e dal germe. Tale miscela, costituita da piccolissime scaglie è, ad oggi largamente apprezzata in ambito mangimistico per il suo contenuto proteico, che si attesta al 25-30% in peso, ma soprattutto per il suo profilo amminoacidico che annovera ben il 50% del totale degli amminoacidi liberi tra gli amminoacidi essenziali, con fenilalanina, triptofano e valina tra i più rappresentativi, mentre tra i non essenziali risultano particolarmente abbondanti l'acido glutammico, cistina e glicina.

Grazie a un processo di arricchimento ottenuto mediante un sistema di separazione meccanico, da tale sottoprodotto vengono valorizzate da un lato le proteine, sul mercato dei preparati proteici, e dall'altro le fibre, impiegate nel settore alimentare per le proprietà antiossidanti.

La polpa residua dal processo di estrazione dei semi, che rappresenta circa il 90% della massa di carrube intere lavorate, è stata oggetto di

numerose ricerche che hanno evidenziato interessanti scoperte inerenti alla bioattività dei suoi costituenti.

Per quanto riguarda la salute umana, le sue frazioni sono associate alla prevenzione e al trattamento di un'ampia varietà di malattie, tra cui il diabete, l'iperlipidemia, la sindrome dell'intestino irritabile e il cancro del colon.

Fibre, polifenoli, tannini e ciclitoli sono stati legati dal mondo scientifico agli effetti dei derivati del Carrubo in varie aree terapeutiche: antitumorali, anti-diabete, antidiarroica e antiperlipidemia. Queste scoperte hanno reso la carruba un ingrediente di interesse per lo sviluppo di alimenti funzionali e integratori a base vegetale.

Grazie a vari studi hanno destato un particolare interesse gli effetti benefici delle fibre dalla polpa di Carrubo sul metabolismo e sull'assorbimento dei lipidi (14).

Il Ministero della Salute ha inserito il frutto del Carrubo nell'Allegato 1 del Decreto del 9 luglio 2012, e successive modificazioni, che disciplina l'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali, riconoscendogli effetti fisiologici positivi sull'organismo quali la regolarità del tratto intestinale, l'azione emolliente e lenitiva del sistema digerente, la modulazione/limitazione dell'assorbimento dei nutrienti e la facilitazione del senso di sazietà.

Tali effetti contribuiscono al mantenimento dell'equilibrio del micro-

biota intestinale e limitano il rischio di disbiosi, aiutando a prevenire infiammazioni croniche del tratto intestinale.

Le fibre alimentari insolubili della carruba rappresentano oltre il 30% della polpa e sono costituite da cellulosa, emicellulosa, lignina e polifenoli insolubili. L'elevata percentuale di polifenoli presenti nella fibra di carruba la differenzia da altre fonti di fibre alimentari.

Le sostanze polifenoliche rilevano oggi un certo interesse in ambito farmaceutico, in quanto sono in gran parte rappresentate da tannini, alcuni dei quali trovano oggi impiego nel trattamento di patologie degenerative dovute all'eccesso di radicali liberi e nella prevenzione di alcune patologie neoplastiche.

È stato anche dimostrato che grazie al contenuto in tannini, una soluzione al 2% di carruba è in grado di bloccare l'emoagglutinazione e l'adesione di *Escherichia coli* su un isolato di cellule epiteliali intestinali, e tale meccanismo potrebbe spiegare l'efficacia della frazione proposta nei trattamenti pediatrici.

È comunque ormai generalmente diffusa l'opinione che i tannini estratti dalle farine possono trovare utilizzo nella formulazione di prodotti salutistici (14).

Una parte dei polifenoli è poi rappresentata da catechine (acido gallico, epicatechina gallato, epigallocatechina gallato), per le quali è stata provata l'induzione di una marcata

riduzione della proliferazione cellulare in modo dose-dipendente su colture cellulari tumorali epatiche (11).

Acidi fenolici, gallotannini e flavonoidi si trovano nella carruba in forma libera, legati o in forme coniugate solubili. Questo frutto è una delle fonti più ricche di acido gallico, così come di flavonoidi ulteriormente classificati in antocianine, flavonoli, flavanoli, flavoni, flavanoni e isoflavonoidi. Tra questi, sono particolarmente abbondanti i flavonoli come la quercitina, la miricetina, il campferolo e i loro derivati glucosidici: secondo vari studi alcuni di essi hanno manifestato un'interessante attività antiproliferativa e apoptotica contro le cellule tumorali e attività citotossica in generale (14).

Il ciclitolo maggiormente presente nella carruba è rappresentato dal D-pinitolo in una quantità variabile da 1 a 8,5 g su 100 g, dipendente da fattori genetici e ambientali con quantitativi maggiori in accessioni selvatiche rispetto a piante appartenenti a varietà coltivate. Si ritiene che tale molecola sia responsabile degli effetti antidiabetici poiché regola il livello di zucchero nel sangue nei pazienti con diabete mellito di tipo 2, aumentando la sensibilità all'insulina. Lo sciroppo di carruba è considerato una ricca fonte di D-pinitolo; dato che ne bastano 10 g, rispetto alla dose standard (10 mg di D-pinitolo/kg di peso corporeo), per abbassare il livello di zucchero nel sangue nel diabete. Per la sua



Figura 6 • Variabilità tra tre semenzali di Carrubo

estrazione sono state messe a punto alcune procedure, facendo anche uso di tecniche cosiddette green e solvent-free a ultrasuoni e di fluidi supercritici (14).

Come da più parti rilevato, il contenuto di talune molecole varia in funzione dei fattori genetici, colturali e ambientali, per cui la ricerca scientifica prima e lo sviluppo industriale dopo devono essere volti alla valorizzazione dei sottoprodotti industriali, quantomeno per scopi nutraceutici, puntando alla valorizzazione della biodiversità della specie che si manifesta a carico dei tessuti di tutti gli organi della pianta (15) (Fig.6).

BIBLIOGRAFIA

1. Batlle I, Tous J (1997) Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized
2. Spina P (1986) Il carrubo. Edagricole, Bologna.
3. Tous J, Batlle I (1990) El algarrobo. Mundi-Prensa, Madrid, p.102
4. Gil-Albert F (1991) Tratado de arboricultura frutal. Vol. I. Aspectos de la morfología y fisiología del árbol frutal. Mundi-Prensa, Madrid, p.104
5. Lo Gullo MA, Salleo S (1988) Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytol* 108(3):267-276
6. Nunes MA, Catarino F, Pinto E (1989) Strategies for acclimation to seasonal drought in *Ceratonia siliqua* leaves. *Physiol Plant* 77(1):150-156

7. Muratore G (2010) Nuove prospettive di utilizzo dei derivati di carruba (*Ceratonia siliqua* L.). Convegno: Attualità e prospettive della coltivazione del carrubo, 3 dicembre 2010, Rosolini (SR).
8. Maltese U, Pesce S (1996) Produzione e mercato delle carrube in Italia, Facoltà di agraria dell'Università Istituto di economia e politica agraria Catania.
9. Pecorino B (2001) Analisi e prospettive delle carrube e dei derivati. Atti del convegno: Il carrubo. Situazione attuale e prospettive di sviluppo, 28 dicembre, Ragusa.
10. Rendina N., Lucisano A., Amato P et al (1969) Fatty acids in *Ceratonia siliqua* fruits. Gas Chromatographic study. Nuova Chemistry 45:92-94
11. Baraldi M, Avallone R, Corsi L et al (2002) Valorizzazione dal punto di vista dietetico-alimentare e fitoterapeutico di composti tannici presenti nel carrubo (*Ceratonia siliqua* L.). Atti del convegno: Il carrubo, situazione attuale e prospettive di sviluppo, 28 dicembre, Ragusa.
12. Newcom E (1988) Technologies and Services industry Master of Business.
13. Savarino G, Barbagallo RN (2009) Trasformazione industriale di carrube in Sicilia aspetti tecnologici e tipologie di prodotto. Industrie Alimentari, XLVIII novembre, pp.36-45
14. Goulas V, Stylos E, Chatziathanasiadou M et al (2016) Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. Int J Mol Sci 17(11):1875
15. Brugaletta M, Caruso M, La Malfa S et al (2008) Caratterizzazione morfologica e molecolare di cultivar di carrubo (*Ceratonia siliqua* L.) in Sicilia. Atti VIII Congresso Nazionale La Biodiversità - Una risorsa per sistemi multifunzionali. Lecce, 21-23 aprile 2008, pp.92-94

COSMOPROF

WORLDWIDE BOLOGNA

LA FIERA LEADER MONDIALE
PER L'INTERA INDUSTRIA
DELLA COSMETICA E DELLA
BELLEZZA PROFESSIONALE
COSMOPROF.COM

NEW DATES

28 APRILE - 1 MAGGIO 2022

COSMOPACK

COSMO PERFUMERY &
COSMETICS

29 APRILE - 2 MAGGIO 2022

COSMO HAIR & NAIL &
BEAUTY SALON

BOLOGNA
QUARTIERE FIERISTICO

Heads Collective

ORGANIZZATO DA
BolognaFiere Cosmoprof S.p.a.
Milano
T +39 02 796 420
F +39 02 795 036
info@cosmoprof.it

COMPANY OF
 Bologna
Fiere

IN COLLABORAZIONE CON
 COSMETICA ITALIA
associazione nazionale imprese cosmetiche

CON IL SUPPORTO DI


Ministero degli Affari Esteri
e della Cooperazione Internazionale


ITALIAN TRADE AGENCY

A NEW WORLD FOR BEAUTY BOLOGNA, HONG KONG, LAS VEGAS, MUMBAI, BANGKOK

Autori

ELENA GHEDINI¹
FEDERICA MENEGAZZO¹
MICHELA SIGNORETTO¹
SEBASTIANO TIEULI¹
ALESSANDRO DI MICHELE²
LUANA PERIOLI³

¹CatMat team, Dipartimento di Scienze Molecolari e Nonosistemi, Università Ca' Foscari Venezia

²Dipartimento di Fisica e Geologia, Università degli Studi di Perugia

³Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia

gelena@unive.it

Parole chiave

Biomasse filiere locali
Biochar nocciole
Carrier veicolazione p.a.

Il guscio: da biomassa a ingrediente attivo e funzionale

Nella filiera della Nocciola un caso studio tutto italiano per applicazioni nutraceutiche e cosmetiche sostenibili

Riassunto

Gli scarti agroalimentari sono ricchi di biometaboliti che possono essere impiegati come sostanze funzionali in ambito cosmetico e nutrizionale.

Particolarmente appealing in questo senso risulta l'impiego di biomasse reperibili in ambito locale per ottimizzare un prodotto sostenibile a trecentosessanta gradi attraverso il controllo completo di tutta la filiera. Il lavoro presentato è focalizzato sull'impiego di approcci hi-tech per la trasformazione di sottoprodotti della filiera agroalimentare in prodotti nutraceutici e cosmetici efficienti, smart e a km 0.

Biomasse locali quali i gusci di Nocciola saranno utilizzati come fonte di molecole antiossidanti e polisaccaridi da impiegare quali attivi del formulato e anche come carrier di veicolazione.

INTRODUZIONE

Gli obiettivi di sostenibilità stabiliti dall'Agenda 2030 sono stati sottoscritti dai 193 Paesi dell'ONU e l'avvio ufficiale è coinciso con l'inizio del 2016. Il programma prevede, entro il 2030, il raggiungimento di risultati stringenti e ben definiti in campo ambientale e istituzionale, passando per l'economia e la società. Mancano solo otto anni ma c'è ancora tantissima strada da percorrere, a partire dall'accezione data al concetto di sostenibilità, uno tra i più inflazionati degli ultimi anni ma al tempo stesso tra i meno chiari.

La pandemia ha messo in crisi tante certezze e se da un lato ha in parte rallentato il percorso delineato dall'Agenda 2030, al tempo stesso ha evidenziato ancor di più la necessità di procedere spediti verso una transizione sostenibile a trecentosessanta gradi, a partire dal reperimento delle materie prime. Numerose fragilità

sono emerse, in particolare, nella filiera agroalimentare, problematiche che possono essere affrontate solo con innovazione e ricerca, e attraverso l'attuazione di approcci trasversali e multidisciplinari.

Proprio dall'agrifood può arrivare una spinta rilevante verso la sostenibilità, favorendo un'alleanza strategica tra alimentazione e salute. Per raggiungere l'obiettivo ci deve essere un'alleanza tra imprese, università, ricerca e consumatori per trovare soluzioni sostenibili (le uniche possibili) per l'agroalimentare e per tutto l'indotto. La tecnologia rappresenta un passaggio chiave: agricoltura di precisione, tracciabilità e nutraceutica sono le diverse facce di un'innovazione che può portare a un aumento della produzione, a uno sfruttamento intelligente delle risorse impiegate e a un miglioramento della qualità dei prodotti finali. In nutraceutica una transizione tecnologica sostenibile è fondamentale per ottenere prodotti di qualità in grado di conciliare le richieste di un mercato in continua crescita.

L'Italia è tra i leader europei nel settore, con la necessità di favorire la transizione circolare. L'impiego di biomasse e sottoprodotti della filiera agroalimentare *Made in Italy* in campo nutraceutico diventa strategico. In questo lavoro è presentato un caso studio riguardante l'impiego di gusci di nocciole come fonte di materie prime per la preparazione di integratori alimentari.

PROCESSI ESTRATTIVI E PIROLISI

Ricavare materie prime funzionali dal guscio di Nocciola

Nella produzione mondiale di Nocciola l'Italia è seconda solo alla Turchia: la corilicoltura è infatti un settore di eccellenza per il nostro Paese. Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura, nel 2018 in Italia sono state prodotte circa 133 mila tonnellate di nocciole (1). L'esportazione riveste un ruolo chiave, infatti sempre nello stesso anno sono state esportate dal Paese circa 30 mila tonnellate di nocciole sgusciate (1).

I gusci costituiscono più del 50% del peso totale del frutto (2) e sono principalmente utilizzati come combustibile solido di origine naturale: essendo infatti di matrice lignocellulosica possiedono un buon potere calorifico, sono *environmentally friendly* e molto economici (3).

Tuttavia, i gusci di Nocciola sono ricchi di metaboliti, tra cui polifenoli e flavonoidi, ingredienti preziosi sia in cosmesi che in nutraceutica. Il guscio di Nocciola è, infatti, composto da cellulosa, emicellulosa e β -glucani, ma soprattutto da lignina, un polimero organico formato principalmente da tre monomeri: l'alcol cumarilico, l'alcol coniferilico e l'alcol sinapilico, da cui si ottengono poi i polifenoli (4).

I fitometaboliti possono essere estratti dai gusci di nocciole con l'utilizzo di varie metodologie: macerazione, bollitura ed estrazione con Soxhlet sono le più utilizzate, essendo le più economiche, di facile applicazione e scalabilità, e con una resa molto buona.

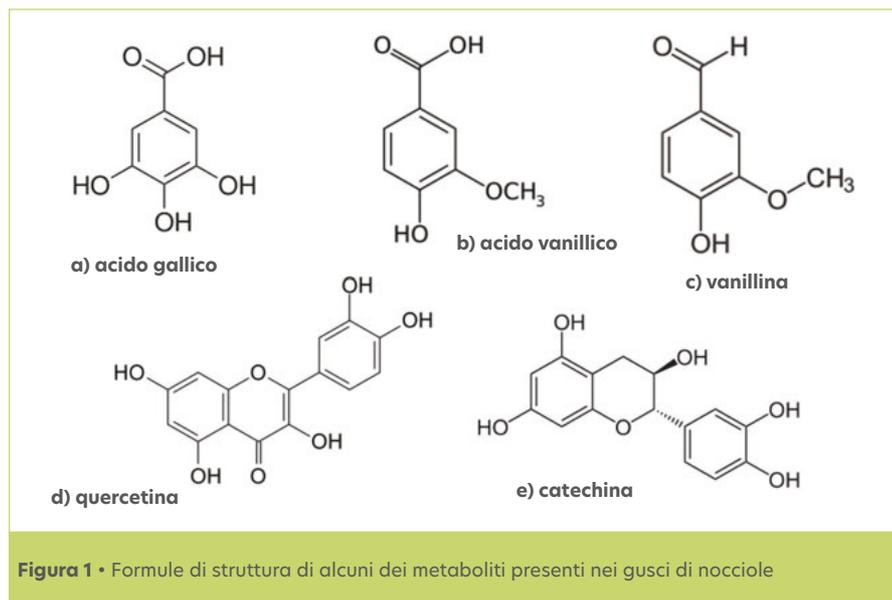
L'estrazione tradizionale avviene, solitamente, in soluzione idroalcolica a temperatura medio-alta. Esistono tuttavia approcci estrattivi più innovativi che sfruttano gli ultrasuoni e le microonde.

Queste tecniche permettono di diminuire i tempi, le temperature di lavoro e la quantità di solvente utilizzato, ma di ottenere ugualmente una resa soddisfacente. I solventi utilizzati sono principalmente acquosi, organici (metanolo, etanolo, acetone) o miscele idroalcoliche, è perciò necessario ricorrere a un'efficiente tecnica di separazione dell'estratto dalla fase liquida.

Alcune delle tecniche utilizzate per la separazione sono l'estrazione liquido-liquido, l'estrazione solido-liquido, l'assorbimento-desorbimento o la liofilizzazione (5).

In **Figura 1** sono riportate le formule di struttura dei principali composti che si possono ottenere dai gusci di nocciole: acidi fenolici come l'acido gallico (a) e l'acido vanillico (b); aldeidi come la vanillina (c); flavonoidi come la quercetina (d) e la catechina (e).

Nell'ambito dello studio qui presentato, gusci di Nocciola di coltivazio-



ne biologica sono stati sottoposti dal team di Luana Perioli, presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Perugia, a due diversi trattamenti estrattivi: macerazione idrotermale ed estrazione assistita da microonde. In entrambi i casi i parametri di sintesi sono stati scelti per garantire il miglior compromesso tra resa di processo, riduzione

dell'impatto energetico e ambientale, e scalabilità.

La **Figura 2** mostra i parametri di processo e le rispettive rese.

La macerazione idrotermale è quella che si è dimostrata più efficace in termini di resa e che è stata quindi selezionata per ottenere gli estratti (la cui composizione percentuale è riportata in *Tabella 1*).

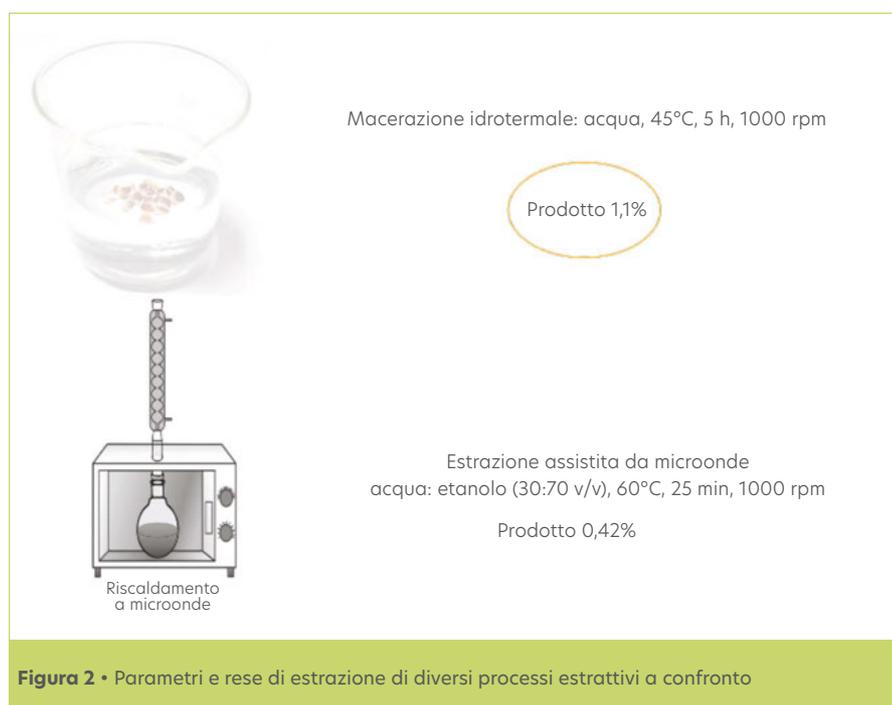


Tabella 1 • Contenuto in fitometaboliti dell'estratto derivato da macerazione idrotermale

Fitometaboliti	%
Isoquercetina	12
Acido clorogenico	6
Catechina	5
Tirosolo	4
Isoxantunolo	4
Acido ferulico	2
Acid caffeico	1
TPC (mg GAE/g)	DPPH (mg TE/g)
4,66	4,37

FITOMETABOLITA

I fitometaboliti ottenuti sono tutti validi antiossidanti. L'acido clorogenico e l'acido caffeico, in particolare, esibiscono interessanti proprietà antiossidanti, antibatteriche e antinfiammatorie. L'acido clorogenico ha inoltre dimostrato effetti ipotensivi e modulatori della glicemia, anche se, queste due ultime applicazioni richiedono trial di verifica più autonomi ed estesi (6). Questi presupposti rendono l'estratto un ottimo candidato per la formulazione di integratori alimentari. Nello studio proposto le proprietà dell'estratto vegetale ottenuto sono state ulteriormente valorizzate attraverso l'impiego di un veicolo nanoporoso a base di carbone vegetale ottenuto ancora una volta dai gusci di Nocciola: un procedimento di valorizzazione che concorre a rendere il processo di recupero e trasformazione dello scarto veramente sostenibile. A tal scopo il

residuo fibroso di estrazione è stato sottoposto a un trattamento termico in assenza di ossigeno (pirolisi), che ha permesso di formare un carbone vegetale a km 0. La pirolisi è un processo di conversione termochimica che avviene in atmosfera inerte e con temperature pari o superiori ai 400°C, ottenendo principalmente tre prodotti: un solido, il *biochar*, un liquido, il bio-oil (oltre all'acqua), e diversi gas (CO₂, CO, H₂ e CH₄), le cui percentuali variano in base alla biomassa di partenza e alle condizioni di trattamento (7).

Il *biochar* è un carbone poroso altamente funzionalizzato che si presta molto bene, per le sue caratteristiche, a essere utilizzato come materiale assorbente, in alternativa ai carboni vegetali che vengono già

normalmente impiegati in ambito cosmetico, ma anche nutraceutico.

In **Figura 3** sono riportate le condizioni di processo impiegate per ottenere il *biochar* e le micrografie *Scanning Electron Microscopy* (SEM) della biomassa di partenza e del carbone. Quest'ultimo mostra una struttura porosa nettamente più articolata rispetto allo scarto di estrazione e un'area superficiale ottenuta mediante misura di fisisorbimento di azoto, pari a 160 m²/g. Un carbone vegetale attivo ottenuto da Noce di cocco, e utilizzato nello studio come riferimento, presenta invece un'area superficiale pari a 400 m²/g. I due carboni si differenziano, inoltre, per la natura dei pori, che sono principalmente inferiori ai 2 nm (micropori) nel caso del carbone vegetale, caratteristica comune ai

carboni attivi, e con una distribuzione di dimensioni in un range tra i 2 e i 10 nm nel caso del *biochar*.

Allo scopo di massimizzare la sostenibilità del processo e del formulato finale, il *biochar* da nocchie non è stato sottoposto ad attivazione: la stessa ha infatti un netto impatto sul *Life Cycle Assessment* (LCA) del materiale. Nonostante questo è stato possibile, come descritto nel paragrafo successivo, ottenere un materiale poroso e potenzialmente idoneo a essere impiegato come carrier in nutraceutica.

IL FORMULATO

Il *biochar* è stato utilizzato come carrier per la veicolazione degli attivi contenuti nell'estratto derivato dalla macerazione idrotermale.

A tale scopo, un'opportuna quantità di estratto è stata solubilizzata in etanolo e introdotta nel *biochar* mediante impregnazione a secco, tecnica che permette di saturare tutti i pori del carbone impiegando la quantità minima di solvente necessario. Il prodotto ottenuto è stato poi miscelato con cellulosa, amido e gomma xantana, ottenendo un formulato costituito per il 50% in peso dal complesso *biochar* ed estratto. La performance del prodotto ottenuto è stata valutata *in vitro* simulando il tratto gastrointestinale.

