

Estrazione da residui legnosi per applicazioni alimentari e farmaceutiche

Giovanna Ferrentino – Libera Università di Bolzano

Nabil Haman – Libera Università di Bolzano

Ksenia Morozova – Libera Università di Bolzano

Matteo Scampicchio – Libera Università di Bolzano

Abstract

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

1. Introduzione

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Materiali e Metodi

2.1 Preparazione dei sottoprodotti legnosi

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

2.2 Estrazione con anidride carbonica supercritica

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

2.3 Estrazione con apparato Soxhlet

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

2.4 Determinazione dell'attività antimicrobica degli estratti

2.4.1 Crescita microbica