In **Figura 4** è riportato il risultato ottenuto con il campione prepara-

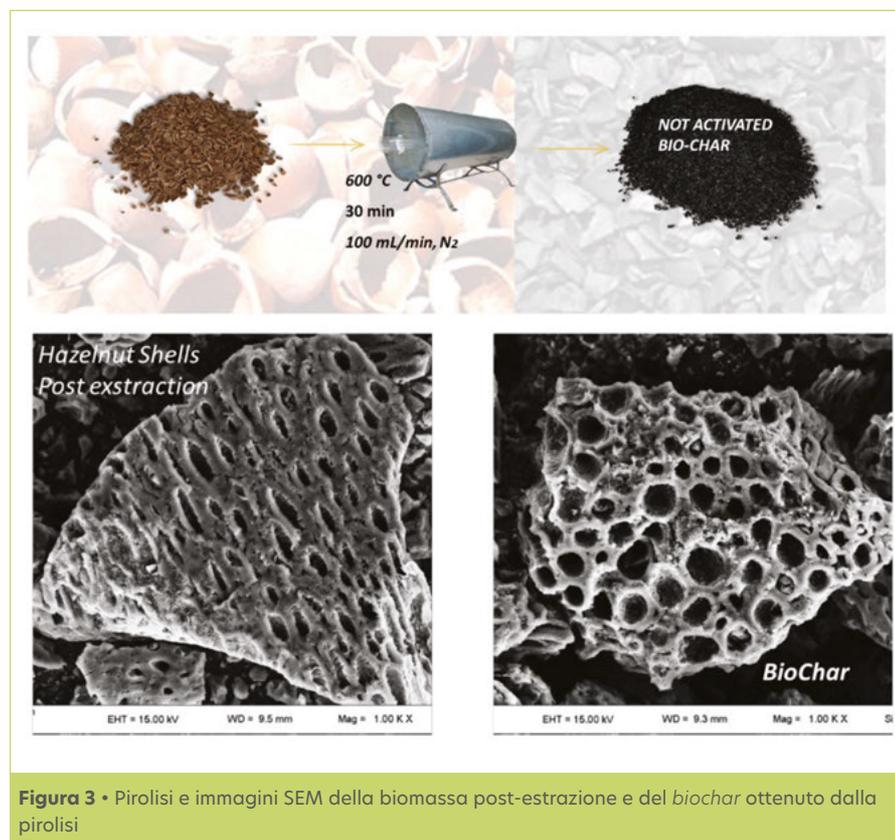


Figura 3 • Pirolisi e immagini SEM della biomassa post-estrazione e del *biochar* ottenuto dalla pirolisi

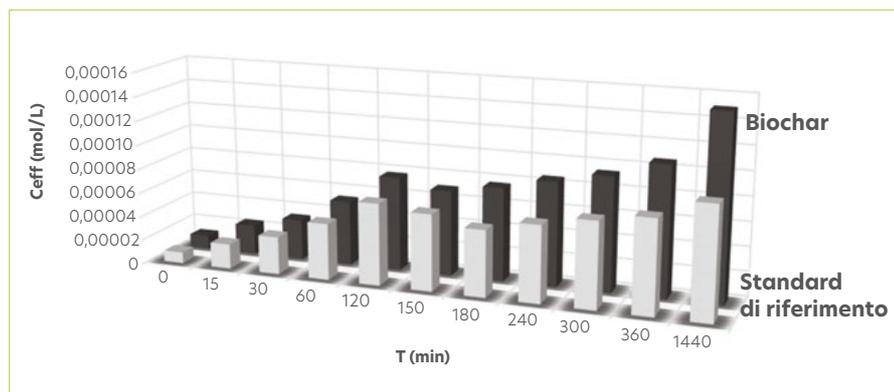


Figura 4 • Rilascio in vitro del campione preparato con il *biochar* e del campione ottenuto con carbone vegetale commerciale

to con il *biochar* derivato dai gusci di Nocciola, a confronto con quello di un altro prodotto di riferimento nel quale è stato utilizzato il carbone vegetale commerciale da Noce di cocco (i campioni sono stati preparati utilizzando lo stesso approccio e la stessa composizione percentuale degli ingredienti).

Come mostra il grafico di **Figura 4**, il *biochar* favorisce il rilascio degli attivi con un andamento che appare graduale e che alle 24 ore raggiunge la maggiore concentrazione di attivi in soluzione.

Il risultato sperimentale mostra la correlazione tra le proprietà del carbone, in particolare la texture porosa dello stesso. La texture

prevalentemente microporosa del carbone vegetale commerciale trattiene maggiormente gli attivi inibendone o rallentandone il rilascio. Il *biochar* non attivato con pori più eterogenei e più grandi favorisce, invece, il rilascio degli attivi assicurando tuttavia un rilascio graduale degli stessi. Lo studio riportato, pur essendo assolutamente preliminare, mostra la potenzialità dei gusci di Nocciola come materia prima in nutraceutica e costituisce, soprattutto, un esempio di approccio integrato e multidisciplinare per ottenere prodotti in grado di coniugare sostenibilità, innovazione ed efficacia attraverso la valorizzazione di risorse agrifood locali e del territorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT Statistics Division (www.fao.org/faostat/en/#data/QC).
2. Pérez-Armada L, Rivas S, González B et al (2019) Extraction of phenolic compounds from hazelnut shells by green processes. *J Food Eng*:1-8
3. Antmen ZF (2019) Exploitation of Peanut and Hazelnut Shells As Agricultural Industrial Wastes for Solid Biofuel Production. *Fresenius Environ Bull* 28(3):2340-2347
4. Dal O, Şengün D, Özşen AY (2020) Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from waste hazelnut shell. *Environ Res Technol* 3(3):135-146
5. Silva S, Ferreira M, Oliveira AS et al (2019) Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics. *Int J Cosmet Sci* 41(4):378-386
6. Naveed M, Hejazi V, Abbas M et al (2018) Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother* 97:67-74
7. Bridgwater T (2012) Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass Bioenerg* 38:68-94



34° salone internazionale
del biologico e del naturale

Naturalmente, Bio.



SANA
ORGANIC FOOD



SANA
CARE & BEAUTY



SANA
GREEN LIFESTYLE



SANA TECH



BolognaFiere
8 | 11
settembre
2022



CREOSTUDIOS

WWW.SANA.IT

SANA@BOLOGNAFIERE.IT

an event by



CON IL SUPPORTO DI:



IN COLLABORAZIONE CON:



Recupero dei by-products nella filiera della frutta secca

CRISTINA DANNA

Università degli Studi di Genova • cristina.danna@edu.unige.it

L'esigenza del recupero delle biomasse di scarto derivanti dalla filiera agricola apre nuove prospettive di studio di forte interesse applicativo e di innovazione. Un caso emblematico di by-products, sottoprodotti, è quello rappresentato dalle biomasse di scarto derivanti dall'attività di produzione e lavorazione della frutta secca. Dal Nord al Sud Italia sono molteplici le specie coltivate e inserite nel mercato nazionale e internazionale. In questo breve articolo verranno presentati alcuni esempi di coltivazioni di frutta secca, le quali rappresentano i capisaldi di produzione, dal potenziale ancora maggiore se sviluppate nell'ottica dell'economia circolare. I principali scarti della produzione e della lavorazione della frutta secca sono rappresentati dal legno di potatura, dai gusci legnosi e dai tegumenti; molteplici sono gli utilizzi innovativi offerti da questi scarti, oggetto di studio della comunità scientifica. L'uso efficace dei sottoprodotti agricoli è sicuramente una grande sfida nella gestione dei rifiuti e

la conversione di questi ultimi in risorse rappresenta un goal importante per la società moderna. I nuovi campi di studio riguardano sia la ricerca di nuovi materiali sia la ricerca relativa ai composti bioattivi recuperabili dagli scarti, obiettivo cardine per l'innovazione nei botanicals.

LE NOCI

La nocicoltura rappresenta un caposaldo della tradizione colturale italiana delle zone montane e collinari, diffusa solitamente dai 500 fino ai 1200 metri di altitudine.

Juglans regia L., il Noce, è un albero appartenente alla famiglia delle Juglandaceae, dalle origini asiatiche, nella regione dell'attuale Uzbekistan. Introdotto in Europa già in antichità dai Greci e diffuso poi in tutto l'Impero in età romana. Il nome *Juglans* (da *Iupiter* "Giove" e da *glans* "ghianda", "ghianda di Giove") testimonia l'importanza e



Figura 1 • Frutto di Noce e sue varie porzioni

le proprietà attribuite al frutto. In Italia sono 4 mila gli ettari dedicati alla nocicoltura, per una produzione di circa 12 mila tonnellate. Vista la forte richiesta interna, che si attesta intorno alle 50 mila tonnellate, importazioni di noci vedono a capo del mercato gli USA, il Cile, la Francia e la Germania; da queste, circa 6 mila tonnellate sono gli scarti derivanti dalla produzione di noci sgusciate. Gli usi tradizionalmente noti del Noce come pianta alimentare, medicinale, tintoria e di uso artigianale vengono oggi implementati da conoscenze e ricerche atte ad approssicare i bisogni e problemi della modernità. In quest'ottica si inserisce il discorso del recupero delle biomasse scartate in fase produttiva.

Da un punto di vista morfologico, il frutto di Noce è composto da quattro parti principali: il nocciolo (embrione), la buccia (tegumento), il guscio e il mallo (**Fig.1**).

Una review pubblicata recentemente (2020) da Ali Jahanban-Esfahlan (**1**) e collaboratori analizza la possibilità di un utilizzo del guscio del frutto come prezioso materiale vegetale bio-assorbente, impiegabile nella rimozione di materiali pericolosi. La porzione di guscio del frutto della noce è uno scarto agricolo lignocellulosico composto da cellulosa (17,74%), emicellulosa (36,06%) e lignina (36,90%). Negli ultimi anni il guscio di Noce è stato ampiamente studiato come bio-assorbente vegetale naturale e inerte. Vengono esplorate le potenziali applicazioni dei sottoprodotti derivati dai gusci di Noce per l'efficacia nella rimozione di vari materiali nocivi, tra cui metalli pesanti, sintetici, oli, ecc. Il materiale assorbente è stato in grado di assorbire dalle acque reflue 11 ioni di metalli pesanti: rame (Cu²⁺), cromo (Cr⁶⁺), arsenico (As³⁺), cadmio (Cd²⁺), piombo (Pb²⁺), cesio (Cs⁺), nichel (Ni²⁺), zinco (Zn²⁺), manganese (Mn²⁺), ferro (Fe²⁺) e mercurio (Hg²⁺). Questo agro-rifiuto ricco di cellulosa rappresenta anche il materiale adatto per lo sviluppo commerciale di packaging biodegradabile. Dingyuan Zheng e collaboratori (**2**) hanno utilizzato il guscio di Noce come materia prima per la produzione di cellulosa purificata. La tecnica di produzione prevede molteplici trattamenti, tra cui quelli alcalini e di sbiancamento.

La produzione di materiali cellulosici a partire da materiali di scarto si inserisce in una logica di economia circolare, e ancora una volta l'obiettivo è convertire le biomasse di scarto in risorse e beni preziosi e necessari.

Recentemente è stato oggetto di studi anche un'altra parte del frutto, il mallo verde di Noce. Vanessa Vieira (**3**) e collaboratori ne hanno studiato l'estratto idroalcolico come fonte di composti bioattivi, dalle proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e antibatteriche, volendo anche in questo caso valorizzare una biomassa generalmente scartata che potrebbe invece contribuire allo sviluppo di nuovi botanicals. Un ulteriore recente studio di Raffaele Romano e collaboratori (**4**), sempre relativo allo studio del mallo, si è focalizzato sull'estratto in CO₂ supercritica. Nonostante il costo elevato, dovuto alla complessità dei macchinari, questa estrazione consente un minor impatto ambientale, in quanto il solvente utilizzato non lascia tracce e può essere recuperato e riutilizzato per ulteriori estrazioni. Gli estratti sono stati caratterizzati in termini di contenuto totale di polifenoli, con attività antiossidante e antifungina. Il mallo verde di Noce rappresenta, dunque, un'importante fonte economica di composti bioattivi che ne suggeriscono l'utilizzo per i packaging attivi nell'industria alimentare.

LE NOCCIOLE

Corylus avellana L., il Nocciolo, è un albero appartenente alla famiglia delle Betulaceae. Originario dell'Asia minore, si trova ampiamente spontaneo e coltivato in Italia fino a un'altitudine di 1300 m. Il nome scientifico della specie deriva dal greco κόρυς (*córys*) "elmo", probabilmente a ricordo della forma della cupola, involucro fogliaceo che attornia il frutto; *avellana* è invece riferito alla città di Abella, nome latino di Avella Vecchia (Campania), anticamente rinomata per le nocciole. L'Italia è uno dei maggiori produttori a livello mondiale, secondo dopo la Turchia, con circa 86 mila ettari dedicati alla corilicoltura e una produzione di circa 110 mila tonnellate all'anno.



Figura 2 • Frutto di Nocciolo e sue varie porzioni

Ricordiamo per importanza la Nocciola di Giffoni Igp, la Nocciola delle Langhe Igp e la Nocciola romana Dop.

La valorizzazione dei sottoprodotti delle nocciole (**Fig.2**) dà un importante contributo per l'isolamento e la purificazione di molecole bioattive che possono essere utilizzate sia per scopi medicinali che industriali.

Recentemente, Sandra Cabo e collaboratori (**5**) hanno studiato le cupule delle nocciole come fonte di polifenoli antiossidanti. L'estratto dalle maggiori attività antiossidanti è quello in metanolo, tuttavia nello studio vengono riportate ulteriori modalità di estrazione meno impattanti dal punto di vista ambientale, quale ad esempio l'estrazione con acqua, presentata come un'alternativa affidabile e sicura.

Alessandro Di Michele e collaboratori (**6**) hanno invece studiato gli estratti dei gusci delle nocciole, isolando anche in questo caso agenti antiossidanti e antibatterici. L'acido gallico è risultato essere il composto fenolico più abbondante e a seguire l'acido clorogenico, rutina e acido protocatecuico.

Gli scarti delle nocciole sono inoltre utilizzabili come materia prima per l'industria della carta. A titolo esemplare, il progetto EcoPaper coordinato dalla Ferrero ha permesso di creare un packaging più sostenibile ed economico a partire dalle biomasse di scarto.

Si stima che dai residui produttivi, bucce delle fave di cacao e gusci e cuticole di nocciole, inseriti per il 10% nel prodotto finale, vengono prodotte 1,5 milioni di tonnellate di carta annui.

I PISTACCHI

Pistacia vera L., il Pistacchio, è un albero appartenente alla famiglia delle Anacardaceae. Originario dell'Asia minore, si è diffuso nel bacino del Mediterraneo in età greco-romana. *Pistacia*, dal greco πιστάκη (*pistáke*) "pistacchio", deriva dal vocabolo persiano *pistáh*, che significa "ricco di farina". La coltivazione e produzione del Pistacchio in Italia è principalmente diffusa in coltivazioni che non superano gli 800 m di altitudine in Sicilia nella varietà Bianca di Bronte, il famoso Pistacchio che gode denominazione di origine protetta (Dop) ed è un Presidio Slow Food. Si stima che la produzione italiana ammonti a circa 3400 tonnellate, mentre le importazioni siano di circa 10.000 tonnellate.

Anche il Pistacchio, come nei casi precedentemente citati per altra frutta secca, vede nella sua filiera di produzione e trasformazione diversi scarti, principalmente guscio legnoso e "buccia" (**Fig.3**).



Figura 3 • Frutto di Pistacchio e sue varie porzioni

Queste biomasse inutilizzate hanno attirato l'interesse scientifico nella ricerca di fonti alternative di composti bioattivi, aumentando il valore della produzione del Pistacchio. Un recente studio condotto da Antonella Smeriglio e collaboratori (7) ha dimostrato, mediante saggi *in vitro* e *in vivo*, gli effetti antiossidanti e inibitori della biosintesi della melanina di un estratto in metanolo di tegumenti di Pistacchio. I risultati suggeriscono che il tegumento di Pistacchio maturo può essere considerato come una promettente fonte di agenti antiossidanti e sbiancanti per lo sviluppo di nuovi prodotti utili nella prevenzione di disturbi della pigmentazione nell'uomo e/o per migliorare la qualità degli alimenti, aprendo nuove possibilità in campo nutraceutico e farmaceutico.

L'ulteriore lavoro di Nunzio Cardullo e collaboratori (8) riporta la valutazione dei gusci di Pistacchio, un sottoprodotto di scarso valore economico, come promettente fonte di polifenoli antiossidanti. Gli autori hanno proposto e ottimizzato una procedura di estrazione ecosostenibile con etanolo sotto irradiazione a microonde, e un metodo di frazionamento facilmente riproducibile e scalabile, adatto per applicazioni industriali. I risultati hanno evidenziato che la metodologia proposta può essere un modo efficace per recuperare i composti fenolici bioattivi dal guscio duro del Pistacchio, rendendo questo sottoprodotto una promettente fonte di composti con potenziali applicazioni nei settori alimentare e sanitario.

CONCLUSIONI

È importante comprendere appieno il valore dei sottoprodotti derivanti dalla filiera produttiva della frutta secca e determinare la fattibilità tecnica e i metodi da utilizzare nel riciclo. Il problema che molti operatori del settore devono affrontare è quello di trovare macchinari e metodi idonei alla lavorazione di tali sottoprodotti, in grado di garantire il recupero di importanti molecole e composti bioattivi ancora presenti. Fondamentale risulta quindi, nella logica dell'economia circolare relativa al

settore agricolo, inserire punti di raccolta dei sottoprodotti agricoli, connessi a sedi di lavorazione provviste dei macchinari adeguati, che alimentino nuovi cicli produttivi. Ancora una volta, da prodotti generalmente considerati di scarto può derivare un valore aggiunto. I riscontri positivi riguardano sia il mondo agricolo sia il mondo dell'impresa innovativa, attenta alla tutela dell'ambiente e delle sue risorse, e al benessere dei consumatori.

BIBLIOGRAFIA

1. Jahanban-Esfahlan A, Jahanban-Esfahlan R, Tabibiazar M et al (2020) Recent advances in the use of walnut (*Juglans regia* L.) shell as a valuable plant-based bio-sorbent for the removal of hazardous materials. *RSC Advances* 10(12):7026-7047
2. Zheng D, Zhang Y, Guo Y et al (2019) Isolation and Characterization of Nanocellulose with a Novel Shape from Walnut (*Juglans Regia* L.) Shell Agricultural Waste. *Polymers (Basel)* 11(7):1130
3. Vieira V, Pereira C, Abreu RMV et al (2020) Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L. green husks: A source of bioactive phytochemicals. *Food Chem Toxicol* 137:111189
4. Romano R, Aiello A, Meca G et al (2021) Recovery of bioactive compounds from walnut (*Juglans regia* L.) green husk by supercritical carbon dioxide extraction. *Int J Food Sci Technol* 56(9):4658-4668
5. Cabo S, Aires A, Carvalho R et al (2021) *Corylus avellana* L. Husks an Underutilized Waste but a Valuable Source of Polyphenols. *Waste and Biomass Valorization* 12:3629-3644
6. Di Michele A, Pagano C, Allegrini A et al (2021) Hazelnut Shells as Source of Active Ingredients: Extracts Preparation and Characterization. *Molecules* 26(21), doi:10.3390/molecules26216607
7. Smeriglio A, D'Angelo V, Denaro M et al (2021) The Hull of Ripe Pistachio Nuts (*Pistacia vera* L.) as a Source of New Promising Melanogenesis Inhibitors. *Plant Foods Hum Nutr* 76(1):111-117
8. Cardullo N, Leanza M, Muccilli V et al (2021) Valorization of Agricultural Food Waste from Pistachio Hard Shells: Extraction of Polyphenols as Natural Antioxidants. *Resources* 10(5), doi:10.3390/resources10050045

Il Protocollo di Nagoya e la *due diligence* dell'utilizzatore

Spunti operativi

VALENTINA VENEROSO

Avvocato • avv.veneroso@gmail.com

Il 12 ottobre 2014 è entrato in vigore il Protocollo di Nagoya sull'accesso alle risorse genetiche e l'equa condivisione dei benefici derivanti dal loro utilizzo, strumento internazionale adottato dalla Conferenza delle Parti della Convenzione sulla biodiversità biologica (CBD).

Nella stessa data è entrato in vigore il Regolamento (UE)¹ n.511/2014 (Regolamento ABS), atto normativo dell'Unione europea che dà attuazione, in modo uniforme in tutto il territorio europeo, alla parte del Protocollo dedicata al tema della c.d. *user compliance*².

Per effetto dell'entrata in vigore del Regolamento ABS, si può quindi dire che l'Italia sia già di fatto vincolata agli obblighi previsti dal Protocollo di Nagoya, sebbene non l'abbia ancora ratificato³ e quindi non ne sia ancora formalmente parte.

In altri termini, gli "utilizzatori" di risorse genetiche e conoscenze tradizionali associate aventi sede nel territorio italiano sono quindi soggetti agli obblighi prescritti dal Regolamento (UE) n.511/2014, a prescindere dallo stato della ratifica del Protocollo di Nagoya da parte dell'Italia.

Di seguito si propongono una sintesi delle prescrizioni del Regolamento ABS e alcuni spunti operativi per gestire consapevolmente ed efficacemente le relative attività di utilizzo.

I CONTENUTI DEL REGOLAMENTO ABS

Il nucleo del Regolamento ABS è costituito dal Capo II intitolato *User compliance* (nella traduzione italiana "Conformità da parte degli utilizzatori"), con un chiaro rimando alla parte del Protocollo di Nagoya che va a implementare.

Il Capo II, infatti, riunisce un insieme di articoli destinati a regolare le attività di ricerca e sviluppo sulla composizione genetica e/o biochimica di risorse genetiche⁴, con lo scopo di:

1. "evitare" che nell'Unione europea si utilizzino risorse genetiche o conoscenze tradizionali associate alle

¹ Il Regolamento è un atto legislativo europeo obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile negli ordinamenti degli Stati membri (art.288 comma 2 Trattato sul funzionamento dell'UE), non necessitando di alcun atto di recepimento da parte di questi ultimi

² La parte del Protocollo che disciplina quel complesso di regole che obbligano gli Stati parte ad adottare "misure" finalizzate a garantire che gli utilizzatori di risorse genetiche residenti nelle proprie giurisdizioni rispettino nelle loro attività le regole per l'accesso eventualmente stabilite dai Paesi fornitori interessati (ovvero siano in possesso di un'autorizzazione all'accesso, "PIC", e, ove richiesto, abbiano sottoscritto con lo specifico Paese un accordo, c.d. "MAT")

³ Insieme a pochi altri Paesi europei: Cipro, Irlanda, Lettonia, Lituania, Polonia e Slovenia

⁴ Questa, come si vedrà in seguito, è la definizione di "utilizzo", ai sensi dell'art.3 comma 1, n.5) del Regolamento ABS, che riprende letteralmente l'analoga definizione proposta dal Protocollo di Nagoya, all'art.2 comma 1 lett. c)

risorse genetiche, “il cui accesso non sia avvenuto conformemente alle disposizioni legislative o regolamentari nazionali in materia di ABS di una parte contraente del protocollo di Nagoya”;

2. “sostenere un’attuazione efficace degli impegni in materia di ripartizione dei benefici stabiliti nei termini reciprocamente concordati [N.d.R.: “MAT”] tra fornitori e utilizzatori”;
3. “migliorare le condizioni di certezza giuridica riguardo all’utilizzazione delle risorse genetiche e delle conoscenze tradizionali associate alle risorse genetiche⁵”.

Il Capo II dispone innanzitutto una serie di obblighi diretti agli “utilizzatori”, ovvero:

- obblighi di *due diligence* (art.4), ovvero di raccolta, conservazione e gestione dei documenti comprovanti l’utilizzo “legale” delle risorse genetiche (ed eventualmente delle conoscenze tradizionali associate);
- obblighi di “monitoraggio” (art.7), ovvero di trasmissione ad alcune autorità nominate *ad hoc* (c.d. “check-point”), in determinate fasi della ricerca e sviluppo, delle informazioni rilevanti dell’assolvimento degli obblighi di *due diligence*.

Il Capo II, inoltre, prevede alcune misure per agevolare l’assolvimento di tali obblighi, ovvero:

- a) l’istituzione presso la Commissione UE di un Registro europeo delle collezioni di risorse genetiche ritenute “affidabili” per gli scopi del Protocollo di Nagoya, ovvero che garantiscono che i campioni/le risorse genetiche ivi conservate sono stati acquisiti legalmente e sono gestiti con adeguati strumenti di tracciabilità e monitoraggio (art.5);
- b) un sistema di riconoscimento da parte della Commissione UE di *best practice* (procedure interne, strumenti

o meccanismi) in materia di ABS elaborate da associazioni di utilizzatori o altre parti interessate (art.8).

Infine, il Capo II contiene alcune disposizioni destinate agli Stati membri, ai quali viene richiesta l’attuazione delle seguenti misure finalizzate a rendere “pienamente operativo” il Regolamento⁶:

- a) la designazione di una o più Autorità competenti responsabili dell’applicazione del Regolamento ABS e di uno o più “check-point” incaricati del monitoraggio (art.6);
- b) l’implementazione di meccanismi di controllo “efficaci, proporzionati e dissuasivi” sull’osservanza degli obblighi ABS da parte degli utilizzatori (art.9);
- c) l’adozione di sanzioni “efficaci, proporzionate e dissuasive”, in caso di violazione degli obblighi di *due diligence* (art.4) e di monitoraggio (art.7).

Le disposizioni del Capo II del Regolamento ABS sono ulteriormente precisate in una normativa di dettaglio prevista dal Regolamento di esecuzione (n.2015/1866), entrato in vigore il 9 novembre 2015.

LA DUE DILIGENCE DELL’UTILIZZATORE

Nel disciplinare il tema dell’*user compliance*, quindi, il legislatore europeo ha optato per un sistema basato sulla *due diligence* di chi utilizza risorse genetiche e/o conoscenze tradizionali associate nella ricerca e sviluppo.

Il concetto di *due diligence*, mutuato dai sistemi anglosassoni di *common law*, è ormai divenuto familiare anche nell’ordinamento italiano (inizialmente in ambito finanziario e commerciale) e si riferisce generalmente a

⁵ Così si esprime il legislatore europeo nel Preambolo al Regolamento, Considerando n.9

⁶ Come anticipato nel numero 1/2021 di questa rivista (Veneroso V (2021) L’implementazione del Protocollo di Nagoya in Italia e le attività di ricerca e sviluppo: a che punto siamo? p.36), l’Italia ha attuato queste misure con Decreto Mattm (MITE) 1 aprile 2019, con cui sono state nominate le Autorità competenti ABS responsabili dell’applicazione del Regolamento e i check-point, e con D.lgs. n.153/2020 che dispone le sanzioni in caso di violazione degli obblighi regolamentari da parte degli utilizzatori

un processo organizzato di raccolta e di analisi di informazioni rilevanti, in ordine a una determinata attività o a un bene, con lo scopo di verificare la loro conformità al quadro normativo vigente e applicabile, e identificare i potenziali rischi della specifica operazione o investimento.

La *due diligence* richiede a chi la esercita ogni ragionevole sforzo per evitare, in questa attività di raccolta e analisi, inesattezze od omissioni.

Nel più specifico contesto del Regolamento ABS, l'esercizio della *due diligence* si traduce nell'obbligo di "accertarsi", attraverso una raccolta mirata e analitica di informazioni e documenti, che "l'accesso alle risorse genetiche e alle conoscenze tradizionali associate [...] sia avvenuto in conformità alle disposizioni legislative e regolamentari applicabili in materia di ABS stabilite dal Paese fornitore⁷" (art. 4 comma 1 Regolamento ABS).

In altri termini, il "rischio" che l'utilizzatore è chiamato a prevenire attraverso l'esercizio della *due diligence* è rappresentato dalla potenziale violazione delle norme in materia di accesso del Paese fornitore di risorse genetiche e/o conoscenze tradizionali. Al fine di evitare tale rischio, il soggetto obbligato deve assicurarsi che le risorse genetiche e/o conoscenze tradizionali associate coinvolte nella propria attività di ricerca e sviluppo siano utilizzate sulla base di un'autorizzazione all'accesso (*Prior Informed Consent* o PIC) e di un accordo per la ripartizione degli eventuali benefici (*Mutually Agreed Terms* o MAT) con il Paese fornitore, laddove richiesti da quest'ultimo.

L'articolo 4 del Regolamento ABS, quindi, traduce gli obblighi di *due diligence* nelle seguenti specifiche attività (comma 3):

a) reperire il c.d. "certificato di conformità riconosciuto a livello internazionale" o, se questo non è disponi-

bile, ogni altra informazione o documentazione comprovante il luogo di provenienza della risorsa, la data di accesso, la sua descrizione, la fonte dalla quale la stessa è stata ottenuta, la presenza di permessi per l'accesso (*Prior Informed Consent* o PIC) e di termini reciprocamente concordati, comprensivi di disposizioni l'eventuale condivisione di benefici (*Mutually agreed terms* o MAT), nonché di utilizzatori successivi;

b) conservare tali informazioni per 20 anni "a decorrere dalla fine del periodo di utilizzazione" (comma 6);

c) trasferirle agli utilizzatori successivi;

d) di attivarsi, nei casi in cui le informazioni possedute non risultino "sufficienti o persistano incertezze circa la legalità dell'accesso e dell'utilizzazione", per rimediare a tali carenze, ottenendo il relativo PIC (o documento equivalente) e stipulando il MAT (comma 5);

e) di interrompere l'utilizzo, nei casi in cui non sia possibile rimediare all'insufficienza o all'incertezza delle informazioni possedute (comma 5).

Il Regolamento prevede alcune deroghe in materia di *due diligence* quando l'utilizzo riguardi risorse genetiche per le quali sia stato accertato che sono o possono essere "la causa patogena di un'emergenza sanitaria attuale o imminente di portata internazionale" o "di una grave minaccia per la salute a carattere transfrontaliero" (art.4 comma 8), prevedendo termini più elastici per l'assolvimento dei relativi obblighi.

Lo stesso articolo 4, al comma 4, contempla un'ulteriore deroga per l'utilizzo di risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura non contenute nell'Allegato I dell'omonimo Trattato FAO (ITPGRFA), solo nel caso in cui il Paese fornitore abbia espressamente stabilito che anche queste ultime siano soggette ai termini e alle con-

⁷ Il modello di *due diligence* del Regolamento ha dei precedenti nella legislazione europea in materia di utilizzazione di risorse naturali: si veda, ad esempio, il Regolamento UE n.995/2010 (Regolamento EUTR, finalizzato a contrastare l'immissione nel mercato europeo di legname, e derivati, di provenienza illegale e tagliato abusivamente) e il Regolamento (CE) n.2368/2002 (che istituisce un sistema comunitario di certificazione e di controlli all'importazione e all'esportazione di diamanti grezzi ai fini dell'attuazione del c.d. "sistema di certificazione del processo Kimberley"). Un ulteriore precedente interessante, già conosciuto a livello internazionale, per la *due diligence* nell'approvvigionamento e nell'utilizzo di risorse naturali riguarda il commercio e l'importazione di minerali provenienti da zone di conflitto e ad alto rischio (*OECD Due Diligence Guidance for Responsible Supply Chains of Minerals from Conflict-Affected and High-Risk Areas*)

dizioni dell'accordo standard sul trasferimento di materiale (SMTA) per i fini specificati nell'ITPGRFA⁸.

La verifica sul compiuto assolvimento di tali obblighi è assicurata attraverso le attività di monitoraggio (art.7) e controllo (art.9) da parte delle Autorità competenti designate dagli stessi Stati membri.

Il "monitoraggio" è disciplinato da una normativa di dettaglio negli articoli 5, 6 e 7 e negli Allegati II e III del Regolamento di esecuzione (UE) 2015/1866.

In base a questo complesso di regole, gli utilizzatori sono obbligati a presentare, in alcuni specifici momenti dell'attività di ricerca e sviluppo, alle autorità competenti (i c.d. check-point), una "dichiarazione", con la quale devono dimostrare di ottemperare e/o di avere ottemperato agli obblighi di *due diligence* (d'ora innanzi "dichiarazione di *due diligence*").

Il meccanismo europeo di monitoraggio si articola su due livelli, che corrispondono alla suddivisione ideale in due fasi dell'intera "catena di valore" delle attività di ricerca e sviluppo nei vari settori interessati dall'ABS.

In un primo segmento della filiera, che riguarda l'attività di ricerca di base (fase *upstream*), gli utilizzatori "beneficiari di finanziamenti alla ricerca che implica l'utilizzazione di risorse genetiche e di conoscenze tradizionali associate" sono obbligati a presentare la dichiarazione di *due diligence*, su richiesta dello Stato membro o della Commissione europea, al check-point all'uso designato. Nella fase dell'utilizzo orientata allo sviluppo (fase *downstream*), invece, il monitoraggio degli obblighi di *due diligence* si colloca temporalmente nella c.d. "fase finale dello sviluppo di un prodotto". L'art.6, par.2 Regolamento di esecuzione (UE) 2015/1866, in particolare, obbliga l'utilizzatore a presentare la dichiarazione di *due diligence* al verificarsi del primo tra i seguenti eventi:

"a) l'approvazione o l'autorizzazione all'immissione sul mercato è richiesta per un prodotto sviluppato me-

dante l'utilizzo di risorse genetiche e di conoscenze tradizionali associate alle risorse genetiche;

- b) una comunicazione richiesta prima dell'immissione per la prima volta sul mercato dell'Unione è effettuata per un prodotto sviluppato mediante l'utilizzo di risorse genetiche e di conoscenze tradizionali associate alle risorse genetiche;
- c) l'immissione per la prima volta sul mercato dell'Unione di un prodotto sviluppato mediante l'utilizzo di risorse genetiche e di conoscenze tradizionali associate alle risorse genetiche, per cui non sono necessarie approvazioni, autorizzazioni o comunicazione per l'immissione sul mercato;
- d) il risultato dell'utilizzo è venduto o trasferito in qualsiasi altro modo a una persona fisica o giuridica all'interno dell'Unione per consentire a tale persona di svolgere una delle attività di cui alle lettere a), b) e c)".

IL PRIMO OBBLIGO DI DUE DILIGENCE: VERIFICARE L'AMBITO DI APPLICAZIONE DEL REGOLAMENTO ABS

Nella pratica, l'esercizio della *due diligence* presuppone l'assolvimento di un primo implicito obbligo regolamentare, ovvero di verificare se la specifica attività di "utilizzo" di una risorsa genetica (e/o conoscenza tradizionale associata) di interesse rientri nel campo di applicazione del Regolamento ABS, ovvero ne sia esclusa.

Questo compito presuppone l'acquisizione di un metodo di lavoro che non può prescindere da un esercizio di "interpretazione normativa", che altro non è che è una tecnica per determinare il significato e la portata delle proposizioni prescrittive contenute in un testo legislativo⁹.

⁸ Resta quindi inteso che, salvo che il Paese fornitore non abbia previsto diversamente nelle proprie misure per l'accesso l'utilizzo di risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura non contenute nell'Allegato I dell'omonimo Trattato FAO (ITPGRFA), è assoggettato agli obblighi del Protocollo di Nagoya e del Regolamento ABS

⁹ Pizzorusso A (2011) Le fonti del diritto, 2^a Ed. In: Commentario del codice civile Scialoja e Giuseppe Branca. Bologna-Roma, p.253

Questa attività interpretativa, di natura tipicamente legale, può essere svolta con il supporto esterno di un professionista *ad hoc*, ma può essere gestita anche internamente all'Ente coinvolto, adottando una procedura che ne faciliti l'esercizio e che comporti almeno quattro temi di indagine. È innanzitutto fondamentale verificare se la specifica risorsa genetica di interesse sia una risorsa genetica coperta, sotto il profilo "oggettivo" o "materiale", dal Regolamento ABS (e del Protocollo di Nagoya) o, ad esempio, da altri accordi e strumenti internazionali specifici, riconosciuti dalla comunità internazionale come alternativi al Protocollo di Nagoya, in quanto coerenti e non in contrasto con gli obiettivi del trattato e della Convenzione sulla Diversità Biologica¹⁰.

Una volta accertato che la risorsa genetica di interesse sia coperta dal Regolamento ABS e dal protocollo di Nagoya, occorrerà indagare il profilo "soggettivo" della propria condizione di utilizzatore, verificando se l'attività che riguarda la risorsa genetica (e/o conoscenza tradizionale associata) costituisca (o meno) un "utilizzo" secondo la definizione data dal Regolamento ABS (e del Protocollo di Nagoya).

Ogni provvedimento normativo, inoltre, ha un'efficacia

limitata temporalmente che ne impedisce, normalmente, applicazioni retroattive rispetto alla sua entrata in vigore. In questo caso il Regolamento ABS (art.1 comma 1) prevede espressamente che la sua applicazione è limitata "alle risorse genetiche [...] alle conoscenze tradizionali associate alle risorse genetiche alle quali è dato accesso dopo l'entrata in vigore del protocollo di Nagoya nell'Unione" (ovvero il 12 ottobre 2014).

Il campo di applicazione del Regolamento ABS, infine, è limitato anche sotto il profilo "geografico", applicandosi solo alle risorse genetiche (e/o conoscenze tradizionali associate) di un Paese che sia parte del Protocollo di Nagoya e che abbia adottato misure cogenti per l'accesso. Per agevolare l'acquisizione dei dati necessari, il protocollo di Nagoya ha istituito una piattaforma virtuale, denominata *ABS Clearing House*¹¹, di facile consultazione e ricca di informazioni. Per agevolare l'esercizio della *due diligence* nella pratica operativa, la Commissione UE ha pubblicato il 12 gennaio 2021 il Documento di orientamento C(2020)8759 sull'ambito di applicazione e sui principali obblighi del Regolamento (UE) n.511/2014 (Linee Guida ABS)¹², che oggi rappresenta uno strumento imprescindibile per la gestione di questa materia¹³.

¹⁰ Rientrano in questa ipotesi:

- il Trattato internazionale FAO sulle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura (ITPGRFA);
- il Programma quadro PIP ("Pandemic Influenza Preparedness Framework") adottato dall'Assemblea dell'OMS il 24 maggio 2011 sui virus influenzali con un potenziale di pandemia umana

¹¹ absch.cbd.int/en

¹² Il Documento è il risultato di un lungo lavoro di discussione e confronto tra i rappresentanti degli Stati membri nominati in seno al c.d. ABS Expert Group, operativo dal 2014 presso la Commissione europea; le varie bozze sono state altresì sottoposte all'esame dei portatori di interesse nominati presso il c.d. ABS Consultation Forum, operativo dal 2016. Il Documento da un lato aggiorna e sostituisce le precedenti Linee Guida adottate nel 2016 sul medesimo argomento; dall'altro le integra con un importante e corposo allegato (Annex II) sul concetto di "utilizzo", nelle sue varie sfaccettature sulla base del "settore" di riferimento e della fase della lunga catena di valore dei processi di ricerca e sviluppo.

¹³ Tutti i testi normativi sono reperibili sul sito della Commissione europea: ec.europa.eu/environment/nature/biodiversity/international/abs/legislation_en.htm

Il DNA metabarcoding per la filiera di tè, tisane e infusi

Un approccio multi-marker per il controllo e la sicurezza di prodotti vegetali miscelati

JESSICA FRIGERIO, VALERIO MEZZASALMA, PAOLA RE

FEM2-Ambiente, Milano • valerio.mezzasalma@fem2ambiente.com

Le proprietà terapeutiche delle erbe officinali sono note all'uomo fin dall'antichità. Oggi i benefici derivati dal consumo di queste piante sono frequentemente ricercati attraverso l'assunzione di integratori, infusi e tisane.

Al crescente consumo di questi prodotti si accompagna, tuttavia, la necessità di effettuare controlli sempre più rigorosi e capaci di garantire la qualità (1,2). Problemi di adulterazione, sostituzione e contaminazione dovuti a un mercato in crescita, una filiera complessa e approvvigionamenti globali potrebbero avere, infatti, riscontri negativi sulla salute dei consumatori o diminuire la concentrazione di metaboliti bioattivi all'interno del prodotto finito, riducendone l'efficacia, con conseguenti danni economici e di immagine per le aziende produttrici (3,4). Il mondo della ricerca scientifica da anni si impegna a sviluppare sistemi analitico-diagnostici a servizio delle filiere produttive, con l'obiettivo di controllarne e validarne la qualità e la sicurezza. Nell'ultimo decennio, a fianco delle analisi chimiche, l'utilizzo delle analisi di biologia molecolare per l'autenticazione dei prodotti è drasticamente aumentato (5,6). In questo contesto, l'analisi del DNA barcoding è diventata sempre più importante e utilizzata (7). Sebbene l'autenticazione mediante DNA barcoding sia uno strumento standardizzato e robusto quando utilizzato per identificare singole specie (8-10), la caratterizzazione di miscele e prodotti trasformati e complessi è ancora una sfida. Il DNA potrebbe subire processi di degradazione dovuti a trattamenti industriali e, di conseguenza, in mol-

ti prodotti trasformati, il DNA potrebbe essere altamente degradato e frammentato (11). Inoltre, la tecnica del DNA barcoding permette la lettura della sequenza del DNA di una sola specie alla volta, rendendo complessa l'analisi di miscele e prodotti multi-specie. Per analizzare queste matrici complesse, l'approccio del DNA barcoding è stato combinato con tecnologie di sequenziamento del DNA ad alta processività (*High-Throughput Sequencing*, HTS) che offrono l'opportunità di sequenziare simultaneamente più ampliconi di DNA (DNA metabarcoding) (12). Tuttavia, il DNA metabarcoding presenta ancora alcune limitazioni, come ad esempio bias di amplificazione, soprattutto quando il DNA è a bassa concentrazione, e difficoltà a quantificare gli ingredienti (13,14).

LO STUDIO

L'obiettivo principale di questo studio (15) è stato quello di verificare la fattibilità di utilizzare il DNA metabarcoding come strumento universale per identificare tutte le specie vegetali che compongono un prodotto. Per fare ciò sono state analizzate con la tecnica del DNA metabarcoding quindici tisane commerciali (Tab.1) acquistate da cinque diverse aziende, indagando due regioni tipiche del DNA barcoding: l'ITS2, marcatore nucleare, e per la prima volta (nel contesto del DNA metabarcoding) il marcatore plastidiale *psbA-trnH*.

Tabella 1 • Elenco dei campioni commerciali

ID LAB	Azienda	Tipologia di campione
HT_001	Azienda 1	Tisana purificante
HT_002	Azienda 1	Tisana digestiva
HT_003	Azienda 1	Tisana dimagrante
HT_004	Azienda 2	Tisana lassativa
HT_005	Azienda 2	Tisana aromatica
HT_006	Azienda 2	Tisana purificante
HT_007	Azienda 3	Tisana aromatica
HT_008	Azienda 3	Tisana aromatica
HT_009	Azienda 3	Tisana depurativa
HT_010	Azienda 4	Tisana rilassante
HT_011	Azienda 4	Tisana digestiva
HT_012	Azienda 4	Tisana pancia piatta
HT_013	Azienda 5	Tisana lassativa
HT_014	Azienda 5	Tisana del sonno
HT_015	Azienda 5	Tisana drenante

Inoltre, al fine di valutare la capacità del DNA metabarcoding di quantificare gli ingredienti nei prodotti erboristici, sono state create in laboratorio sei miscele di piante in proporzioni diverse (**Tab.2**), sia partendo dalla pianta (biomassa: QB) che dal DNA genomico (QG). Per creare queste miscele sono state scelte delle specie comunemente commercializzate nel campo dei botanicals e utilizzate per tisane e integratori alimentari: *Althaea officinalis* (radici), *Arnica montana* (fiori), *Ilex paraguariensis* (foglie), *Paullinia cupana* (semi) e *Solidago virgaurea* (parti aeree). I pesi e le proporzioni scelti sono coerenti con la normale formulazione delle tisane, anche in correlazione

Tabella 2 • Composizione espressa in percentuale delle miscele create in laboratorio

Specie	Sezione della pianta	QB_016	QB_017	QB_018	QG_019	QG_020	QG_021
<i>Althaea officinalis</i>	Radici	20%	6%	35%	20%	6%	35%
<i>Arnica montana</i>	Fiori	20%	6%	6%	20%	6%	6%
<i>Ilex paraguariensis</i>	Foglie	20%	75%	20%	20%	75%	20%
<i>Paullinia cupana</i>	Semi	20%	6%	30%	20%	6%	30%
<i>Solidago virgaurea</i>	Parti aeree	20%	6%	9%	20%	6%	9%

con possibili contaminanti (**Tab.2**). I campioni sono stati quindi analizzati attraverso la metodica del DNA metabarcoding.

IL DNA METABARCODING PER IL CONTROLLO DEI PRODOTTI A BASE DI ERBE MISCELATE

L'output del sequenziamento HTS, che consiste in milioni di sequenze di DNA, è stato analizzato mediante complesse analisi bioinformatiche. In **Figura 1** è possibile vedere i risultati per i marcatori ITS2 e *psbA-trnH* (**Fig.2**). Ogni colonna corrisponde a un campione e ogni colore corrisponde al taxon assegnato. L'ampiezza delle bande è indicativa dell'abbondanza relativa (un valore espresso in percentuale) della specie.

In media, nei prodotti analizzati è stato identificato il 70% degli ingredienti dichiarati (**Tab.3**). Per alcuni prodotti appartenenti alle stesse aziende (**Tab.1**) è stato possibile identificare una maggior percentuale di ingredienti dichiarati (es. azienda 5, n=100%) rispetto ad altri (es. azienda 3, n=44%), come si può vedere nella **Figura 3**. Nel complesso, i risultati del DNA metabarcoding hanno consentito di rilevare la specie dichiarata nella maggior parte dei casi.

In tutti i campioni, ad eccezione di HT_013, sono state rilevate specie non dichiarate. Ad esempio, nel campione HT_001 è stata riscontrata un'alta percentuale (17%) di *Pimpinella anisum*, pianta tipicamente utilizzata nelle tisane ma non dichiarata in etichetta. Tuttavia, la stessa specie è stata

dichiarata sull'etichetta (e ne è stata riscontrata la presenza grazie all'analisi) del campione HT_002 proveniente dalla stessa azienda del cam-

Tabella 3 • Percentuale delle specie identificate con i due marcatori rispetto alla composizione originale delle miscele

ID LAB	Specie dichiarate	Specie assegnate (psbA-trnH)	Specie assegnate (ITS2)
HT_001	<i>Agropyron Repens</i> Beauv. 20%, <i>Taraxacum officinale</i> Weber 20%, <i>Arctium lappa</i> L. 15%, <i>Cichorium intybus</i> L. 15%, <i>Melissa officinalis</i> L. 15%, <i>Cynara scolymus</i> L. 15%	<i>Melissa officinalis</i> 52%, <i>Arctium lappa</i> 46%, <i>Reichardia ligulata</i> 2%	<i>Melissa officinalis</i> 51%, <i>Pimpinella anisum</i> 17%, <i>Althaea officinalis</i> 10%, <i>Arctium lappa</i> 8%, <i>Helminthotheca echioides</i> 5%, <i>Arctium tomentosum</i> 2%, <i>Cynodon dactylon</i> 3%, <i>Taraxacum officinale</i> 3%
HT_002	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. 20%, <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. 20%, <i>Pimpinella anisum</i> L. 20%, <i>Mentha piperita</i> L. 20%, <i>Citrus sinensis</i> L. var. <i>dulcis</i> 15%, <i>Matricaria chamomilla</i> L. 5%	<i>Glycyrrhiza</i> sp. 69%, <i>Mentha</i> sp. 26%, <i>Matricaria chamomilla</i> 4%, <i>Aloysia citrodora</i> 1%	<i>Foeniculum vulgare</i> 54%, <i>Pimpinella anisum</i> 37%, <i>Glycyrrhiza glabra</i> 7%, <i>Matricaria chamomilla</i> 2%
HT_003	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze 20%, <i>Prunus Cerasus</i> L. 20%, <i>Citrus limon</i> Burm. F. 20%, <i>Betula pendula</i> Roth 15%, <i>Agropyron Repens</i> Beauv. 15%, <i>Vitis vinifera</i> L. 10%	<i>Betula</i> sp. 49%, <i>Camellia sinensis</i> 30%, <i>Vitis vinifera</i> 21%	<i>Betula</i> sp. 90%, <i>Camellia sinensis</i> 2%, <i>Che-nopodium album</i> 1%, <i>Cynodon dactylon</i> 2%, <i>Filipendula ulmaria</i> 3%, <i>Polyspora axillaris</i> 1%, <i>Tilia platyphyllos</i> 1%
HT_004	<i>Senna alexandrina</i> 40%, <i>Rhamnus frangula</i> 20%, <i>Matricaria chamomilla</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Senna alexandrina</i> 97%, <i>Rhamnus frangula</i> 1%, <i>Matricaria chamomilla</i> 2%	<i>Foeniculum vulgare</i> 52%, <i>Matricaria chamomilla</i> 21%, <i>Senna alexandrina</i> 23%, <i>Capsella bursa-pastoris</i> 2%, <i>Chrozophora tinctoria</i> 2%
HT_005	<i>Echinacea angustifolia</i> 30%, <i>Citrus x limon</i> , <i>Althaea officinalis</i> , <i>Rosa canina</i> , <i>Hibiscus sabdariffa</i> , <i>Sambucus nigra</i> 10%	<i>Echinacea angustifolia</i> 94%, <i>Monstera deliciosa</i> 4%, <i>Portulaca oleracea</i> 1%, <i>Rumex obtusifolius</i> 1%	<i>Althaea officinalis</i> 74%, <i>Echinacea angustifolia</i> 26%
HT_006	<i>Urtica dioica</i> 30%, <i>Arctium lappa</i> L. 20%, <i>Taraxacum officinale</i> Weber, <i>Citrus x limon</i> , <i>Malva officinalis</i>	<i>Arctium lappa</i> 62%, <i>Senna alexandrina</i> 24%, <i>Galium</i> sp. 4%, <i>Lathyrus pratensis</i> 2%, <i>Mentha</i> sp. 4%, <i>Rumex obtusifolius</i> 4%	<i>Urtica dioica</i> 43%, <i>Malva</i> sp. 35%, <i>Taraxacum officinale</i> 19%, <i>Foeniculum vulgare</i> 2%, <i>Matricaria chamomilla</i> 1%
HT_007	<i>Camellia sinensis</i> (L.) 51%, <i>Mentha</i> 29%, <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. 8,25%, <i>Mentha piperita</i> 3,9%, <i>Aloe vera</i>	<i>Mentha</i> sp. 74%, <i>Camellia sinensis</i> 17%, <i>Glycyrrhiza</i> sp. 9%	<i>Glycyrrhiza glabra</i> 84%, <i>Amaranthus viridis</i> 2%, <i>Camellia sinensis</i> 5%, <i>Convolvulus arvensis</i> 5%, <i>Ipomoea</i> sp. 1%, <i>Morus alba</i> 2%, <i>Polyspora axillaris</i> 1%
HT_008	<i>Camellia sinensis</i> (L.) 62,9%, <i>Zingiber officinalis</i> 22%, <i>Peach</i> 1%, <i>Ginseng</i> 1%, <i>Aloe vera</i>	<i>Camellia sinensis</i> 100%	<i>Camellia sinensis</i> 30%, <i>Zingiber officinale</i> 23%, <i>Eleutherococcus senticosus</i> 1%, <i>Ocimum</i> sp. 25%, <i>Polyspora</i> sp. 10%, <i>Ipomoea</i> sp. 7%, <i>Achyranthes aspera</i> 1%, <i>Erechtites hieraciifolius</i> 1%, <i>Setaria palmifolia</i> 1%
HT_009	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe, <i>Citrus limon</i> L., <i>Malva sylvestris</i> L., <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf, <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. 100%	<i>Malva sylvestris</i> 94%, <i>Glycyrrhiza glabra</i> 3%, <i>Ocimum</i> sp. 2%, <i>Zingiber officinale</i> 1%
HT_010	<i>Matricaria chamomilla</i> L. 44,4%, <i>Melissa officinalis</i> L. 22,2%, <i>Betula pendula</i> Roth./ <i>pubescens</i> Ehrh, <i>Passiflora incarnata</i> L., <i>Lavandula officinalis</i> chaix var 5,6%	<i>Matricaria chamomilla</i> 51%, <i>Lavandula</i> sp. 14%, <i>Melilotus albus</i> 11%, <i>Melissa officinalis</i> 6%, <i>Passiflora</i> sp. 16%, <i>Raphanus sativus</i> 2%	<i>Matricaria chamomilla</i> 93%, <i>Melilotus officinalis</i> 1%, <i>Melissa officinalis</i> 2%, <i>Passiflora incarnata</i> 1%, <i>Raphanus sativus</i> 3%
HT_011	<i>Illicium verum</i> - frutto 27%, <i>Mentha piperita</i> 25%, <i>Melissa officinalis</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Lavandula officinalis</i> , <i>Cinchona officinalis</i> , <i>Gentiana lutea</i> 2%	<i>Glycyrrhiza glabra</i> 60%, <i>Lavandula</i> sp. 25%, <i>Mentha</i> sp. 7%, <i>Illicium verum</i> 7%, <i>Melissa officinalis</i> 1%	<i>Glycyrrhiza glabra</i> 90%, <i>Melissa officinalis</i> 8%, <i>Lavandula</i> sp. 2%
HT_012	<i>Foeniculum vulgare</i> 40%, <i>Illicium verum</i> 40%, <i>Carum carvi</i> , <i>Mentha piperita</i> 9%.	<i>Mentha</i> sp. 41%, <i>Eschscholzia californica</i> 20%, <i>Melilotus albus</i> 21%, <i>Melissa officinalis</i> 18%,	<i>Foeniculum vulgare</i> 73%, <i>Carum carvi</i> 27%
HT_013	<i>Senna alexandrina</i> 40%; <i>Rhamnus frangula</i> 15%; <i>Matricaria chamomilla</i> L. 15%; <i>Foeniculum vulgare</i> 15%; <i>Malva officinalis</i> 15%	<i>Senna alexandrina</i> 98%, <i>Rhamnus frangula</i> 1%, <i>Matricaria chamomilla</i> 1%.	<i>Foeniculum vulgare</i> 38%, <i>Malva</i> sp. 34%, <i>Matricaria chamomilla</i> 16%, <i>Senna alexandrina</i> 12%
HT_014	<i>Passiflora incarnata</i> L., <i>Escholtzia californica</i> Cham., <i>Matricaria chamomilla</i> L., <i>Tilia platyphyllos</i> Scop., <i>Ocimum basilicum</i> L.	<i>Eschscholzia californica</i> 53%, <i>Passiflora incarnata</i> 30%, <i>Matricaria chamomilla</i> 4%, <i>Ocimum basilicum</i> 13%	<i>Matricaria chamomilla</i> 83%, <i>Passiflora incarnata</i> 7%, <i>Panicum miliaceum</i> 2%, <i>Papaver rhoeas</i> 1%, <i>Tilia</i> sp. 4%, <i>Vicia villosa</i> 1%, <i>Capsella bursa-pastoris</i> 2%
HT_015	<i>Camellia sinensis</i> K., <i>Filipendula ulmaria</i> Max, <i>Foeniculum vulgare</i> Mill, <i>Mentha spicata</i> L.	<i>Mentha</i> sp. 69%, <i>Portulaca oleracea</i> 17%, <i>Camellia sinensis</i> 12%, <i>Eschscholzia californica</i> 2%	<i>Filipendula ulmaria</i> 50%, <i>Foeniculum vulgare</i> 47%, <i>Digitaria ciliaris</i> 2%

pione HT_001. Questo risultato fa pensare a una cross-contaminazione involontaria lungo la linea di produzione. Inoltre, nel campione HT_012 è stata trovata un'alta percentuale (21%) di una specie comunemente usata per i prodotti botanici, *Melilotus officinalis*.

Molti dei contaminanti rilevati sono unici di quel prodotto, per cui si può dedurre che si sia verificata una con-

taminazione lungo la filiera dell'azienda produttrice ed escludere contaminazioni di laboratorio. Per questo motivo, l'analisi del DNA metabarcoding può essere un metodo per il controllo non solo delle materie prime ma anche di eventuali contaminazioni di processo, che possono diventare un problema di qualità ma anche di sicurezza alimentare.

UN APPROCCIO MULTIMARCATORE PER IDENTIFICARE LA SPECIE PIÙ EFFICIENTEMENTE

È ormai ben documentato che nelle piante nessuna singola regione del DNA fornisce livelli adeguati per la discriminazione delle specie. Il CBOL Plant Working Group (2009) suggerisce di utilizzare marcatori del DNA plastidiale, i due geni *rbcL* e *matK* (16), spesso insieme al DNA ribosomiale nucleare (ITS2) (17-19) o allo spaziatore intergenico plastidiale *psbA-trnH* (20). Per questo motivo, in questo studio è stato adottato un approccio multimarcatore per l'identificazione della composizione delle tisane.

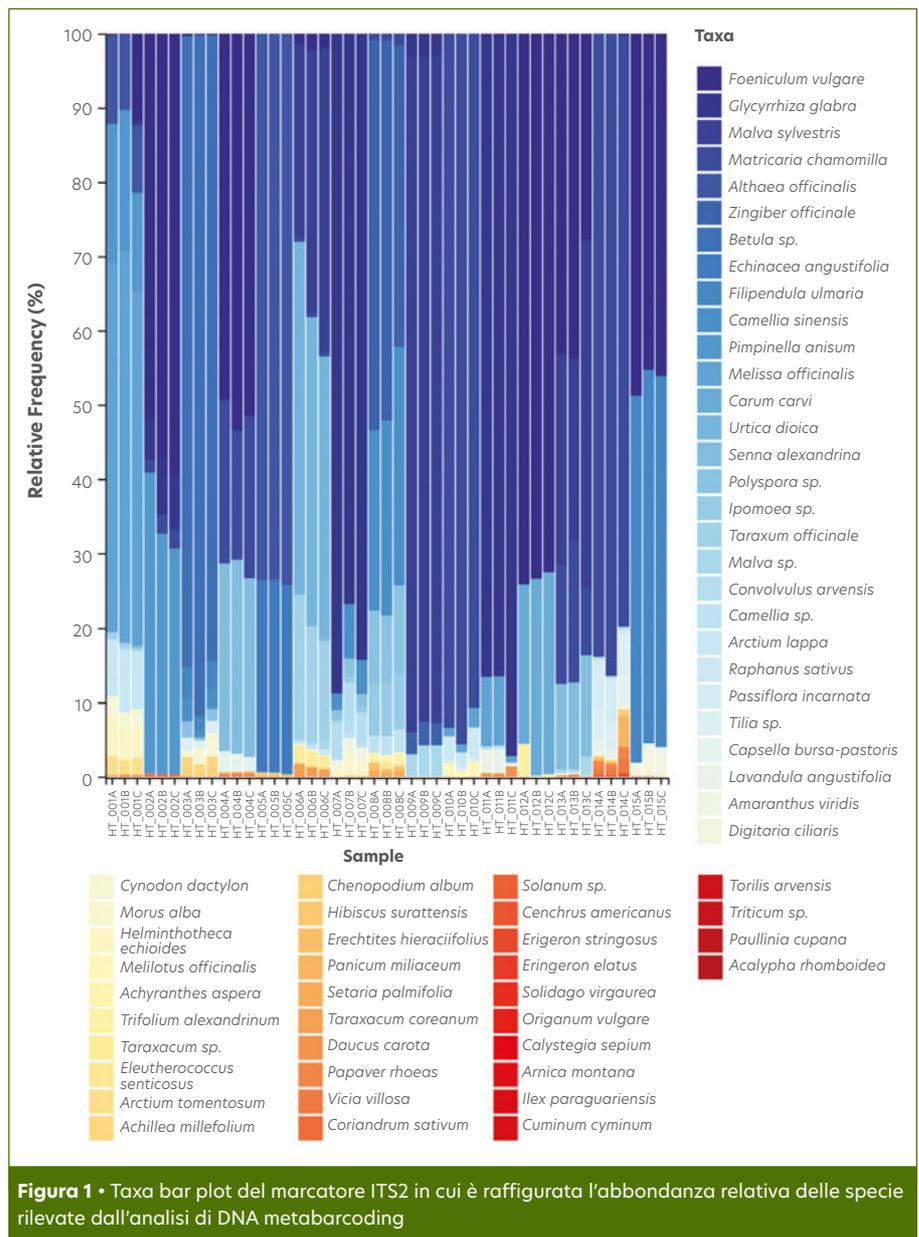
Il marcatore ITS2 sembra identificare più specie (n=60) rispetto al *psbA-trnH* (n=35), con un tasso di identificazione degli ingredienti del 52% per ITS2 rispetto al 45% per *psbA-trnH*. Tuttavia, l'utilizzo di entrambi i marcatori ha permesso di raddoppiare la capacità di identificazione e assegnazione delle specie, arrivando per alcuni campioni (HT_013-HT_015) al 100% di identificazione delle specie dichiarate in etichetta (Fig.3).

Solo 12 specie dichiarate in etichetta sono state identificate da entrambi i marcatori. Alcune specie, infatti, sono state identificate solo da un marcatore piuttosto che dall'altro.

Poiché le piante hanno una bassa variabilità intraspecifica, l'uso di più di un marcatore aumenta la possibilità di identificare gli ingredienti a livello di specie e le analisi di questo studio hanno confermato questa ipotesi. Considerando, ad esempio, il campione HT_007, utilizza-

do solo *psbA-trnH* è stato possibile assegnare il genere *Glycyrrhiza* sp., ma con l'aggiunta del marcatore ITS2 si è raggiunto il livello di specie di *Glycyrrhiza glabra*.

Inoltre, i risultati di questo lavoro hanno mostrato che i marcatori *psbA-trnH* e ITS2 hanno un output complementare, con 12 taxa identificati da entrambi ma 5 e 9 taxa unici rispettivamente per *psbA-trnH* e ITS2. È interessante notare che, anche nelle miscele create in laboratorio, è stata osservata una differente capacità di identificazione dei due marcatori. Pertanto, questi risultati potrebbero suggerire che la scelta del marcatore può influenzare significativamente gli output del DNA metabarcoding.



IL DNA METABARCODING COME STRUMENTO SEMI-QUANTITATIVO

Analizzando entrambe le regioni del DNA barcoding (cioè *psbA-trnH* e ITS2), è stato possibile identificare e assegnare correttamente ciascuna pianta utilizzata per la preparazione delle miscele preparate in laboratorio (**Fig.4**).

Per determinare quale miscela (gDNA o biomassa) si avvicinasse meglio alla composizione del campione prevista, è stata eseguita un'analisi PCoA utilizzando la distanza di Bray-Curtis (analisi statistica utilizzata per quantificare la diversità di composizione tra due campioni). Come mostrato nella *Figura 5*, i campioni di gDNA (punti blu) sembrano essere più vicini ai campioni che rappresentano la composizione prevista (in giallo) rispetto alla miscela di biomassa (in rosso), considerando la loro composizione ottenuta con entrambi i marcatori.

Inoltre, relativamente al marcatore ITS2, l'analisi della miscela di gDNA permette una quantificazione più accurata rispetto alla miscela di biomassa, suggerendo quindi che la fase di estrazione del DNA potrebbe compromettere la capacità di quantificazione relativa dell'approccio HTS.

In lavori futuri potrebbe essere utile testare diverse parti della stessa pianta con differenti metodiche di estrazione, per verificare se il bias di estrazione può influenzare l'amplificazione del DNA da parte di un marcatore piuttosto che dell'altro, sia quantitativamen-

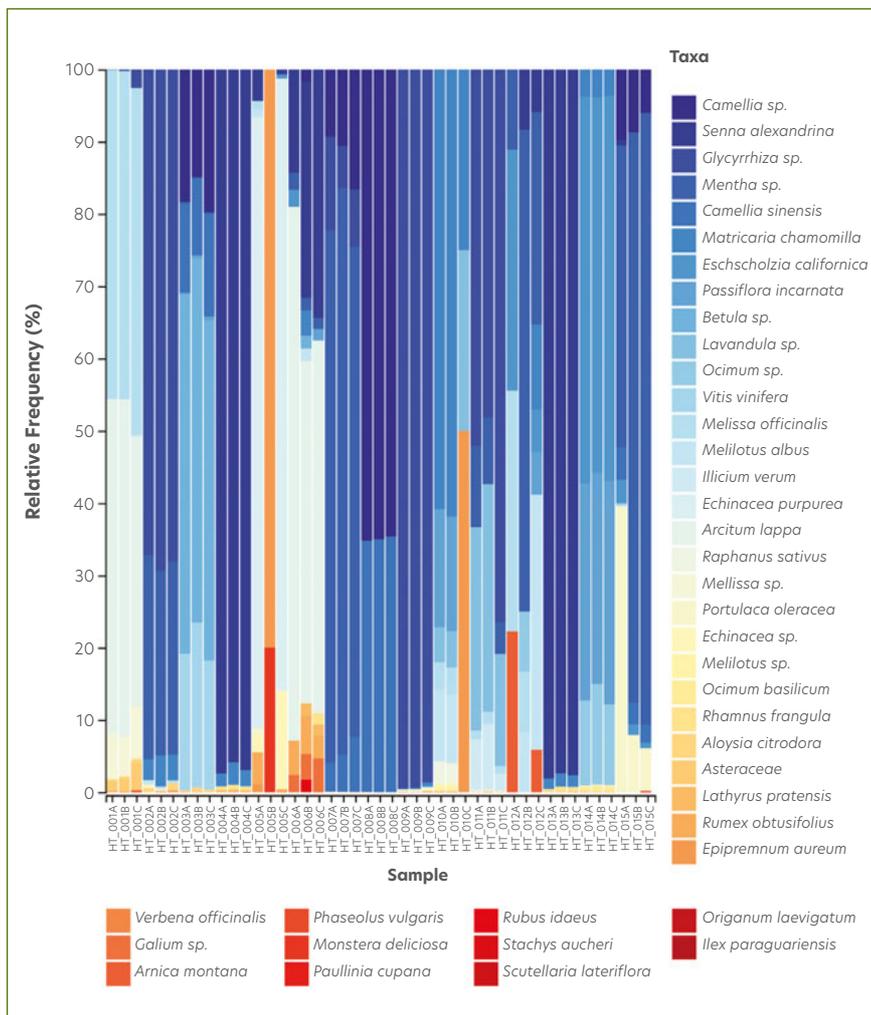


Figura 2 • Taxa bar plot del marcatore *psbA-trnH* in cui è raffigurata l'abbondanza relativa delle specie rilevate dall'analisi di DNA metabarcoding



Figura 3 • Waffle chart che rappresentano i taxa identificati per i campioni relativi alle cinque aziende. In arancione la percentuale di taxa identificate rispetto a quelle dichiarate in etichetta per il marcatore *psbA-trnH*, in azzurro per il marcatore ITS2 e in blu la percentuale totale utilizzando entrambi i marcatori

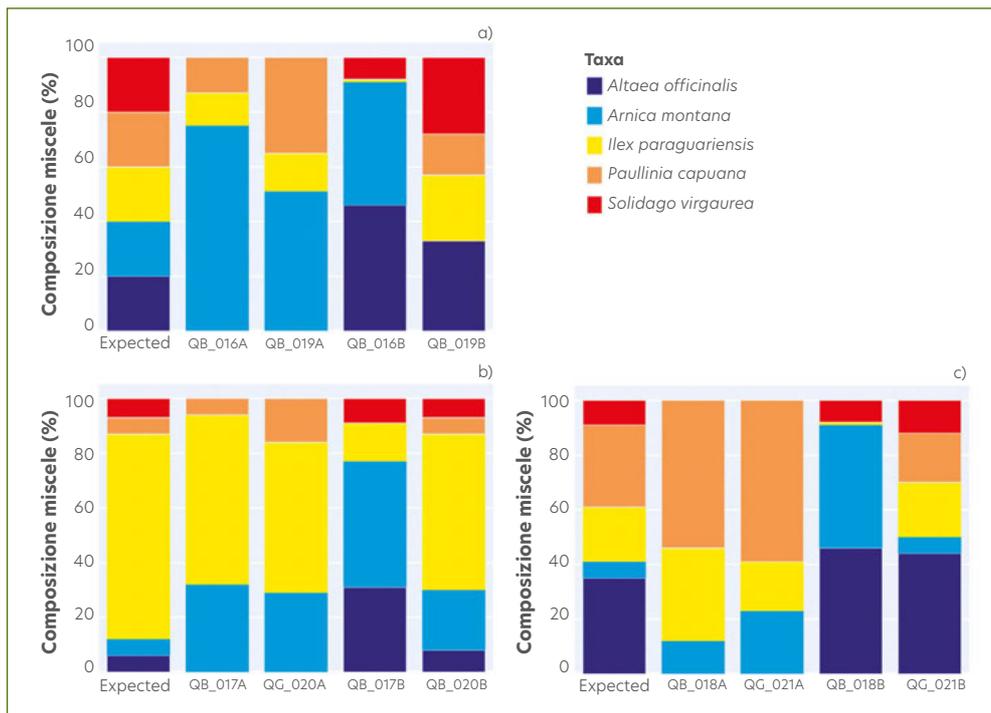


Figura 4 • Percentuali attese delle miscele e quelle ottenute in seguito all'analisi di DNA metabarcoding

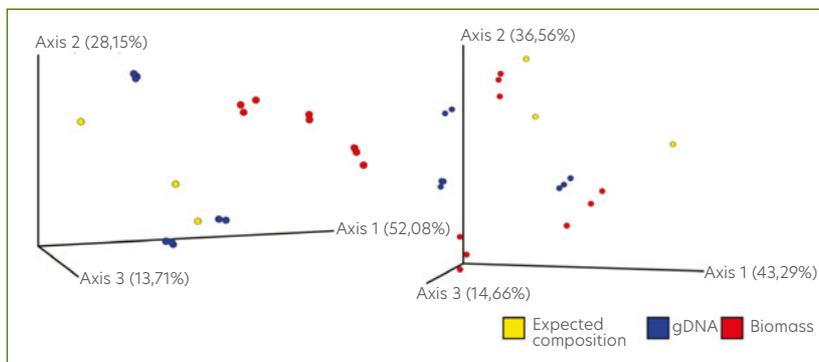


Figura 5 • Percentuali attese delle miscele e quelle ottenute in seguito all'analisi PcoA

te che qualitativamente. Inoltre, sarebbe opportuno testare diversi livelli di lavorazione di un prodotto alimentare per valutare l'integrità del DNA e se può influenzare la capacità di amplificazione.

IL DNA METABARCODING COME STRUMENTO DI CONTROLLO DELLA FILIERA

Uno degli obiettivi principali del controllo della qualità degli integratori e degli alimenti è identificare contaminanti o contraffazioni nelle materie prime durante

la loro lavorazione e prima dell'immissione sul mercato. Durante i processi di trattamento, la contaminazione, sia accidentale che volontaria, può portare a incongruenze tra composizione dichiarata e reale dei prodotti alimentari finali. Queste incongruenze potrebbero essere minacce per la salute dei consumatori, arrivando a causare anche reazioni allergiche o tossiche, e possono ridurre così i benefici attesi dai prodotti. Il DNA metabarcoding è sta-

to ampiamente utilizzato in letteratura per la verifica della qualità e della sicurezza di integratori e prodotti alimentari. In particolare, in seguito ad analisi del DNA sono stati segnalati frequenti errori di etichettatura: il 57% nei prodotti a base di carne lavorati e l'80% nei filetti di pesce venduti in Italia (21), fino al 35% nei prodotti a base di carne (22) e 39% nei filetti di pesce (23) venduti negli Stati Uniti, e fino all'80% nei latticini

(24). Per quanto riguarda il settore degli integratori a base di erbe, un sondaggio globale mostra che il 27% dei prodotti erboristici commercializzati nel mercato globale vengono adulterati quando il loro contenuto è stato testato rispetto alle loro specie di ingredienti etichettati e dichiarati. Le regioni più defraudate sono il Sud America (67% di prodotti etichettati erroneamente) e l'Australia (79% di prodotti con etichettatura errata) (25).

Recentemente è stato pubblicato il report dell'EU Food Fraud Network, dal titolo Herb & Spice Coordinated Control Plan (EUCCP). Tale report è il risultato di un'indagine condotta da Commissione europea, Europol e autorità competenti degli Stati membri in merito alle adulterazioni

delle spezie e delle erbe aromatiche in 23 Paesi europei. In questa indagine, tra le diverse metodiche utilizzate, sono state impiegate le analisi del DNA per identificare le frodi, rimarcando l'importanza di queste metodiche per il controllo della filiera e dei prodotti.

CONCLUSIONI

L'autenticità di un prodotto a base di erbe è una delle principali preoccupazioni per i consumatori, i produttori, i trasformatori e le autorità alimentari. In questo contesto, la tecnologia del DNA metabarcoding ha permesso di rilevare e identificare la composizione vegetale delle tisane commerciali. Sebbene la tecnologia HTS presenti alcuni aspetti critici, come la qualità del DNA estratto o la relativa capacità di quantificare tutti gli ingredienti, questo studio ha mostrato il valore dell'applicazione dell'analisi HTS come strumento di controllo qualità e analisi di monitoraggio di routine, dalla caratterizzazione delle materie prime ai prodotti finiti lavorati. Inoltre, l'utilizzo di un approccio multi-marcatore ha consentito di identificare un maggior numero di specie all'interno di un campione ed è quindi consigliabile, per lavori futuri, utilizzare più di un marcatore per aumentare il tasso di identificazione. In conclusione, questo strumento può essere applicato a una più ampia tipologia di campioni vegetali per migliorare la tracciabilità di tutti i prodotti. L'analisi HTS ha una sensibilità tale da poter trovare anche piccole quantità di piante che possono essere potenzialmente velenose o dannose per la salute; quindi questo strumento ha grandi potenzialità nel controllo di qualità e sicurezza nel campo delle tisane. Per questo motivo è auspicabile che questa analisi venga raccomandata dall'EFSA o da altre agenzie di controllo. Poiché queste agenzie impiegano lunghi periodi per implementare l'analisi, potrebbe essere opportuno che le aziende inizino a utilizzare questi strumenti per il controllo preventivo della loro catena di approvvigionamento e dei loro prodotti, prima che diventi obbligatorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Smith T, Kawa K, Eckl V et al (2017) Herbal Supplement Sales in US Increase 7.7% in 2016 Consumer preferences shifting toward ingredients with general wellness benefits, driving growth of adaptogens and digestive health products. *HerbalGram* 115:56-65
2. Marieschi M, Torelli A, Poli F et al (2009) RAPD-Based Method for the Quality Control of Mediterranean Oregano and Its Contribution to Pharmacognostic Techniques. *J Agric Food Chem* 57:1835-1840
3. Cornara L, Smeriglio A, Frigerio J et al (2018) The problem of misidentification between edible and poisonous wild plants: Reports from the Mediterranean area. *Food Chem Toxicol* 119:112-121
4. Garzo CF, Gómez PP, Barrasa AB et al (2002) Cases of neurological symptoms associated with star anise consumption used as a carminative. *An Esp Pediatr* 57(4):290-294
5. Raclariu AC, Mocan A, Popa MO et al (2017) *Veronica officinalis* Product Authentication Using DNA Metabarcoding and HPLC-MS Reveals Widespread Adulteration with *Veronica chamaedrys*. *Front Pharmacol* 8:378
6. Lo YT, Shaw PC (2018) DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem* 240:767-774
7. Galimberti A, Casiraghi M, Bruni I et al (2019) From DNA barcoding to personalized nutrition: the evolution of food traceability. *Curr Opin Food Sci* 28:41-48
8. Galimberti A, Labra M, Sandionigi A et al (2014) DNA Barcoding for Minor Crops and Food Traceability. *Adv Agric* 2014:831875
9. Hellberg RS, Hernandez BC, Hernandez EL (2017) Identification of Meat and Poultry Species in Food Products Using DNA Barcoding. *Food Control* 80, 23-28
10. De Mattia F, Bruni I, Galimberti A et al (2011) A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae. *Food Res* 44:693-702
11. Bruno A, Sandionigi A, Agostinetto G et al (2019) Food Tracking Perspective: DNA Metabarcoding to Identify Plant Composition in

- Complex and Processed Food Products.
Genes (Basel) 10(3):248
12. Haynes E, Jimenez E, Pardo MA *et al* (2019) The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control* 101:134-143
 13. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF *et al* (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 21(8):1794-1805
 14. Elbrecht V, Leese F (2015) Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias And Biomass–Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. *PLoS One* 10(7):e0130324
 15. Frigerio J, Agostinetto G, Mezzasalma V *et al* (2021) DNA-Based Herbal Teas' Authentication: An ITS2 and *psbA-trnH* Multi-Marker DNA Metabarcoding Approach. *Plants* (Basel) 10(10):2120
 16. CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(31):12794-12797
 17. Chen S, Yao H, Han J *et al* (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5(1):e8613
 18. Kuzmina ML, Braukmann TWA, Fazekas AJ *et al* (2017) Using herbarium-derived DNAs to assemble a large-scale DNA barcode library for the vascular plants of Canada. *Appl Plant Sci* 5(12):apps.1700079
 19. Yao H, Song J, Liu C *et al* (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS* 5(10):e13102
 20. Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* 2(6):e508
 21. Barbuto M, Galimberti A, Ferri E *et al* (2010) DNA Barcoding Reveals Fraudulent Substitutions in Shark Seafood Products: The Italian Case of "Palombo" (*Mustelus* spp.). *Food Res Int* 43(1):376-381
 22. Kane DE, Hellberg RS (2016) Identification of Species in Ground Meat Products Sold on the U.S. Commercial Market Using DNA-Based Methods. *Food Control* 59, 158-163
 23. Liou P, Banda A, Isaacs RB *et al* (2020) Labeling Compliance and Species Authentication of Fish Fillets Sold at Grocery Stores in Southern California. *Food Control* 112,107137
 24. Di Pinto A, Bottaro M, Bonerba E *et al* (2015). Occurrence of mislabeling in meat products using DNA-based assay. *J Food Sci Technol* 52(4):2479-2484
 25. Ichim MC (2019) The DNA-Based Authentication of Commercial Herbal Products Reveals Their Globally Widespread Adulteration. *Front Pharmacol* 10:1227

Utilizzo delle piante come biofabbriche per la produzione di terapeutici

LINDA AVESANI

Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona • linda.avesani@univr.it

Le piante sono una fonte naturale di molti composti chimici, tra cui molte molecole di primario interesse farmaceutico, e forniscono un quarto di tutti i composti farmaceutici prescrivibili. Le piante possono essere usate anche come fonte di farmaci biologici, i biofarmaceutici, mediante l'utilizzo mirato di tecniche dell'ingegneria genetica.

PIATTAFORME VEGETALI PER LA PRODUZIONE DI BIOFARMACEUTICI

Un biofarmaceutico è definito come una molecola complessa di grandi dimensioni, intrinsecamente di origine biologica e prodotta utilizzando sistemi biotecnologici. Un esempio di biofarmaceutici sono i vaccini, gli anticorpi, gli ormoni e gli enzimi terapeutici.

I vaccini contro l'influenza basati su virus morti sono tutt'oggi ottenuti iniettando i virus in uova di gallina per generare altri virus. Il vaccino che poi viene utilizzato nell'uomo è prodotto dai fluidi estratti dalle uova, che viene successivamente denaturato con metodi chimici per essere distrutto.

Un altro esempio di farmaco biologico è l'insulina, usata per il trattamento del diabete. L'insulina veniva solitamente estratta dal pancreas di maiali macellati. Tuttavia, negli ultimi 40 anni i progressi della tecnologia del DNA

ricombinante hanno permesso di ingegnerizzare i batteri e di istruirli alla produzione dell'ormone. I sistemi biologici a tutt'oggi maggiormente utilizzati per la produzione di biofarmaceutici sono: batteri, lieviti, cellule di mammifero, cellule di insetto, animali transgenici e sistemi vegetali.

Le piante presentano delle caratteristiche peculiari che le distinguono rispetto alle altre piattaforme di produzione di biofarmaceutici e che, per alcune applicazioni, risultano essere molto vantaggiose.

I farmaci ottenuti dalle piante hanno un minore rischio di contaminazione da parte di patogeni umani o animali rispetto a quelli ottenuti da altri sistemi biologici.

La scalabilità della produzione di prodotti farmaceutici di origine vegetale è estremamente semplice, basta coltivare un numero di piante proporzionato alle necessità e questo adattamento richiede solamente di implementare la superficie produttiva, che generalmente per questo tipo di applicazioni è la serra.

Il tempo di produzione di un biofarmaceutico nelle piante risulta essere estremamente ridotto. Questo vantaggio è stato reso possibile grazie allo sviluppo di sistemi biotecnologici estremamente innovativi che sfruttano virus vegetali disarmati e destrutturati per consentire la produzione di proteine in piante mature in tempi compresi tra i 3 e i 10 giorni. Questo approccio definito MagniCON ha dimostrato le sue enormi potenzialità durante la crisi epidemica di Ebola in Liberia per la produzione di un cocktail di anticorpi neutralizzanti contro il virus stesso e per

la produzione di vaccini personalizzati per il trattamento del linfoma di non-Hodgkin in tempi pari a due settimane. La potenzialità dei sistemi vegetali di produrre biofarmaceutici in modo estremamente più veloce rispetto ad altre piattaforme di produzione si è reso evidente nel corso di un fire test lanciato negli Stati Uniti dalla *Defense Advanced Research Projects Agency* (DARPA) nel 2009 per premiare la piattaforma in grado di produrre 100 milioni di dosi di un vaccino per l'influenza stagionale in un mese; la sfida è stata accolta da diverse companies che operavano sul fronte biotecnologico e quelle che sono riuscite a produrre l'output richiesto si basavano sull'utilizzo di sistemi vegetali. In questo caso servirono solo dieci giorni per ingegnerizzare *Nicotiana benthamiana*, pianta originaria dell'Australia, affinché esprimesse elevati livelli di emoagglutinina ceppo-specifica, e altri cinque giorni per ottenere il primo lotto purificato di vaccino. Al contrario, le attuali tecnologie manifatturiere richiedono più di sei mesi per la produzione di vaccini.

Da allora, negli Stati Uniti sono stati fatti importanti finanziamenti pubblici volti a sviluppare quelle realtà industriali che si basavano sull'utilizzo di sistemi vegetali per produrre biofarmaceutici e che hanno sostenuto aziende come Kentucky Bioprocessing e Medicago nel loro sviluppo industriale.

Medicago oggi è una delle prime aziende al mondo che, in collaborazione con GSK, sta sviluppando un vaccino per il COVID-19 basato su subunità proteiche del virus stesso prodotte in pianta (1) e che attualmente sta terminando la fase 3 di sperimentazione clinica.

Sempre nell'ambito della produzione di vaccini, un'altra interessante applicazione del *molecular farming* riguarda lo sviluppo di vaccini edibili. In particolare, tale applicazione prevede la somministrazione orale diretta di porzioni di piante edibili, precedentemente trasformate per la produzione del vaccino di interesse e parzialmente processate. Tale utilizzo permette di evitare costose procedure di purificazione proteica, che nella fase di produzione di un biofarmaceutico possono avere un impatto sulle spese di produzione fino al 80% del costo totale.

Un esempio in tal senso è fornito dalla produzione in tuberi di patata dell'antigene superficiale del virus dell'epatite B, che si è rivelato efficace in test di sperimentazione clinica nella siero-conversione dei volontari con la produzione di anticorpi verso il virus stesso (2). La sperimentazione clinica consisteva nella somministrazione ai volontari di porzioni di patata esprimenti l'antigene di interesse.

In questo senso, altri lavori hanno dimostrato in studi pre-clinici la capacità di altri sistemi quali riso (3), frutti di pomodoro (4), foglie di lattuga (5) e di rapa rossa (6) nel produrre vaccini candidati.

PRODUZIONE DI ANTICORPI DA PIANTE

Le piante si sono dimostrate in grado di produrre anche molecole estremamente complesse come gli anticorpi. La produzione degli anticorpi IgG prevede la co-espressione all'interno della stessa cellula della catena pesante e della catena leggera dell'anticorpo stesso e il loro corretto assemblamento. Piante di *Nicotiana benthamiana* si sono rivelate efficaci mediante opportuna ingegnerizzazione genetica nel produrre IgG funzionali verso numerosi patogeni, per l'induzione di un meccanismo immunologico noto come immunizzazione passiva. L'immunizzazione passiva permette di neutralizzare i patogeni grazie all'azione di IgG esogene. A questo scopo, si sono realizzate IgG neutralizzanti per il virus Ebola (7), per un antigene della carie dentale umana (8), per il virus HIV (9) e per molti altri patogeni umani, dimostrando così la versatilità di questo approccio per la produzione di anticorpi funzionali di diversi tipi.

Un possibile limite della produzione di anticorpi e di altre molecole complesse in sistemi vegetali è la differenza tra le modifiche post-traduzionali (e in particolare dell'N-glicosilazione) apportate dalle piante rispetto a quelle dell'uomo. Tuttavia, tale ostacolo è stato superato mediante la "glico-ingegnerizzazione" dei sistemi vegetali,

ovvero la modifica, sempre mediante trasformazione genica, dell'arsenale biochimico in grado di espletare tale modifica alle proteine per renderlo identico a quello umano (10).

NANOMATERIALI DA VIRUS VEGETALI

Un'altra potenziale applicazione dei sistemi vegetali come biofabbriche prevede la produzione di virus vegetali come nanomateriali per differenti applicazioni terapeutiche e diagnostiche.

I virus vegetali sono strutture molto robuste in grado di replicarsi nei sistemi vegetali ad alti livelli e in modo monodisperso (ovvero sempre uguali a se stessi in una soluzione). Tale caratteristica li rende strutture nanometriche molto interessanti e le loro applicazioni spaziano dall'utilizzo come nanomateriali in circuiti elettrici e come bio-capsule per la somministrazione di determinate molecole al loro utilizzo nell'immunoterapia e nella diagnostica. Un enorme vantaggio dei virus è sicuramente l'enorme facilità con cui le strutture virali si possono ingegnerizzare geneticamente, permettendo così di modificarne la composizione. Un esempio di questa applicazione è la loro modifica superficiale per fare in modo che espongano sulla superficie esterna determinanti molecolari in grado di riconoscere appositi recettori o di innescare specifiche reazioni immunologiche. I virus vegetali, inoltre, non sono pericolosi per l'uomo.

Un gruppo di San Diego ha dimostrato la possibilità di utilizzare virus vegetali, prodotti utilizzando le piante, modificati per l'esposizione sulla superficie di recettori in grado di riconoscere in modo specifico cellule tumorali. La modifica dei virus prevedeva inoltre la loro bio-incapsulazione con droghe citotossiche, normalmente utilizzate nella chemioterapia. In questo modo il virus, una volta iniettato nel paziente, è in grado di riconoscere e legarsi in modo specifico alla cellula tumorale. In seguito al legame, il virus è fagocitato dalla cellula e una volta en-

trato libera il suo carico citotossico, uccidendo la cellula bersaglio. Sempre nel campo della ricerca oncologica, lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che l'iniezione di virus vegetali non modificati in masse tumorali bersaglio è in grado di risvegliare meccanismi immunologici, silenziati dalle cellule tumorali, causando in questo modo una regressione della massa tumorale grazie appunto alla ri-attivazione dei meccanismi naturali di controllo dello sviluppo di tumori (11).

Il nostro gruppo di ricerca, sempre nell'ambito dei nanomateriali virali, ha dimostrato l'efficacia di virus vegetali nella prevenzione e nel trattamento di malattie autoimmuni. In questo caso, virus vegetali sono stati modificati per l'esposizione sulla loro superficie di peptidi immunodominanti associati a malattie autoimmuni, ovvero piccole porzioni di autoantigeni self che, nel caso di malattie autoimmuni, diventano il bersaglio del sistema immunitario. La somministrazione di tali virus vegetali si è dimostrata in grado di prevenire il diabete autoimmune e di far regredire i sintomi dell'artrite reumatoide in modelli animali specifici, grazie all'induzione di un meccanismo immunologico noto come tolleranza (12). L'induzione della tolleranza verso le proteine bersaglio del sistema immunitario permette di bloccare il meccanismo patologico alla base della malattia stessa.

Tali risultati sono di enorme interesse perché pongono le basi, nel caso sia della ricerca oncologica sia delle malattie autoimmuni, per lo sviluppo di terapie mirate che sono in grado di re-dirigere la risposta immunitaria in modo specifico per promuovere la cura di determinati stati patologici.

AVVIO DI UN PERCORSO REGOLATORIO SPECIFICO

Molte delle applicazioni fino a qui descritte riguardano biofarmaceutici prodotti in sistemi vegetali testati in modelli animali o in fase di sperimentazione clinica, ma ancora non disponibili sul mercato. I motivi di questo sono

molteplici; le piante si sono imposte in un secondo tempo rispetto alle piattaforme convenzionali e le aziende farmaceutiche tendono a essere restie a cambiare sistemi di produzione. A causa di questo ritardo, la normativa di riferimento per l'utilizzo di piante per la produzione di biofarmaceutici si è sviluppata in un secondo tempo grazie a gruppi di ricerca europei che hanno posto all'allora EMEA il problema di modificare l'allora attuale regolamentazione con una che rispecchiasse in modo più consono la realtà dei sistemi vegetali rispetto alle colture di cellule di mammifero, di lieviti o di batteri.

Il primo biofarmaceutico prodotto in pianta, approvato e tutt'ora sul mercato è la glucocerebrosidasi utilizzata per il trattamento della sindrome di Gaucher.

La malattia di Gaucher è un disturbo genetico raro (1 caso su 40.000) causato da una mutazione nel gene per la glucocerebrosidasi, che rende questo enzima inattivo o poco attivo. La malattia di Gaucher è una delle diverse malattie dello storage lisosomale, ovvero condizioni in cui i composti che dovrebbero essere degradati da enzimi si accumulano invece nei lisosomi, organelli che nelle cellule animali hanno funzione simile a quella dei vacuoli nelle cellule vegetali. Se non viene curata questa malattia porta problemi in molti organi, inclusi la milza, il fegato, i reni, i polmoni e il cervello. Nei casi più gravi determina la morte prima dei due anni di età.

Il modo semplice per curare questo tipo di malattie è fornire al paziente una versione funzionale di quella proteina. Negli anni Novanta, la glucocerebrosidasi fu estratta con successo dai tessuti umani e somministrata ai pazienti e più di recente è stata prodotta in cellule di mammifero modificate geneticamente.

Il trattamento è efficace, ma l'uso di cellule di mammifero come piattaforma di produzione ha due svantaggi principali. Il primo è che le cellule di mammifero sembrano modificare l'enzima dopo averlo sintetizzato. Queste modifiche rendono l'enzima meno attivo. Secondo, il processo è costoso: la fornitura costa al paziente più di 200.000 dollari all'anno.

Una piattaforma vegetale (cellule di carota transgeniche

in sospensione) è stata utilizzata per superare questi svantaggi.

La glucocerebrosidasi è stata testata con successo sui pazienti e nel 2012 l'uso è stato approvato dai governi degli Stati Uniti, del Canada e dei Paesi dell'America Latina, diventando così il primo biofarmaceutico prodotto in piante approvato per uso umano. L'enzima in forma iniettabile viene venduto come farmaco col nome ELEYSO (13).

L'approvazione della glucocerebrosidasi prodotta in piante per uso umano ha un significato di ampia portata nel campo dei farmaci biologici ottenuti da piante. Infatti ha aperto un chiaro cammino normativo specificamente per i farmaci biologici ottenuti da piante che dovrebbe rendere più agevole l'approvazione dei composti terapeutici e vaccini ottenuti da piante che hanno dimostrato sicurezza ed efficacia negli studi sull'uomo.

Attualmente, i farmaci biologici che sembrano vicini a questo traguardo sono un vaccino quadrivalente per l'influenza stagionale (14) (terminati con successo gli studi clinici in attesa di approvazione negli Stati Uniti), il vaccino per il COVID-19 (1) (in fase di terminazione della fase 3 degli studi clinici sull'uomo) e un vaccino per il rotavirus (15) (in fase 2 di sperimentazione clinica sull'uomo).

BIBLIOGRAFIA

1. Ward BJ, Gobeil P, Séguin A et al (2021) Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nat Med* 27(6):1071-1078
2. Thanavala Y, Mahoney M, Pal S et al (2005) Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;102(9):3378-3382
3. Ma J, Wang Y, Xu N et al (2018) Potential large scale production of meningococcal vaccines by stable overexpression of fHbp in the rice seeds. *Protein Expr Purif* 152:1-6
4. Ramírez YJ, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A et al (2007) Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clin Vaccine Immunol* 14(6):685-692

5. Clarke JL, Paruch L, Dobrica MO et al (2017) Lettuce-produced hepatitis C virus E1E2 heterodimer triggers immune responses in mice and antibody production after oral vaccination. *Plant Biotechnol J* 15(12):1611-1621
6. Bertini E, Merlin M, Gecchele E et al (2018) Design of a Type-1 Diabetes Vaccine Candidate Using Edible Plants Expressing a Major Autoantigen. *Front Plant Sci* 1;9:572
7. González-González E, Alvarez MM, Márquez-Ipiña AR et al (2017) Anti-Ebola therapies based on monoclonal antibodies: current state and challenges ahead. *Crit Rev Biotechnol* 37(1):53-68
8. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K et al (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 4(5):601-606
9. Ma JK, Drossard J, Lewis D et al (2015) Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* 13(8):1106-1120
10. Loos A, Steinkellner H (2014) Plant glyco-biotechnology on the way to synthetic biology. *Front Plant Sci* 8;5:523
11. Chung YH, Cai H, Steinmetz NF (2020) Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev* 156:214-235
12. Zampieri R, Brozzetti A, Pericolini E et al (2020) Prevention and treatment of autoimmune diseases with plant virus nanoparticles. *Sci Adv* 6;6(19):eaaz0295
13. Grabowski GA, Golembo M, Shaaltiel Y (2014) Taliglucerase alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Mol Genet Metab* 112(1):1-8
14. Ward BJ, Makarkov A, Séguin A et al (2020) Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18-64 years) and older adults (≥65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. *Lancet* 7;396(10261):1491-1503
15. Malm M, Diessner A, Tamminen K et al (2019) Rotavirus VP6 as an Adjuvant for Bivalent Norovirus Vaccine Produced in *Nicotiana benthamiana*. *Pharmaceutics* 11;11(5):229

Minatori silenziosi

Piante per il recupero industriale di metalli

ENRICA ROCCOTIELLO

Dipartimento di Scienze della Terra dell'Ambiente e della Vita, Università degli Studi di Genova

enrica.roccotiello@unige.it

In un famosissimo cartone di animazione degli anni '80, Hayao Miyazaki affidava alla protagonista Nausicaä della Valle del Vento la capacità di studiare affascinata la giungla tossica che cresceva in un'avveniristica realtà post-apocalittica. La protagonista scopriva poi come tale foresta in realtà non facesse altro che captare e depurare il suolo contaminato dalle ingenti attività antropiche preesistenti.

In realtà negli anni '70 questo fenomeno era già noto grazie a un gruppo di appassionati botanici che misero a sistema numerose osservazioni relative alle metallofite (piante metallo-tolleranti), in grado di crescere su suoli incredibilmente ricchi di metalli, tali da determinare la tossicità in qualunque altro organismo non ben adattato a vivere in quei contesti.

Tuttavia, tali piante erano già note fin dall'antichità, quando venivano impiegate per individuare giacimenti minerari, come citato da Georg Agricola nel *De Re Metallica* (1556). L'uso delle piante come indicatori di giacimenti rappresenta, peraltro, una pratica attualmente

presente nel cosiddetto *Zambian copperbelt*; la cintura di depositi di rame dell'Africa centrale dove Lamiacee, comunemente chiamate *copper flower*, quali ad esempio *Ocimum centraliafricanum*, sono utilizzate proprio per l'individuazione di giacimenti di rame (**Fig.1**).

IPERACCUMULATORI, PHYTOREMEDIATION E PHYTOMINING

Ma c'è di più. Alcune di queste metallofite, oltre a tollerare concentrazioni tossiche di elementi quali Cobalto, Cromo, Nichel, Rame, Oro, Argento, Manganese, Zinco, terre rare ecc., sono anche in grado di spostare attivamente

tali elementi dal suolo alle porzioni epigee, concentrandoli nella frazione mietibile.

L'impiego di tali specie vegetali, note come iperaccumulatori, in siti contaminati da metalli, ha consentito la messa a punto di numerose tecniche di bonifica, meglio



Figura 1 • *Ocimum centraliafricanum*, *Copper flower*, indicatore di giacimenti di rame (5)

note come *phytoremediation*, che consentono un miglioramento delle condizioni dei substrati contaminati con recupero di metalli dal suolo. Tuttavia, nel rapporto costi-benefici, tale pratica, pur risultando sostenibile e piuttosto efficace, è lenta e a fine ciclo richiede comunque lo smaltimento della biomassa secca come rifiuto speciale. Da qui l'idea di impiegare questa pratica per il recupero di metalli che abbiano un valore economico per l'industria. Ecco allora nascere il *phytomining*, dove la fitoestrazione e la concentrazione alla frazione mietibile avvengono per metalli di interesse economico e industriale quali Oro, Argento, Nichel, per citarne solo alcuni, che possono essere captati da scarti di lavorazione industriale e materiali di risulta di attività estrattive. L'incenerimento della biomassa secca a elevatissime temperature consente l'arricchimento di metalli nelle ceneri, che diventano un vero e proprio biominerale e possono essere impiegate nelle più svariate applicazioni industriali come materie prime seconde. Senza contare che alcune specie impiegate per il *phytomining* possono essere utilizzate al posto di combustibili fossili consentendo la produzione di energia, oltre che il recupero di metalli dalle ceneri.

IL RUOLO DEL MICROBIOTA RIZOSFERICO

Aspetto altrettanto cruciale è rivestito dalla fase di captazione dei metalli dal suolo, che richiede alcuni processi specifici che avvengono a livello di apparato radicale e rizosfera. In tale contesto, l'impiego di un pool di microrganismi batterici e fungini può giocare un ruolo chiave sia nell'alleviare lo stress da metallo sia nell'aumentare la captazione dello stesso da parte della pianta, con una partita che si gioca a tanti livelli e con diversi regni, dal suolo alla foglia (1). Non verrà esplorato in dettaglio questo affascinante aspetto delle interazioni pianta-suolo, ma basti sapere che il microbiota rizosferico è un elemento chiave su diversi livelli e compare in numerosi

aspetti di progetti strategici per l'agricoltura, l'uso del suolo, la riduzione dei pesticidi e dei fertilizzanti, e il miglioramento delle colture.

UNA NUOVA FILIERA CON PROSPETTIVE INTERESSANTI

Nei primi decenni del XXI secolo una nuova frontiera del *mining* si è delineata come decisiva, in conseguenza di una crescente richiesta di metalli considerati "critici" e cruciali da parte dell'industria, in considerazione della diminuzione delle risorse e di diversi fattori geopolitici. In parallelo, il crescente sfruttamento dei suoli e la loro contaminazione in relazione a una crescente attività antropica hanno complicato il panorama internazionale complessivo per quanto riguarda l'uso di terreni per la produzione agricola. A questo si aggiungono fattori avversi determinati da condizioni naturali, legati ad esempio, in alcune parti del globo, alla presenza di una roccia madre naturalmente ricca di metalli a concentrazioni ecotossiche e pertanto difficilmente coltivabile o poco fertile. Perché allora non applicare questa metodologia a suoli agricoli presenti su terreni metalliferi, o contaminati, ma potenzialmente coltivabili? La messa a sistema di queste applicazioni di bonifica ha dunque inaugurato il filone dell'*agromining*, che ha come duplice finalità sia il recupero di elementi di interesse industriale, sia la rifunzionalizzazione di suoli agricoli per aumentarne la fertilità e di conseguenza la produttività riducendo gli input di fertilizzanti (2). In pratica si tratta di coltivare in modo sequenziale piante iperaccumulatrici su suoli agricoli, con elevate concentrazioni di metalli per renderli maggiormente fruibili dall'agricoltura tradizionale; a seguire, i suoli vengono normalmente coltivati con colture di interesse alimentare. Tale pratica si inserisce in un contesto ormai fortemente condizionato dal cambiamento climatico e di un sistema agroalimentare volto a una produzione massiva di alimenti, dove l'accumulo di metalli nelle parti eduli delle piante è da evitare in modo



Figura 2 • *Noccaea caerulescens* (Brassicaceae), specie iperaccumulatrice di Ni (cc Jean-Jacques Houdré)

categoria. Lo stesso dicasi per le piante che vengono poi impiegate per la produzione di fitoterapici o nutraceutici. Se anche in questo caso l'impatto dell'*agromining* non è nullo, tuttavia i benefici derivanti risultano numerosi: ad esempio la possibilità di maggior impiego dei terreni, e di conseguenza di occupazione, per le comunità rurali, specialmente nei Paesi in via di sviluppo; l'attrattiva economica per l'industria; l'aumento della fertilità dei suoli e di conseguenza la miglior produzione di vegetali. Questa metodologia è di interesse strategico, se si pensa che nel mondo esistono circa 700 specie di piante iperaccumulatrici, decine delle quali

decisamente promettenti per i raccolti "metallici" sia nel nostro emisfero (ad esempio Brassicacee come *Noccaea caerulescens* od *Odontarrhena chalcidica*, anche nota come *Alyssum murale* - **Fig.2**) sia nell'emisfero australe, che vanta diverse piante a portamento arbustivo come il *Phyllanthus balgooyi* (**Fig.3**) o addirittura arboree come la *Pycnandra acuminata* (**Fig.4**), in grado di contenere



Figura 3 • *Phyllanthus balgooyi* (cc Antony van der Ent)



Figura 4 • Specie iperaccumulatrici del genere *Pycnandra* (Sapotaceae) della Nuova Caledonia. Il latice turchese indica l'elevatissima concentrazione di Ni (Sandrine Isnard, AMAP, Università di Montpellier)

nelle propria biomassa secca rispettivamente il 10 e il 25% di Nichel. La possibilità di impiegare questi minatori vegetali ha grandi potenzialità applicative se si considera la possibile creazione di una filiera che consenta poi l'essiccazione, l'incenerimento e il recupero dal biominerale così generato di elementi utili attraverso le normali tecniche estrattive idrometallurgiche.

E le applicazioni? Oltre ai metalli preziosi quali Oro e Argento, anche altri come il Nichel hanno un interesse economico legato all'impiego di questo metallo nelle batterie e nella produzione di acciaio. Inoltre, le applicazioni potrebbero essere ulteriori se si pensa alla produzione di integratori alimentari a base, ad esempio, di Selenio o Zinco, solo per citarne alcuni.

Resta una filiera appena iniziata e tutta da costruire, si vedano ad esempio i progetti *Agromine* e *Agronickel* (3,4) (Fig.5), ma in potenziale rapida espansione, con una legislazione che dovrà gestire e in parte adeguarsi a queste tecnologie emergenti.

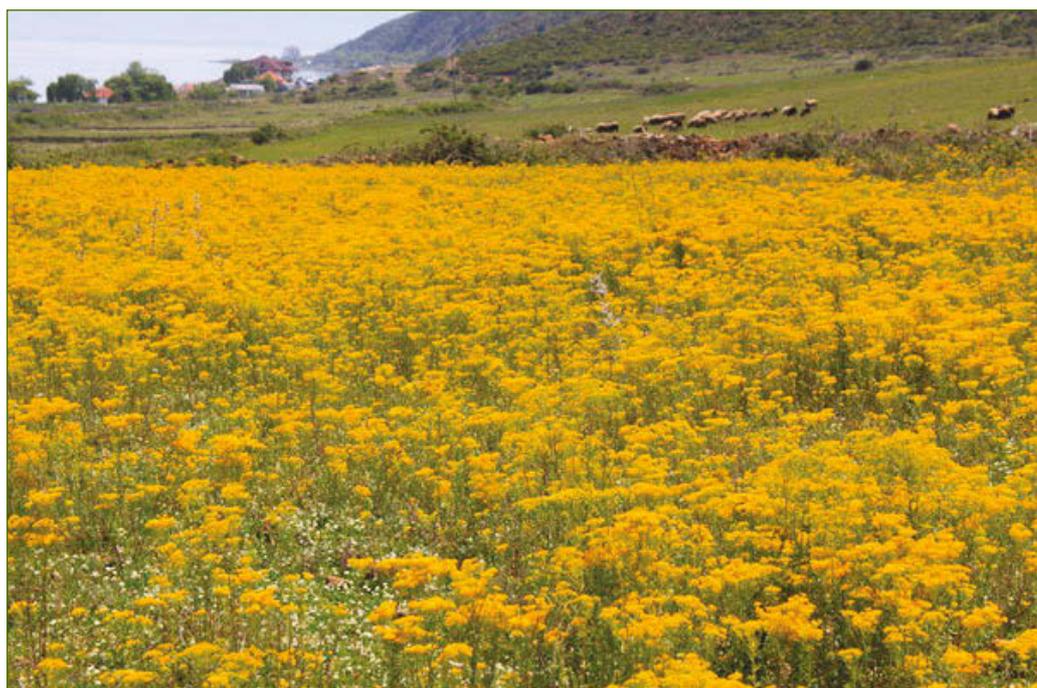


Figura 5 • *Agromining*: campo dimostrativo per coltura su larga scala di Nichel con *Odontarrhena calcidica* (sin. *Alyssum murale*) su substrati ultramafici dei Balcani (Albania) (Nkrumah)

BIBLIOGRAFIA

1. Rosatto S, Cecchi G, Roccotiello E et al (2021) Frenemies: Interactions between Rhizospheric Bacteria and Fungi from Metalliferous Soils. *Life* 11(4): 273
2. Van der Ent A, Baker AJM, Echevarria G et al (2018) *Agromining: Farming for Metals. Extracting Unconventional Resources Using Plants*. Springer, Cham, p.312
3. Agronickel ERA NET FACCE surplus, projects.au.dk/faccesurplus/research-projects-1st-call/agronickel/
4. LIFE Agromine Project, Life Environment 2015, LIFE15 ENV/FR/000512, www.life-agromine.com
5. www.earth.com/plant-encyclopedia

ACTIVE BOX • GREEN MOUNTAIN BIOTECH

Botaniplex™ Clear

Dalla natura l'alleato per combattere l'acne

Green Mountain Biotech sviluppa tramite un'innovativa tecnologia di estrazione una serie di miscele botaniche chiamate Botaniplex™ (1). Queste miscele contengono estratti purificati di piante medicinali molto conosciute nella Medicina Tradizionale Cinese (TCM) e sono fornite come ingredienti liquidi di alta qualità e senza conservanti per l'industria del Personal Care. La miscela **Botaniplex™ Clear**, distribuita in Italia da Active Box, è un ingrediente attivo cosmetico costituito da estratti di sei diverse piante, ed è un naturale ed efficace alleato se utilizzato in prodotti topici per il trattamento dell'acne. Questa problematica cutanea della pelle colpisce la maggior parte degli adolescenti di entrambi i sessi ed è diffusa anche in età adulta. Oltre ad avere un forte impatto negativo a livello estetico, l'acne può costituire una condizione aggravante o predisponente per patologie più serie. Nei casi particolarmente severi vengono prescritti antibiotici sistemici, tuttavia l'acne è più comunemente e ampiamente trattata utilizzando formulazioni topiche non soggette a prescrizione. Botaniplex™ Clear è stato sviluppato

per queste ultime tipologie di formulazioni ed è fornito come un liquido pronto che si combina facilmente con altri ingredienti cosmetici per creare lozioni, creme e unguenti, fornendo così un mix sinergico di derivati botanici con azione antinfiammatoria, in grado di bilanciare il microbioma e aiutare a controllare l'acne.

COMPOSIZIONE E SPECIFICHE TECNICHE

Le caratteristiche tecniche di Botaniplex™ Clear (nome INCI: Glycerin, Phellodendron Chinense Bark Extract, Sanguisorba Officinalis Root Extract, Rheum Palmatum Root Extract, Portulaca Oleracea Extract, Chrysanthemum Indicum Flower Extract, Scutellaria Baicalensis Root Extract) sono riportate in **Tabella 1**.

MECCANISMO D'AZIONE

Botaniplex™ Clear è una miscela di estratti botanici contenenti un'ampia gamma di sostanze fitochimiche che

DANIELA RONCHETTI

tel +39 02 36530596

daniela.ronchetti@activebox.it

activebox
cosmetically different™

Dall'idea di eco-beauty nasce Active Box, una realtà dallo spirito innovativo, il cui obiettivo è anticipare gli scenari evolutivi della cosmetica offrendo un'ampia gamma di principi attivi esclusivi. Un costante impegno nella scelta di partner tecnologici internazionali e di ingredienti innovativi è alla base della filosofia aziendale. Visitate il nostro sito web per scoprire il nostro portfolio dedicato al personal care: www.activebox.it.

Le miscele Botaniplex™ di Green Mountain Biotech (GMB) sono progettate per migliorare la salute della pelle equilibrandone le risposte immunitarie e infiammatorie, migliorando i sistemi protettivi innati e controllando il microbioma cutaneo. L'alta qualità dei prodotti deriva da un'attenta selezione e sperimentazione delle erbe, da una tecnologia di estrazione e purificazione e da un diligente controllo della qualità. GMB combina l'esperienza nella Medicina Tradizionale Cinese e nella scienza moderna, producendo miscele sinergiche di estratti vegetali per affrontare specifiche condizioni della pelle. GMB si impegna a minimizzare l'impatto ambientale attraverso un approvvigionamento sostenibile e un uso responsabile delle risorse, sottolineando l'importanza della biodiversità vegetale e della conservazione.

includono alcaloidi, antrachinoni, flavonoidi, terpenoidi e altri polifenoli. Queste molecole sono responsabili di una serie di attività che aiutano ad alleviare i sintomi dell'acne, tra cui:

Tabella 1 • Caratteristiche tecniche di Botaniplex™ Clear	
Caratteristiche organolettiche	
Aspetto	Liquido
Odore	Caratteristico, a base di erbe
Colore	Da marrone a marrone scuro
Caratteristiche chimico-fisiche	
pH	3,8 - 5,3
Densità relativa (20°C)	1,15 - 1,22
Solubilità	Miscibile con l'acqua
Contaminanti	
Metalli pesanti	Al di sotto delle soglie di rilevamento
Residui di pesticidi	Al di sotto delle soglie di rilevamento
Caratteristiche microbiologiche (UFC/g)	
Conteggio totale delle piastre	<10 ²
Funghi/Lieviti	<10 ²
Salmonella/E.coli	Non rilevati
Stabilità e Conservazione	
Conservare a una temperatura compresa tra 15 e 25 °C, al buio o in presenza di una minima quantità di luce. Shelf-life: 2 anni	

- Attività antinfiammatoria
- Attività correlata al sollievo dal dolore/irritazione
- Attività antiossidante
- Effetto antibiotico/prebiotico sul microbiota cutaneo.

La sezione seguente include gli studi che dimostrano queste attività in vitro e in vivo.

EFFICACIA

Studi in vitro

Effetto antinfiammatorio

L'infiammazione è la causa del dolore e del fastidio fisico ed estetico associato all'acne.

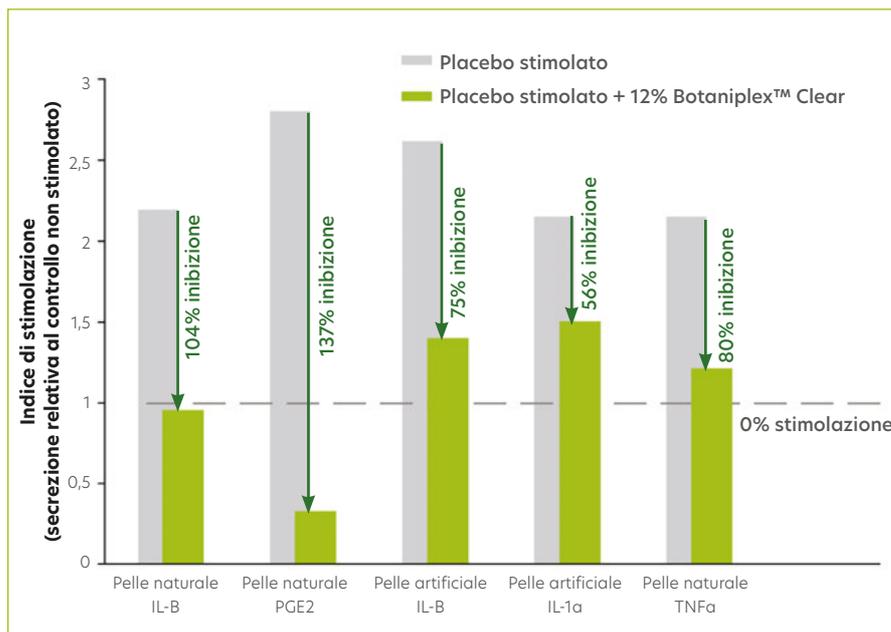


Figura 1 • Inibizione delle citochine pro-infiammatorie in un modello di pelle artificiale stimolato con PMA e in un campione di pelle naturale stimolato con LPS

La **Figura 1** mostra la secrezione di molecole infiammatorie in un modello di pelle artificiale (EpiDerm™) e in un campione di pelle naturale. Come noto, le molecole PMA e LPS, inducono una risposta infiammatoria che stimola la produzione e la secrezione delle citochine infiammatorie almeno di 2 volte. Il rilascio di questi mediatori è ridotto da agenti antinfiammatori come il desametasone e altri farmaci steroidei. L'esperimento mostra che Botaniplex™ Clear è un efficace antinfiammatorio poiché sopprime la produzione di tre citochine: IL-1α, IL-8 e TNFα. Inoltre, è stata mostrata anche una soppressione importante della prostaglandina E2 (PGE2) che ha numerose funzioni, una delle quali è quella di upregolare i neurotrasmettitori. Questi risultati mostrano il potenziale di Botaniplex™ Clear nel ridurre l'infiammazione e il dolore associato alla lesione da acne.

Attività antiossidante

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) hanno un importante ruolo nell'infiammazione, causando danni ossidativi diretti ai tessuti e dando inizio a reazioni a catena che determinano la produzione di radicali liberi, i quali causano ulteriori danni. Inoltre, i ROS inducono una cascata di altre vie fisiologiche correlate all'infiammazione. Fisiologicamente, la protezione dallo stress ossidativo è fornita dalle vitamine (in particolare A, C, E) e da altre molecole antiossidanti endogene. Nella pelle infiammata, come accade in presenza di lesioni acneiche, la protezione innata è insufficiente a ripristinare l'equilibrio fisiologico. Le miscele Botaniplex™ contengono antiossidanti che colmano questa carenza e aiutano l'organismo a rispondere alla condizione di stress. Diluizioni di Botaniplex™ Clear sono state fatte re-

agire con DPPH, un radicale stabile utilizzato per determinare, tramite metodo colorimetrico, il potenziale antiossidante di diverse molecole o estratti. L'attività di Botaniplex™ Clear allo 0,75% è >100 µmol/L (espresso in equivalenti di Trolox, un analogo della vitamina E), il che offrirebbe da 133 a 1600 µmol/L di equivalenti di Trolox in una formulazione contenente Botaniplex™ Clear dall'1 al 12%, ovvero la concentrazione di utilizzo raccomandata (vedi paragrafo Modalità d'uso). Questo risultato conferma che Botaniplex™ Clear presenta eccellenti attività antiossidanti.

Controllo del microbioma

La pelle umana è colonizzata da numerosi microorganismi e i principali batteri commensali sono *Staphylococcus epidermidis* e *Cutibacterium acnes*. Queste due specie sono reciprocamente antagoniste, ma coesistono sulla superficie cutanea in un equilibrio dinamico che può sbilanciarsi in entrambe le direzioni.

C. acnes, precedentemente classificato come *Propionobacterium acnes*, è una specie anaerobica. Questo batterio è sufficientemente aero-tollerante da sopravvivere anche sulla superficie cutanea, ma quando entra nei follicoli piliferi prolifera anaerobicamente, contribuendo all'ostruzione dei pori e alla formazione dei brufoli tipici dell'acne.

S. epidermidis è aerobio, e quindi rimane principalmente sulla superficie

della pelle, ma in alcune circostanze può entrare nella mucosa.

Raramente *S. epidermidis* è patogeno, infatti generalmente è considerato benefico, in quanto previene l'acne frenando la crescita eccessiva di *C. acnes* e neutralizzando le molecole infiammatorie prodotte da *C. acnes*. *S. epidermidis* gioca anche un ruolo importante nel competere con gli altri microorganismi patogeni: *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus aureus*.

Gli effetti degli estratti botanici contenuti in Botaniplex™ Clear sulla crescita delle specie batteriche sopra menzionate sono stati testati su piastre di agar ("zone di inibizione", vedi **Figura 2**) e/o seguendo la crescita in micropiastre.

La **Figura 3** sottolinea la selettività degli estratti contenuti in Botaniplex™ Clear, con cinque di essi in grado di promuovere la crescita di *S. epidermidis* e di inibire quella di *S. capitis*.

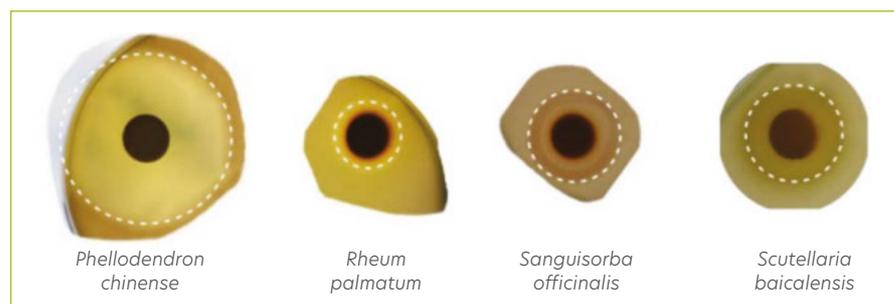


Figura 2 • Test del disco su piastra di agar. Ogni estratto (100 µL) è stato applicato su un disco filtrante e posato su una piastra di agar inoculata con *C. acnes*. Gli anelli bianchi tratteggiati delimitano le zone di inibizione

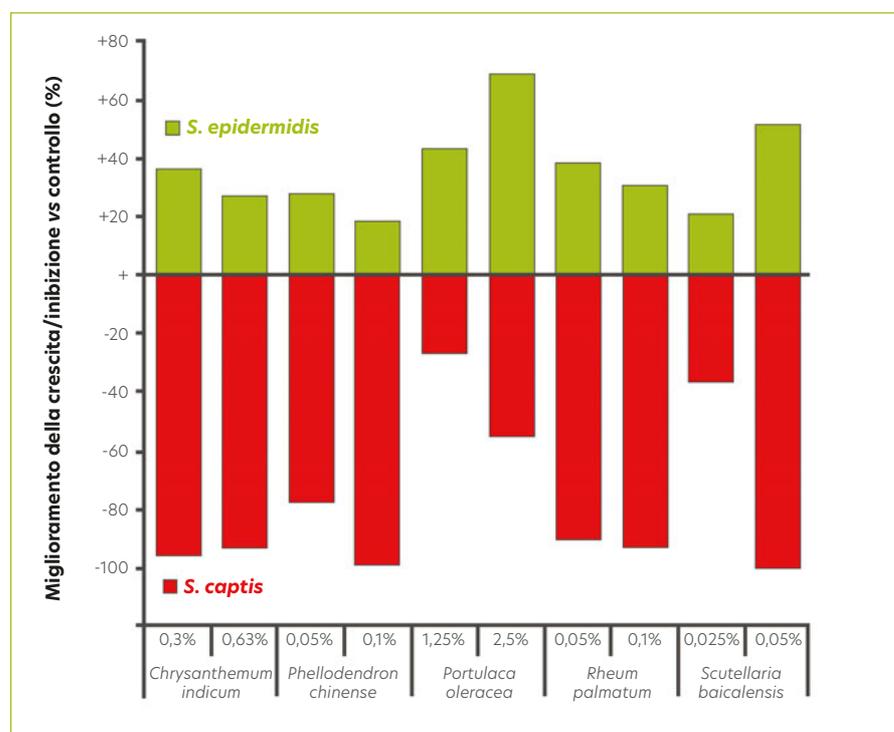


Figura 3 • Attività prebiotiche e antibiotiche degli estratti botanici nei confronti di *S. epidermidis* e *S. capitis*. I batteri sono stati seminati in terreni in micropiastre. La crescita è stata monitorata registrando la densità ottica (A_{400})

I risultati dei test microbiologici mostrano come gli estratti botanici contenuti in Botaniplex™ Clear aiutino a ripristinare la salute della pelle riequilibrando il microbioma.

Studi in vivo

È stato condotto uno studio clinico per valutare la tollerabilità e l'efficacia di un gel topico contenente l'11,5% di Botaniplex™ Clear (2).

I soggetti (10 maschi e 15 femmine, da 12 a 43 anni) presentavano tutti lesioni da acne distribuite su entrambi i lati del viso. Un lato del viso di ciascun soggetto è stato sottoposto all'applicazione del gel tre volte al giorno, mentre l'altro lato è servito da controllo. Al giorno 0, alle lesioni su ciascun lato del viso è stato assegnato un punteggio di gravità (massimo 4).

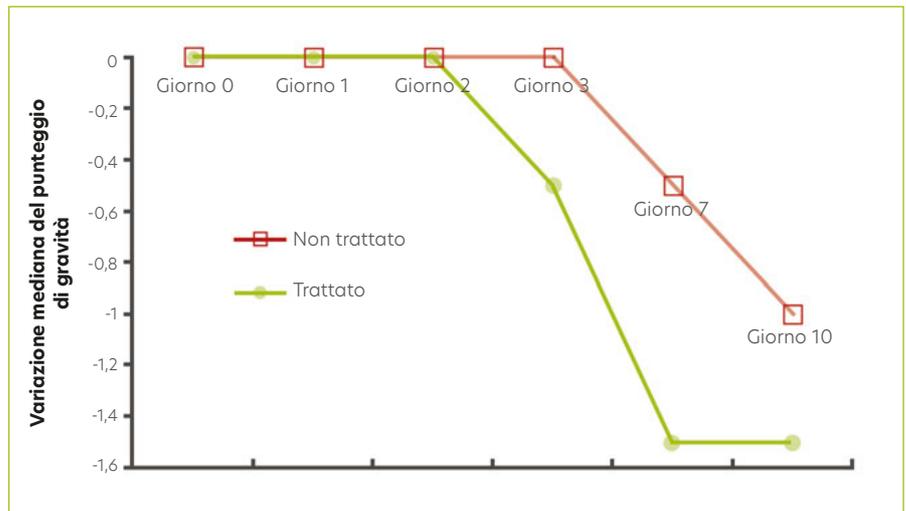


Figura 4 • Cambiamenti del punteggio di gravità dell'acne nei soggetti trattati topicamente con gel contenente Botaniplex™ Clear. I lati opposti del viso di ciascun paziente sono serviti come trattamento e controllo rispettivamente (dettagli nel testo)

Le stesse lesioni sono state poi valutate nei giorni 1, 2, 3, 7 e 10.

Tutte le lesioni infiammate, sia quelle trattate che quelle di controllo, sono iniziate con un punteggio mediano di 2,5, intervallo interquartile (IQR) da 2 a 3. Rispetto alle lesioni non trattate, le lesioni trattate hanno mostrato

una riduzione significativamente più rapida della gravità (**Fig.4**), con un evidente miglioramento in alcuni soggetti, visibile già solo dopo 5 applicazioni del gel (**Fig.5**). Inoltre, le donne sotto i 18 anni sono migliorate maggiormente in un periodo di tempo più breve.



Figura 5 • Fotografie delle lesioni sui soggetti dello studio prima (A) e dopo (B) 5 applicazioni (durante ~ 1½ giorni) di un gel contenente i componenti vegetali di Botaniplex™ Clear

Tabella 2 • Informazioni sulla sicurezza di Botaniplex™ Clear

Ingredienti	Solo glicerolo ed estratti botanici Senza conservanti
Contaminanti	Nessun metallo pesante e residuo di pesticidi rilevabile
Microbiologia	<i>Salmonella</i> o <i>E. coli</i> : assenti in 1 g Lieviti e funghi: <10 ² /g (soddisfa le specifiche) Conteggio totale delle piastre: <10 ² /g (soddisfa le specifiche) Challenge test microbiologico (Ph. Eur. 5.1.3): la formulazione impedisce la crescita di tutti i microbi testati
Storia d'uso	Le sostanze botaniche in Botaniplex™ Clear hanno un livello di sicurezza ben stabilito dal loro uso nella TCM
Sensibilità cutanea	Patch test eseguito su ogni singolo estratto botanico Nessuna reazione cutanea osservata
Studio in vivo	Nessun effetto collaterale osservato nei 12 giorni di prova del prodotto contenente l'11,5% di Botaniplex™ Clear
Valutazione tossicologica	Un tossicologo qualificato ha condotto una valutazione della sicurezza secondo il (CE) n.1223-2009, prendendo in considerazione tutti gli ingredienti singolarmente e in combinazione con altri ingredienti cosmetici. Per un prodotto topico permanente contenente Botaniplex™ Clear, il tossicologo conclude che non vi sono probabili pericoli per la sicurezza.

Riassunto dei risultati degli studi in vivo e in vitro

Botaniplex™ Clear possiede attività antinfiammatoria e di bilanciamento del microbioma, come dimostrato dagli esperimenti cellulari e batteriologici *in vitro*. Queste bioattività sono considerate la base della provata efficacia clinica di Botaniplex™ Clear contro l'acne.

SICUREZZA

I costituenti di Botaniplex™ Clear hanno dimostrato sicurezza in nu-

merosi studi clinici e nei prodotti finiti sul mercato da molti anni. Nella **Tabella 2** sono riportate le principali informazioni a supporto.

APPLICAZIONI E MODALITÀ D'USO

Botaniplex™ Clear è un ingrediente adatto per essere utilizzato in lozioni, creme e unguenti topici, per il trattamento di condizioni quali acne e follicolite. Gli usi suggeriti includono formulazioni preventive, ad esempio per ridurre l'insorgenza di brufoli nella pelle a tendenza ac-

neica o ridurre la gravità dei sintomi e promuovere la guarigione delle lesioni infiammate e infette.

Il livello di utilizzo raccomandato per face care, skin care, body care è di 1-12%; per formule di trattamento spot è >12%.

BIBLIOGRAFIA

1. Bomstein Y, Marder J (2017) Synergistic herbal compositions with prebiotic properties for treatment of acne, Patent Application Publication WO2018087766A1.
2. Barak-Shinar D, Draelos ZD (2017) A Randomized Controlled Study of a Novel Botanical Acne Spot Treatment. *J Drugs Dermatol* 16(6):599-603

INTERCOS

Estratto lipidico del *silverskin*

La valorizzazione di un sottoprodotto del caffè come modello di economia circolare in cosmetica

L'economia circolare rappresenta un nuovo approccio olistico allo sviluppo industriale, pensato per portare beneficio alle attività imprenditoriali, alla società e all'ambiente. L'eliminazione degli scarti e dell'inquinamento, l'allungamento del tempo di vita dei prodotti e dei materiali e la rigenerazione dei cicli naturali sono i cardini di questo modello economico che si può sviluppare attraverso differenti strategie con lo scopo di dare vita a un'"ecologia industriale", in contrasto con il modello lineare "prendi, consuma, produci e butta" (1).

Nel mondo della ricerca sulle materie prime per differenti campi di applicazione, la valorizzazione di sottoprodotti agroindustriali ottenuti da processo di recupero e trasformazione in substrati alternativi è uno degli aspetti più interessanti di questo nuovo sistema.

Negli ultimi anni, la sensibilizzazione globale alla lotta al cambiamento climatico e alla salvaguardia del nostro Pianeta ha stimolato anche

il mondo della cosmetica a soffermarsi sull'importanza della tutela dell'ambiente attraverso l'attenzione alle materie prime e ai processi produttivi. L'interesse delle consumatrici verso l'origine degli ingredienti e ai danni che gli stessi potrebbero causare alla salute e all'ambiente ha incrementato esponenzialmente le richieste di prodotti ecologici ottenuti tramite risorse sostenibili a basso impatto ambientale.

Il bando delle microplastiche (2) e l'impiego di olio di palma "sostenibile" certificato RSPO sono un esempio di come il mondo cosmetico si stia impegnando ad offrire prodotti il cui intero ciclo di vita sia il più possibile rispettoso verso il nostro Pianeta.

Per questo motivo, la creazione di modelli secondo i criteri dell'economia circolare sta assumendo una certa rilevanza anche in cosmetica, per poter rimanere al passo con il possibile cambio radicale dei sistemi economici e di sviluppo.

Claudio Pirovano

claudio.pirovano@intercos.com

www.intercos.com

La materia prima qui presentata viene ottenuta dalla valorizzazione del *silverskin*, il sottoprodotto principale della tostatura del caffè.

Durante il processo di torrefazione, i chicchi di caffè si espandono, provocando il distacco del tegumento che diventa il principale scarto del processo di torrefazione. Attualmente, questa pellicina viene parzialmente utilizzata come combustibile o per il compostaggio e la concimazione del suolo.

Principalmente però viene scartata come rifiuto solido. Il *silverskin* è potenzialmente una fonte di numerosi composti bioattivi che possono essere estratti e ulteriormente utilizzati per l'alimentazione, la cosmesi e il campo farmaceutico. Il *silverskin* è considerato un candidato per la sostituzione di principi attivi di sintesi grazie al suo potenziale antiossidante, alla presenza di composti fenolici e contenuto in caffeina (3). Inoltre, la sua composizione ricca in trigliceridi, acidi grassi liberi e steroli (4) lo rende promettente anche come emolliente.

Lo sviluppo della materia prima presentata in questo articolo è frutto dei risultati nati all'interno del pro-

getto *Circular Coffee* (CirCo) (5), per un utilizzo del *silverskin* sostenibile e innovativo nell'industria cosmetica e nell'industria della carta. Il progetto ha permesso la messa a punto dei parametri di estrazione della frazione lipidica e la conseguente caratterizzazione e valutazione come materia prima cosmetica in prodotti di makeup.

Il traguardo successivo riguarda la creazione a livello industriale della filiera per arrivare all'effettivo scale-up del processo di ottenimento della materia prima e alla successiva commercializzazione dei prodotti cosmetici che la contengono.

L'estrazione con CO₂ supercritica, selezionata come metodo estrattivo alternativo rispetto a quelli classici a solvente, è promettente dal punto di vista della qualità dell'estratto e della sostenibilità del processo.

CirCo ha coinvolto diversi gruppi di ricerca del modo accademico e industriale con lo scopo di creare un modello in grado di abbracciare l'approccio sempre più emergente dell'economia circolare, adottando concetti come simbiosi industriale, ecodesign e *Life Cycle Thinking* (LCT).

COMPOSIZIONE E SPECIFICHE TECNICHE

Le caratteristiche tecniche dell'estratto lipidico del *silverskin* sono riportate in **Tabella 1**.

APPLICAZIONI E MODALITÀ D'USO

Il carattere semi-solido dell'estratto lipidico suggerisce una potenziale applicazione del materiale come emolliente cosmetico. Per questa ragione, la valutazione del suo comportamento termico e delle sue caratteristiche sensoriali e di trasformazione di fase può dare indicazioni importanti sulla formulazione e sul processo in cui questo ingrediente può essere utilizzato. Le analisi DSC riportate in **Figura 1** mostrano una curva di fusione allargata con un massimo a 47°C e un picco secondario a 38°C, con una coda tra i 50 e i 55°C. La curva di raffreddamento presenta un picco di cristallizzazione a 44°C. La presenza di picchi multipli e di una curva larga è tipica delle miscele. Come descritto, l'estratto lipidico del *silverskin* si presenta come una pasta semi-solida di colore giallo tenue, ricca in acidi grassi liberi, steroli, digliceridi e trigliceridi che fondono completamente a una temperatura di 50°C.

Le proprietà organolettiche riscontrate e una composizione chimica peculiare distinguono il materiale ottenuto da oli e burri cosmetici classicamente utilizzati in cosmetica. La pasta si caratterizza infatti per un gradevole e particolare tocco fondente, e una proprietà filmante molto interessante. Sulla base dei risultati ottenuti, i primi prototipi di makeup ottenuti inserendo l'estratto rientrano nelle categorie di prodotti

Tabella 1 • Caratteristiche tecniche dell'estratto lipidico del *silverskin*

Caratteristiche organolettiche	
Aspetto	Pasta semi-solida
Colore	Giallo tenue
Odore	Caratteristico
Caratteristiche chimico-fisiche	
L'estratto che si presenta come una pasta a temperatura ambiente mostra dalle analisi DSC (Fig.1) una curva di fusione allargata con un massimo a 47°C e un picco secondario a 38°C, con una terminazione tra i 50 e i 55°C. La presenza di picchi multipli e di una curva larga è tipica delle miscele	
Composizione	
Acidi grassi liberi (% mol)	28,8
<i>Composizione acidi grassi (% mol)</i>	
C14:0	0,7
C16:0	32,4
C18:0	7,1
C18:1	9,1
C18:2	29,5
C20:0	9,3
C22:0	10,4
C24:0	1,5
SFA* (% mol)	61,4
UFA**/SFA	0,63
Insaponificabili (qualitativa)	β-sitosterolo, campesterolo, stigmasterolo
Caffeina (mg/g)	0,4
Contaminanti	
Ocratossina A µg/kg	assente (<0,5)
*SFA: acidi grassi saturi **UFA: acidi grassi insaturi	

anidri e polveri, dove la frazione lipidica è utilizzata rispettivamente come emolliente e legante.

I test di compatibilità preliminare sono stati eseguiti in sistemi binari in cui la pasta è stata aggiunta a due dei principali oli cosmetici, diisostearil malato e octildodecanolo (olio/estratto lipidico *silverskin* 9:1).

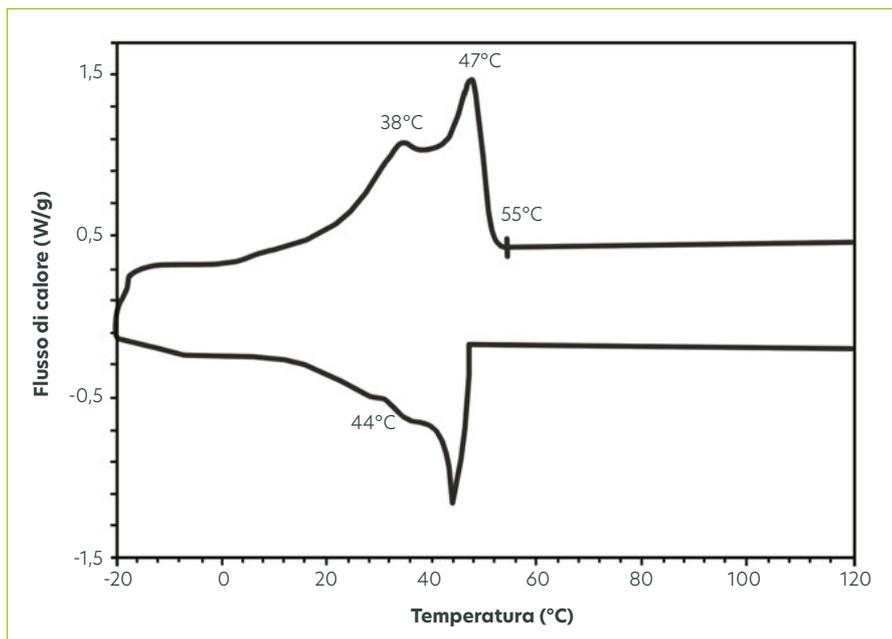


Figura 1 • Analisi DSC della frazione lipidica del *silverskin*

Quello che emerge è che la frazione lipidica è parzialmente solubile, presentando un leggero precipitato. Tuttavia, la presenza di cere o gelificanti lipofili nel sistema olio/estratto lipidico *silverskin* si sono dimostrati cruciali in termini di omogeneità e stabilità delle fasi. Infatti, il sistema ternario costituito dalla combinazione di diisostearyl malato e octildecano/estratto lipidico *silverskin*/cera sintetica o microcristallina (rapporto 8:1:1) conferisce una struttura uniforme. La materia prima risulta inoltre completamente compatibile con gli oli vegetali, soprattutto grazie alla sua affinità in termini di composizione chimica.

La **Tabella 2** riporta un esempio di formulazione di un fluido labbra anidro, in cui la frazione lipidica del *silverskin* è stata inserita al 3% in formula. Elevata lucentezza, comfort, lunga tenuta, sensazione di idra-

tazione ed effetto cushion sono le caratteristiche vantate da questo prodotto. Infatti, l'ottimale combinazione di gelificanti lipofili e oli di origine naturale conferiscono pienezza e spessore alla texture. Inoltre, il mix degli oli agisce da filmogeno incrementando la tenuta sulle labbra.

Tabella 2 • Formulazione di un fluido labbra con estratto di *silverskin*

Fase A	WT%
Pigmenti	8
Eccipiente	3
Emollienti	34
Olio vegetale	7
Modificatore reologico	2
Fase B	WT%
Emollienti	16
Filmogeno	2
Fase C	WT%
Emollienti	21
Gelificante oli	4
Fase D	WT%
Estratto lipidico <i>silverskin</i>	3

Tabella 3 • Formulazione di una polvere con estratto di *silverskin*

Fase A	WT%
Emollienti	15
Olio silconico	7
Modificatore reologico	1
Cera	5
Estratto lipidico <i>silverskin</i>	1
Fase B	WT%
Conservanti	0,5
Fase C	WT%
Eccipiente	35,5
Pigmenti	35

Lo stesso estratto è stato poi testato in un ombretto in qualità di legante. La materia prima è stata utilizzata al 3,5% della fase grassa in combinazione con una cera polare (**Tab.3**). Il risultato è una polvere compatta che, sulla base dall'analisi sensoriale da parte di un panel di valutatori qualificati, può essere descritta come cremosa e dalla texture ricca, caratterizzata da finish luminoso, da un'elevata scrivenza e una buona aderenza in applicazione.

BIBLIOGRAFIA

1. www.ellenmacarthurfoundation.org
2. echa.europa.eu/hot-topics/microplastics
3. Bessada SMF, Alves RC, Oliveira MBPP (2018) Coffee Silverskin: A Review on Potential Cosmetic Applications. *Cosmetics* 5(1), 5, doi:10.3390/cosmetics5010005
4. Toschi TG, Cardenia V, Bonaga G et al (2014) Coffee silverskin: characterization, possible uses, and safety aspects. *J Agric Food Chem* 62(44):10836-10844
5. progettocirco.it

Il modello Benefit si diffonde tra le imprese del comparto dei prodotti naturali per la salute e la cosmesi

Le Società Benefit (SB) rappresentano un'evoluzione del concetto stesso di azienda. Mentre le società tradizionali esistono con l'unico scopo di distribuire dividendi agli azionisti, le SB sono espressione di un paradigma più evoluto: integrano nel proprio oggetto sociale, oltre agli obiettivi di profitto, lo scopo di avere un impatto positivo sulla società e sulla biosfera. L'Italia è il primo Stato sovrano al mondo a dotarsi, già alla fine del 2015, di una legislazione specifica per le SB, considerate elemento alla base del cambio di paradigma economico e asset strategico italiano. Secondo Assobenefit, l'associazione nazionale delle imprese che adottano questo tipo di statuto, "le Società Benefit sono imprese ibride che, oltre allo scopo di dividere gli utili, perseguono una o più finalità di beneficio comune e operano in modo responsabile, sostenibile e trasparente nei confronti di persone, ambiente e stakeholders, impegnandosi a valutare in maniera trasparente il proprio impatto. Le Società Benefit pongono al centro le persone, le relazioni e i territori come valore, dando così risposta a bisogni sociali e aiutando a governare questa transizione in modo virtuoso". È facile riconoscere in queste idealità molte delle motivazioni fondanti delle imprese del settore naturale. Forse è anche per questo che tra i partner di Assobenefit figura al primo posto Assobio, l'associazione nazionale delle imprese di trasformazione e distribuzione dei prodotti biologici e naturali. La prima esperienza di SB che abbiamo incontrato nel nostro settore è stata Aboca.

L'elenco ora si sta ampliando, e dal settore della cosmesi naturale segnaliamo la trasformazione in SB de l'Erbo-



lario e, in Europa, di Weleda. Società Benefit è diventata recentemente anche EVRA srl, del gruppo VOS, azienda di filiera che si dedica alla produzione di estratti vegetali di alta qualità da specie vegetali coltivate o spontanee, dal Parco Nazionale del Pollino in Basilicata.

ZERO e IDRO ISEO insieme per la creazione del Future Farming District in Lombardia

ZERO, start up tecnologica nata a Pordenone nel 2018, è attiva nel campo del vertical farming in Italia e all'estero. Dopo una prima fase di ricerca e sviluppo che ha coinvolto un team multidisciplinare tutto italiano, ZERO ha fatto il suo ingresso nel mercato nazionale e internazionale dell'agritech con ZERO Modular Architecture, una tecnologia hardware-software di proprietà per realizzare in serie, su scala industriale, vertical farm. Una tecnologia che può essere declinata in diversi settori: alimentare, ma anche nutraceutico, farmaceutico, cosmetico e biotecnologico. Tra i principali progetti annunciati da ZERO, la creazione di un sito produttivo innovativo, denominato Future Farming District, a Capriolo, al centro del Parco dell'Oglio, in provincia di Brescia, da realizzare in collaborazione con IDRO ISEO. L'idea mira a creare un nuovo distretto dell'agricoltura, tecnologica, senza terra, sostenibile e accessibile, destinato a divenire uno dei maggiori siti di vertical farming al mondo. L'obiettivo è quello di costruire un ecosistema circolare integrato, unico nel suo genere, scalabile e replicabile in altri contesti, che abbina la produzione locale di energia pulita da fonti rinnovabili (l'attività sarà infatti alimentata dalle centrali idroelettriche sul fiume Oglio) a impianti di coltivazione in vertical farm di taglia e configu-



razione flessibile. Il sito prevede la riqualificazione di un complesso di archeologia industriale di inizio '900, con una superficie di oltre 200 mila metri quadrati e un'area coperta di circa 25 mila metri quadrati affacciati direttamente sull'Oglio. Una volta completato, fornirà alla grande distribuzione insalate, erbe aromatiche e micro-greens, oltre a fragole e altre varietà alimentari.

L'avvio della produzione è previsto entro la primavera del 2022, con un progressivo incremento della capacità produttiva. Un'iniziativa ad alto valore da cui sono attese ricadute economico-sociali positive su tutto il territorio: dal recupero progressivo di un sito industriale, con un progetto che interpreta al meglio la transizione ecologica, alla creazione di decine di posti di lavoro per personale ad alta specializzazione.

Apicoltura Piana adotta l'arnia intelligente per monitorare la salute dell'alveare e dell'ambiente

Apicoltura Piana ha scelto di affidarsi a un innovativo sistema di monitoraggio per arnie messo a punto da Melixa s.r.l., un'innovativa start up costituita da ricercatori e docenti universitari che insieme hanno ideato il Melixa System. Si tratta di un sistema modulare, configurabile secondo le esigenze dell'apicoltore e composto da una serie di moduli studiati per il monitoraggio continuo di tutte le fasi del lavoro delle api, con la possibilità di raccogliere e trasmettere dati al server pronti per essere elaborati.

Il sistema Melixa rileva la produzione di miele attraverso una bilancia posta sotto l'arnia, controlla la popolosità e il benessere delle colonie con l'esclusivo apparato "contavoli", monitora le condizioni ambientali interne ed esterne all'arnia e, grazie alle telecamere, offre un controllo visivo e immediato dell'apiario. Attraverso questa attività, Apicoltura Piana consolida il proprio approccio rispettoso e consapevole del ruolo degli impollinatori nei delicati equilibri naturali. Massimo Mengoli, amministratore delegato di Apicoltura Piana, dice: "Abbiamo investito su questo sistema di monitoraggio sia per migliorare la produzione sia per aumentare la conoscenza sul mondo delle api in un momento storico in cui gli impollinatori sono sottoposti a gravi stress e la loro attività, fondamentale per la vita sul Pianeta, è fortemente a rischio. Con Melixa System saremo in grado di misurare la produzione, le condizioni dell'arnia e il benessere delle colonie di api, pronti a intervenire solo quando serve e a raccogliere dati utili a migliorare il nostro lavoro e a diffondere conoscenza sul mondo delle api". Apicoltura Piana, nata nel 1903 a Castel San Pietro Terme nel bolognese, da oltre un secolo lavora e confeziona miele, proponendo semilavorati e prodotti finiti sia a marchio proprio che per conto di terzi. L'azienda dedica la massima attenzione alla selezione e al controllo qualità dei mieli in ogni fase, garantendo una produzione di altissima qualità. Oltre alla certificazione Kosher, Halal e la tracciabilità ISO 22005, l'azienda è certificata BIOAGRICERT, HACCP, UNI EN ISO 9001, IFS e BRC per la tutela dell'ambiente e dei consumatori. Lavora ogni anno 5000 tonnellate di miele per presidiare il 20% del mercato italiano ed è conosciuta in tutto il mondo.



Naturale e biologico

Ritorno al passato o cosmesi innovativa?

NATRUE



Intervista a **Mark Smith**,
direttore generale NATRUE
a cura di *Demetrio Benelli*

NATRUE è l'Associazione Internazionale per la Cosmesi Naturale e Biologica, con sede a Bruxelles. Dal 2007 promuove e protegge l'autentica cosmesi naturale e biologica. Ad oggi conta più di 70 aziende associate in circa 30 Paesi differenti. Il logo NATRUE permette di riconoscere immediatamente i prodotti che contengono un'elevata percentuale di ingredienti naturali o biologici. Lo standard definisce 13 categorie di prodotto, differenziando ad esempio creme, oli, shampoo e prodotti per l'igiene orale. In questo modo si può ottenere il massimo livello di naturalità tenendo conto della funzionalità del prodotto cosmetico. Rigorosi criteri e processi di certificazione indipendenti garantiscono il più alto grado di qualità della cosmesi naturale e biologica nell'interesse dei consumatori. Oltre 7000 prodotti da oltre 330 marchi hanno adottato il marchio NATRUE in tutto il mondo. Con Mark Smith, Direttore Generale dell'Associazione, abbiamo discusso gli aspetti innovativi e le tendenze di sviluppo di questo importante ambito del comparto cosmetico.

D. *La considerazione dell'impatto ecologico è la tendenza che negli ultimi anni sta caratterizzando la creazione di nuovi prodotti cosmetici in tutto il mondo, anche se spesso i suoi vari aspetti possono differire leggermente l'un l'altro. Ritieni che questa scelta, che risponde a un'esigenza affermata più volte dal pubblico dei consumatori, porti con sé anche una trasformazione in senso innovativo del prodotto cosmetico negli ingredienti, nelle formulazioni e nelle funzionalità ricercate?*

R. Quando si parla di prodotti cosmetici, in particolare di quelli naturali e biologici, i consumatori esigono grande trasparenza per quanto riguarda gli ingredienti, la loro provenienza, chi li produce, come sono realizzati e infine quale impatto ambientale generano.

Le materie prime rinnovabili presentano importanti elementi positivi da tenere a mente, tra cui il miglioramento della redditività e della competitività del prodotto, il potenziale di innovazione, il miglioramento delle prestazioni a livello ambientale e la diversificazione dei prodotti.

Ciò nonostante, questi fattori potrebbero non essere privi di vincoli, come ad esempio i costi di produzione più alti per queste materie prime rispetto a quelle già esistenti a base di combustibili fossili, l'aumento o le fluttuazioni dei costi per le fonti rinnovabili, la capacità di ottenere da ingredienti naturali le stesse qualità o caratteristiche funzionali per certe categorie di prodotti, la disponibilità dei fondi necessari per la ricerca e sviluppo e/o per l'investimento di capitali.

La crescita dell'innovazione guidata dalla chimica verde è ormai un fatto ineludibile, non solo a causa della spinta dei consumatori, ma anche grazie all'influenza di fattori aggiuntivi come la nascita e l'evoluzione del

quadro politico-normativo legato al Green Deal dell'Unione europea e l'aumento di interesse degli investitori nella sostenibilità.

D. L'adozione di uno standard di garanzia come quello di NATRUE, e la relativa certificazione, comporta ulteriori vincoli organizzativi e produttivi per un'impresa cosmetica già soggetta a molti controlli e adempimenti. Realizzare un cosmetico naturale può offrire anche dei vantaggi al formulatore e all'impresa nelle varie fasi della produzione, oltre a quelli di rispondere meglio alle attese del consumatore?

R. Il vantaggio di usare standard privati che stabiliscono criteri per i prodotti, affinché questi ultimi possano ottenere un marchio di certificazione da parte di organismi terzi, è quello di offrire ai consumatori la garanzia che le caratteristiche riportate sul prodotto, come naturale e biologico, hanno rispettato i requisiti verificabili del marchio. In conformità con altre normative settoriali, la certificazione può rafforzare la fondatezza dei claim.

Per il produttore la certificazione può fornire un ulteriore elemento di validità e comparabilità, oltre che un benchmark di differenziazione dagli altri prodotti sul mercato.

Il controllo da parte di enti terzi per mappare le caratteristiche tracciabili di una materia prima attraverso la catena di custodia fino al prodotto finito fornisce al formulatore sia le linee guida, sia una validazione preliminare quando si tratta di selezionare una gamma di materie prime. I cosmetici naturali presentano una base per un approccio olistico di progettazione sostenibile. Per il formulatore questo può significare non solo una maggiore portata del potenziale di innovazione applicato a diverse categorie di prodotti, da quelli per i capelli a quelli per l'igiene orale, ma anche la capacità di selezionare le materie prime in base a fattori di sostenibilità sociale e ambientale che partono dal reperimento (ad esempio coltivazione) fino alla fase di rilascio nell'ambiente dopo l'utilizzo.

D. Il vostro standard viene aggiornato con regolarità in base alle nuove proposte del mercato: con quali modalità vengono proposti e ammessi nuovi ingredienti o nuove procedure o processi estrattivi innovativi che possono essere di particolare interesse per il formulatore dell'industria cosmetica?

R. Lo standard NATRUE, che stabilisce i criteri del marchio, è definito, interpretato e sviluppato da un organo consultivo imparziale e indipendente, il Comitato Scientifico NATRUE, che è composto in modo bilanciato da esperti interni (membri NATRUE) ed esterni (professionisti dei settori della cosmesi convenzionale o naturale e biologica indipendenti da NATRUE).

Ogni nuova sostanza o metodologia deve essere proposta da un'azienda attraverso un Certificatore Approvato NATRUE (NAC). Ogni caso viene prima verificato dal certificatore, che fa poi richiesta a NATRUE, la quale valuta internamente la coerenza con i criteri stabiliti dallo standard o la possibilità eventuale di modificare i criteri (ad esempio, nel caso di aggiornamenti dei metodi di estrazione o di nuovi metodi di produzione).

Successivamente viene interpellato il Comitato Scientifico NATRUE per le valutazioni finali in base alle informazioni fornite e che si esprime su qualsiasi aggiornamento dei criteri o sulla modifica degli allegati.

Lo standard NATRUE è dinamico, e anche se determinati valori etici restano saldi al suo interno, esso è aperto ad aggiornamenti quando si presentano nuove innovazioni e tecnologie.

D. Nella gamma dei prodotti certificati NATRUE è possibile notare un'ampia variabilità botanica tra i prodotti che via via si stanno aggiungendo dai vari Paesi del mondo?

R. Le materie prime possono venire da diverse parti del globo, come oli ed estratti di Citronella dall'Asia per i profumi o i trattamenti per la pelle fino al burro di Karité dall'Africa occidentale usato nelle creme per le mani. La diversità degli estratti naturali resta alta, anche se le richieste dei consumatori in termini di sostenibilità e

i cambi degli obblighi normativi possono influenzare la selezione delle sostanze da questa palette globale.

Gli estratti non devono essere limitati a una parte di una specie botanica, dal momento che possono essere usati il seme, la radice, la foglia o la corteccia; quindi, oltre alla variabilità botanica c'è anche il potenziale per una diversità degli estratti. Tuttavia, l'accesso a questo range di ingredienti internazionali può essere influenzato dai costi, dalla qualità, dalla sostenibilità (ad esempio l'impatto sociale ed ecologico dell'approvvigionamento e dell'estrazione), dalla possibilità di reperire le materie prime e infine dalla disponibilità dei volumi necessari. Di conseguenza, la scelta degli ingredienti dipenderà, in ultima sede, dalle scelte del produttore che li userà sulla base delle loro funzionalità necessarie alla formulazione, alla sicurezza e all'efficacia dei prodotti.

Tutte le materie prime certificate e approvate, insieme alla lista degli ingredienti, si trovano sul sito di NATRUE.

D. Per le materie prime ammesse dal vostro standard richiedete anche dossier relativi ad ABS e regolamento di attuazione del Protocollo di Nagoya? Verificate altri requisiti legati alla difesa della biodiversità delle fonti di provenienza delle materie prime?

R. La conferma della conformità alle norme ABS che attuano il Protocollo di Nagoya non è richiesta dai certificatori (NAC) durante la verifica dei criteri per il marchio NATRUE. La ragione è che, dove queste normative esistono, esse sono legge. Di conseguenza, la responsabilità è del fornitore e/o del produttore che deve conformarsi alla legge ancor prima che a uno standard privato. In altre parole, la certificazione per uno standard privato non è una deroga dagli obblighi legali di un'azienda. Quindi, proprio come con la conformità al Regolamento UE sui cosmetici, la conformità all'ABS è fuori dall'ambito delle disposizioni NATRUE per evitare duplicazioni e ridondanza.

D. La vostra associazione collabora per lo sviluppo della sua attività con enti di ricerca scientifica? Su quali tematiche avete dei progetti in corso?

R. Oltre al coinvolgimento del Comitato Scientifico NATRUE su temi tecnici relativi ai criteri per l'etichetta, NATRUE è partner dell'iniziativa del consorzio industriale finanziata dall'UE UR BIOFIN (www.urbiofin.eu). Questo progetto, che è finanziato nell'ambito del programma di ricerca e innovazione Horizon 2020 dell'Unione europea attraverso la Circular Bio-based Europe Joint Undertaking (CBE JU), mira a trasformare la parte organica dei rifiuti solidi urbani in sostanze e materiali bio-based, compresi quelli per il packaging dei prodotti, per muoversi nella direzione di una bioeconomia più sostenibile. NATRUE, ad esempio, era già stata precedentemente coinvolta in progetti per sviluppare tensioattivi a partire da materiale di scarto organico.

NATRUE è inoltre sponsor della Rete informativa dei dipartimenti di dermatologia (IVDK) e lavora con IVDK per promuovere la sicurezza degli ingredienti basata su dati clinici, soprattutto per i composti di fragranze naturali come gli oli essenziali. La IVDK opera insieme a 56 cliniche per la pelle in Germania, Svizzera e Austria, e registra, analizza e genera dati e informazioni necessarie per la prevenzione di allergie da contatto.

Come parte del suo impegno per la sicurezza degli ingredienti, NATRUE e i suoi membri collaborano anche con altre associazioni nell'ambito della produzione di dati scientifici e della presentazione di fascicoli tossicologici all'organismo indipendente di valutazione dei rischi della Commissione dell'UE, il Comitato scientifico per la sicurezza del consumatore (SCCS).

D. L'attribuzione della connotazione di "naturale" e "biologico" a un prodotto cosmetico secondo criteri certi e condivisi deve combattere ogni giorno con la pratica del greenwashing. Oggi la sostenibilità diventa il valore nuovo da promettere al consumatore. Da questo punto di vista, quali saranno i criteri fondamentali che andranno ricercati per distinguere pratiche davvero sostenibili dal falso eco-friendly?

R. Nella spinta di tutte le aziende ad adattarsi alla transizione verde, soddisfacendo allo stesso tempo le ri-

chieste dei consumatori, un certo grado di greenwashing riguardo le dichiarazioni di sostenibilità (ad esempio “alta sostenibilità sociale” oppure “ridotto impatto ambientale”) sarà inevitabile.

Per affrontare pratiche scorrette e affermazioni ingannevoli, i produttori avranno bisogno di assicurare che le affermazioni siano verificabili. Una possibilità a tal fine è scegliere di certificare le proprie catene di approvvigionamento, in combinazione con una maggiore enfasi sui prodotti eco-progettati che tengono a mente i tre pilastri della sostenibilità (ambientale, sociale ed economica) e della circolarità. Garantire la conoscenza lungo l'intera catena di custodia è fondamentale per supportare le varie caratteristiche del prodotto e soddisfare così le richieste.

L'industria oggi ha la possibilità di generare criteri di autoregolamentazione, metodologie e pratiche migliori per scoraggiare affermazioni non scientificamente fon-

date e guidare la competizione verde e l'innovazione sostenibile. Tuttavia, per ottenere risultati in materia di sostenibilità, sarà senza dubbio necessario che il regolatore aggiorni il quadro normativo e stabilisca i parametri per i prodotti e i claim. Questo può significare leggi migliori sulla protezione dei consumatori per rafforzarne il processo decisionale informato o la standardizzazione degli strumenti utilizzati per supportare le dichiarazioni sui prodotti e gli ingredienti. I criteri armonizzati possono aiutare sia l'industria che il controllo interno del mercato, affinché le leggi siano attuate correttamente. Come nel caso dell'UE, molte di queste iniziative, comprese quelle relative alla “due diligence” nella catena di approvvigionamento, per fortuna sono già in opera, mentre le azioni di attuazione dell'EU Green Deal vengono realizzate.

PER INFORMAZIONI

www.natrue.org

Nuove evidenze scientifiche sulla sicurezza dell'Aloe

SISTE richiede alla Commissione europea di rivedere il divieto

info@sisteweb.it • www.sisteweb.it

L'8 aprile 2021 è entrato in vigore un regolamento della Commissione europea che, sulla base di un'opinione dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) risalente al 2018, vieta in tutta Europa la vendita di preparati, in particolare integratori alimentari, che contengano alcune sostanze presenti nelle foglie dell'Aloe, come aloe-emodina (una delle principali sostanze idrossiantraceniche presenti, per altro, nell'Aloe ma anche in molte altre specie vegetali), bollate come genotossiche, cioè in grado di modificare il DNA in test su cellule isolate.

Gli estratti di *Aloe* spp., però, sono stati usati da sempre come rimedio tradizionale per favorire il transito intestinale e ammessi all'uso negli integratori alimentari per tale scopo dal Ministero della salute italiano a partire dagli anni 2000, nonché usati nei farmaci per la stipsi e ammessi tutt'ora, ad ogni modo, per tali finalità dalle principali agenzie regolatorie internazionali come l'Agenzia europea per i medicinali (EMA) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Il divieto dello scorso aprile ha quindi creato non poco trambusto tra i produttori, spesso popolazioni tra le più povere al mondo che vivono unicamente grazie a tale coltivazione, e i consumatori, privati di un rimedio tra i più utilizzati soprattutto tra gli anziani, e non ha mai smesso di essere al centro dell'interesse degli addetti ai lavori.

In occasione del convegno della Società Italiana di Tossicologia (SITOX) che si è svolto a Bologna nello scorso mese di novembre, sono stati presentati i risultati di due lavori sul tema, pubblicati su importanti riviste scientifiche internazionali. Il primo, apparso su *Toxicology Reports*, dimostra come il succo di *Aloe ferox* essiccato sia sicuro per gli integratori alimentari e nei fitoterapici, medicinali

a base di erbe; il secondo, su *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, ha dimostrato invece la sicurezza dell'aloemodina attraverso uno studio basato sulla somministrazione di diversi dosaggi di questa sostanza.

Corrado Galli, autore dei lavori, ha commentato: "Come i nuovi dati oggi disponibili dimostrano inequivocabilmente il divieto all'uso degli estratti dell'Aloe in Europa, ritenuto ingiustificato dalla comunità scientifica stessa alla luce della incertezza dei dati scientifici usati da EFSA per la sua valutazione, risulta quindi privo di motivazioni scientifiche".

Marinella Trovato, la presidente della Società Italiana di Scienze Applicate alle Piante Officinali e ai Prodotti per la Salute (SISTE), ha dichiarato: "L'Aloe è sicura, lo confermano recenti e autorevoli studi. Vorrà ora la Commissione europea, sulla base di questi nuovi dati, prendere in considerazione le nuove informazioni e porre rimedio a una decisione che ha messo in ginocchio un'intera filiera?".

SISTE e SITOX si augurano, quindi, che la Commissione europea riveda le sue decisioni e riammetta sul mercato l'Aloe e le preparazioni a base di questa sostanza negli alimenti. Una richiesta notificata alla Commissione europea, controfirmata anche da ASSOERBE e Federimpresaerbe, e che attende una rapida risposta.

La nuova legge sull'agricoltura biologica fa un passo avanti, ma non ancora definitivo

L'Italia, con oltre 80 mila operatori, è tra i Paesi leader per la produzione biologica ed è il primo Paese in Europa (secondo al mondo) nell'esportazione di prodotti bio, con oltre 2,9 miliardi di euro, circa il 6% di tutto l'export agroalimentare nazionale.

Una veloce approvazione del DDL n. 988 *Disposizioni per la tutela, lo sviluppo e la competitività della produzione agricola, agroalimentare e dell'acquacoltura con metodo biologico* è fondamentale per supportare la transizione ecologica dell'agricoltura italiana. Introduce elementi particolarmente significativi come la possibilità di registrare il marchio biologico "Made in Italy", di istituire distretti biologici che consentano di sviluppare l'agricoltura e l'economia dei territori rurali, e di adottare un Piano nazionale per favorire lo sviluppo del biologico italiano come metodo avanzato dell'approccio agroecologico.

Dopo 13 anni e 3 legislature, la Camera dei Deputati ha approvato all'inizio di febbraio l'emendamento che toglie il termine biodinamico dal comma 3 dell'articolo 1.

In ragione di questa modifica è richiesto un ulteriore passaggio al Senato per l'approvazione definitiva.

Maria Grazia Mammuccini, presidente di FederBio, ha dichiarato: "Al terzo passaggio parlamentare ci aspettavamo l'approvazione definitiva della legge, invece prendiamo atto della decisione unanime del Parlamento di modificare il terzo comma dell'articolo 1.

L'urgenza che si arrivi presto alla conclusione di un iter di approvazione della Legge è dettata dalla centralità del biologico per l'intero comparto agroalimentare: contiamo di avere adesso una corsia privilegiata al Senato per una veloce approvazione nei tempi che sono stati annunciati durante la discussione parlamentare".

Conferenza Stato-Regioni: passa il Decreto sulle piante officinali

Nella riunione del 12 gennaio scorso della Conferenza Stato-Regioni, è stata raggiunta l'intesa sul Decreto del

Ministro Stefano Patuanelli relativo alle piante officinali, adottato di concerto con il Ministero della Transizione Ecologica e con il Ministero della Salute.

L'intesa raggiunta permette di definire l'elenco delle specie di piante officinali coltivate e i criteri di raccolta e prima trasformazione delle specie di piante officinali spontanee. Lo schema di decreto interministeriale recepisce quanto disposto dagli articoli 1 e 3 del Decreto legislativo n.75/2018 *Testo unico in materia di coltivazione, raccolta e prima trasformazione delle piante officinali*. Viene introdotto un quadro normativo innovativo a livello europeo per il comparto delle piante officinali, a beneficio delle moltissime aziende agricole interessate ad avviare un'attività di coltivazione e prima trasformazione. Il Decreto offre una prospettiva di diversificazione di grande interesse per la nostra agricoltura, patrocinando un comparto in grado di attrarre risorse e investimenti, e di favorire nuova occupazione, specie giovanile, proprio nella filiera primaria.

La regolamentazione della raccolta delle specie selvatiche e la prescrizione di precisi obblighi formativi per chi intenda praticarla rappresenta, inoltre, un ulteriore strumento di difesa della biodiversità. Il testo è stato ampiamente discusso e condiviso, sia sul piano tecnico che giuridico, nell'ambito dei lavori svolti dal Tavolo tecnico delle piante officinali istituito nel 2019 presso il MiPAAF, e si basa sull'ampio e approfondito lavoro di raccolta e analisi di dati scientifici svolto da docenti universitari ed esperti degli Enti di ricerca accreditati, con la collaborazione attiva dei rappresentanti delle istituzioni coinvolte, degli ordini professionali, delle associazioni dei produttori agricoli, delle imprese del settore e dei rappresentanti delle Regioni.

Nelle prossime settimane, dopo la firma dei Ministri interessati, il testo del decreto sarà pubblicato e disponibile in Gazzetta Ufficiale.

Piante medicinali e antibiotico-resistenza

Indicazioni multidisciplinari dal webinar ISB-CNR

A cura di Demetrio Benelli

L'Istituto per i Sistemi Biologici (ISB) è di recente costituzione nell'ambito del Consiglio Nazionale delle Ricerche, avendo preso il via nel 2019 con l'obiettivo di studiare i meccanismi chimici, fisici e bio-molecolari che regolano l'organizzazione e le funzioni dei sistemi biologici.

L'approccio interdisciplinare caratterizza il metodo di lavoro che l'Istituto si è dato, integrando competenze di chimica, biologia, microbiologia, pedologia e analisi dei sistemi, allo scopo di acquisire conoscenze su sistemi biologici complessi, in vista di un loro utilizzo nel settore bio-agroalimentare.

Ispirandosi a principi di bioeconomia ed economia circolare, sviluppa processi sostenibili e tecnologie avanzate di ottimizzazione dell'uso delle risorse biologiche per il benessere e il miglioramento della qualità della vita.

Ne sono un esempio, tra i progetti di ricerca a cui l'Istituto partecipa, NUTRAGE, volto a integrare il regime alimentare delle persone anziane con composti bioattivi utili a ritardare i molteplici processi degenerativi legati all'invecchiamento, e OLIVENET, progetto europeo MSCA-RISE- 2016 "Olive-Net" finalizzato allo studio, allo sviluppo e alla valorizzazione di prodotti nutraceutici e cosmetici realizzati con composti biologicamente attivi estratti da frutti e foglie dell'Olivo (*Olea europaea*) e dai prodotti e sottoprodotti della filiera olivicola-olearea.

Le piante medicinali: un campo di ricerca di primario interesse

ISB-CNR ha individuato nelle piante medicinali un ambito di ricerca a cui dedicare una particolare attenzione, alla luce delle stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), per cui esse rappresentano, grazie a pratiche

mediche tradizionali, la principale risorsa terapeutica per due terzi della popolazione mondiale, e per il ruolo che le matrici vegetali hanno nello sviluppo e produzione di farmaci avanzati.

Numerose competenze dell'ISB convergono sullo studio di piante medicinali, dallo sviluppo di *deep eutectic solvents* naturali (NADES) come metodi sostenibili per l'estrazione e la conservazione dei principi attivi, alla valutazione della loro attività biologica (antiossidante, antimicrobica, immunostimolante), alla correlazione tra condizioni pedoclimatiche e di coltivazione e regolazione dell'espressione genica e del metabolismo, all'incapsulamento dei principi attivi in nanoparticelle lipidiche e/o polimeriche. Nell'ottica di creare occasioni per realizzare il trasferimento di risultati, processi, modelli e tecnologie dalla ricerca al tessuto sociale e produttivo, l'Istituto ha realizzato, presso l'area di ricerca Roma 1, un Giardino dei Semplici, con l'auspicio che possa divenire uno spazio per lo scambio di esperienze e di collaborazioni sull'attività biologica dei principi curativi delle piante con altri orti e con il pubblico.

Un confronto sui diversi aspetti del complesso fenomeno dell'antibiotico-resistenza

Come momento conclusivo dell'attività sulle piante medicinali svolta nel corso dell'anno, l'Istituto ha promosso lo scorso novembre un webinar su un tema emergente: la crescente diffusione di fenomeni di antibiotico-resistenza, sempre più rilevanti in ambito sanitario, e il possibile ruolo dei derivati delle piante in una strategia volta al loro controllo.

Il webinar è stato introdotto dalla direttrice dell'istituto, Giovanna Mancini, e coordinato da Giulia Capelli e Francesca Mariani.

Il quadro di riferimento è venuto dai primi due interventi: di Alberto Manzo, coordinatore del Tavolo di Filiera delle Piante Officinali del MIPAAF, che ha sottolineato come il settore primario italiano sia pronto per offrire una vasta gamma di materie prime tracciabili, di provenienza sicura, che potrebbero costituire una fonte di sostanze attive su cui incentrare la ricerca e lo sviluppo di nuovi rimedi vegetali; e di Marcello Iriti, del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università degli Studi di Milano, che ha delineato l'ampia panoramica di casi di studio di agenti antimicrobici di origine vegetale in corso in diversi Paesi del mondo.

Vincenzo di Pilato, del Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate dell'Università degli Studi di Genova, si è incaricato di fare il punto sugli aspetti clinici del controllo dei fenomeni di antibiotico-resistenza. In ambito sanitario, ma sul fronte nutrizionale, l'intervento di Maria Daglia, del Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Napoli, sull'attività antimicrobica di alimenti e integratori vegetali nella prevenzione della carie dentale.

L'approccio fitochimico ha permesso di mettere in luce alcune classi di composti, la cui attività antibatterica sta emergendo in tutta la sua importanza solo da studi recenti: è il caso dei flavonoidi, presentati da Nunziatina De Tommasi, del Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Salerno, e dei fitocannabinoidi, la cui storia fitochimica e biologica è stata ripercorsa con la consueta ampiezza di vedute da Giovanni Appendino, del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale.

Anche per oli essenziali di lungo corso, come *Cinnamomum zeylanicum*, la Cannella, possono sorgere nuovi campi di applicazione: ne sono un esempio i risultati preliminari dello studio presentato da Maura di Vito dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma.

Nel futuro dell'impiego degli oli essenziali, saranno determinanti le nuove tecnologie. Per incidere sulla biodi-

sponibilità, stabilità e sull'efficacia del loro utilizzo salustico e terapeutico, è aperto il fronte delle nanotecnologie: un settore su cui in Italia ci possiamo avvalere della grande esperienza di Anna Rita Bilia, che nel webinar ha presentato alcune nuove metodologie formulative studiate al Dipartimento di Chimica Ugo Schiff dell'Università degli Studi di Firenze, con interessanti prospettive di implementazione su scala industriale.

Confortante anche il contributo che dalle tecnologie informatiche e di *machine learning* potrà venire per arrivare a descrivere prodotti biologici complessi come gli oli essenziali e composti volatili (approccio presentato da Rino Ragno, Dipartimento Chimica e Tecnologia del Farmaco dell'Università di Roma La Sapienza).

Infine, una piena comprensione e strategie di controllo del fenomeno dell'antibiotico-resistenza possono venire solo da una visione evolucionistica ed ecologica del rapporto tra macro e micro nel mondo biologico. In questo senso ha suscitato grande interesse nel webinar la linea di ricerca sull'interazione sistemica che lega microbioma e organismo vegetale, e sulle possibili manifestazioni di questa interazione nella vita della pianta e nei suoi prodotti illustrata da Renato Fani del Dipartimento di Biologia dell'Università di Firenze (e che i nostri lettori ritrovano nel lavoro che l'autore e il suo gruppo ci hanno concesso su questo stesso numero a pp.8).

Un dialogo aperto per il futuro

Un approccio multidisciplinare quello realizzato nel webinar ISB-CNR che ha documentato molto del lavoro già svolto, ma che soprattutto pone le basi e la necessità di una condivisione futura di idee ed esperienze.

Questa la considerazione finale degli organizzatori, che nella proposta conclusiva di Francesca Mariani dovrebbe concretizzarsi nella creazione a breve di uno spazio online condiviso per continuare questo tipo di scambio.

PER INFORMAZIONI

pianta.medicinali@isb.cnr.it

www.isb.cnr.it

A Taiwan, in maggio, il 21° Congresso Internazionale della Società di Etnofarmacologia

ethnopharmacology.org

Il 21° Congresso Internazionale della Società Internazionale di Etnofarmacologia (ISE) si terrà dal 28 al 31 maggio 2022 in modalità ibrida (online e in presenza), promosso e ospitato dalla *China Medical University (CMU)* di Taichung, Taiwan. Al centro del congresso *Etnofarmacologia 2022* ci sarà l'integrazione della medicina tradizionale nella pratica clinica moderna.

I temi annunciati nel programma riguardano moderne tecnologie di analisi e controllo di qualità; avanzamenti della ricerca etnofarmacologica verso la scoperta di nuovi farmaci, con particolare attenzione a studi sulla pandemia di COVID; ricerca sui composti naturali dal Sud-Est asiatico; sfide organizzative e regolatorie per la globalizzazione della medicina tradizionale; database e tecnologia AI per lo studio della medicina tradizionale; programmi di *One Health* e medicina preventiva; interazioni erbe-farmaci e problemi di farmaco-sicurezza; collaborazione accademico-industriale nella modernizzazione della medicina tradizionale e integrazione della conoscenza antica nella pratica clinica moderna.

Il programma dei lavori di *Etnofarmacologia 2022* comprenderà conferenze plenarie, keynote lectures, short lectures e workshop. Per coloro che non possono viaggiare, il congresso resta un'importante opportunità di comunicare e scambiare a distanza conoscenze con scienziati di tutto il mondo.



Verso il 70° Congresso GA a Salonicco

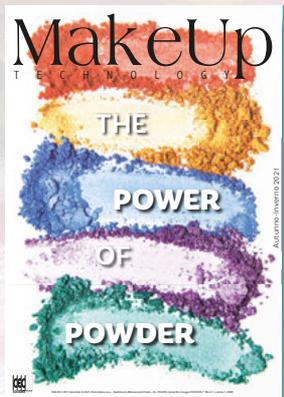
ga-online.org

Prosegue l'organizzazione del 70° Congresso internazionale e meeting annuale della *Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)*, che si svolgerà dal 28 al 31 agosto 2022 a Salonicco, in Grecia, una delle città più vivaci e storicamente significative della Penisola Balcanica. GA2022 riunirà scienziati rinomati da tutto il mondo e mira ad ampliare le attuali conoscenze sui diversi aspetti della ricerca sui prodotti naturali.

Tra i temi all'ordine del giorno del Congresso: etnobiologia, etnobotanica e biodiversità; composti naturali provenienti da organismi marini, funghi e microrganismi; endofiti e microbioma; analisi e controllo di qualità, metabolomica, chimica e bioattività dei prodotti naturali; bioinformatica nei prodotti naturali e nuovi farmaci; economia circolare, bioeconomia, tecnologie verdi, sviluppo sostenibile dei sottoprodotti agricoli/industriali; botanicals negli integratori alimentari, cosmetici e dispositivi medici; formulazione, tecnologia farmaceutica e biodisponibilità.

Presidente del comitato organizzativo è Andreana Assimpoulou, Scuola di Ingegneria Chimica, Università Aristotele di Salonicco, Grecia (adrea-na@gapps.auth.gr).





RIVISTE DI SETTORE TRA CARTA E DIGITALE

**CREDIAMO
NELL'IMPORTANZA
DELL'INFORMAZIONE
SCIENTIFICA**

Abbonati alle riviste e seguici
sui nostri canali social
per rimanere sempre aggiornato
sulle ultime novità di settore



@CosmeticTechnologyCEC
@IntegratoreNutrizionaleCEC



@cosmetictechnologycec
@makeuptechnology_cec



CEC Editore



www.ceceditore.com

COSMETIC
TECHNOLOGY

MakeUp
TECHNOLOGY

L'INTEGRATORE NUTRIZIONALE®

INNOVAZIONE IN
BOTANICALS

We deliver Technology & Results

Truffini & Reggè è il tuo partner strategico
per integratori alimentari e dispositivi medici

Truffini & Reggè, fondata nel 1917, è specializzata nello sviluppo e produzione di integratori alimentari, alimenti a fini medici speciali e dispositivi medici, con tecnologie avanzate innovative e processi unici e brevettati, in ambienti a temperatura e umidità controllata.



TTQS
Truffini Total Quality System

Tutti i nostri processi sono guidati dai principi della Qualità Totale. Il nostro Sistema di Qualità segue gli standard della prassi di riferimento UNI "Requisiti per buone pratiche di fabbricazione nella produzione di integratori alimentari" ed è certificato da Certiquality per la conformità alle norme ISO9001, ISO13485 e ISO22000 ed è ispezionato annualmente per la conformità alle GMP FDA per gli Integratori Alimentari (CFR 21, Vol. 2 part 111, 30/04/2018).



GRAAL RESEARCH
Prodotti su misura e "Ready to market"

La lunga esperienza del mercato e l'esteso network di T&R, permettono alla divisione Graal Research di sviluppare studi di marketing e di posizionamento per nuovi prodotti per la salute innovativi, unici, efficaci e stabili. In costante rapporto con centri di ricerca universitari e aziende leader nella produzione di ingredienti attivi, mettiamo al servizio dei clienti il nostro expertise per lo sviluppo di specifici prodotti "su misura" e un ampio portafoglio di prodotti "Ready to Market".



Truffini & Reggè
Food Supplements & Medical Devices
M I L A N O



CERTIFICAZIONI

SISTEMA DI GESTIONE
QUALITÀ CERTIFICATO
CQY
CERTIQUALITY
UNI EN ISO 9001:2015

SISTEMA DI GESTIONE
QUALITÀ CERTIFICATO
CQY
CERTIQUALITY
UNI CEI EN ISO 13485:2016

SISTEMA DI GESTIONE PER
LA SICUREZZA ALIMENTARE
CQY
CERTIQUALITY
UNI EN ISO 22000:2018

AZIENDA ISPEZIONATA DA
CERTIQUALITY SECONDO
GMP
CODE OF FEDERAL
REGULATION, TITLE 21,
VOLUME 2, PART 111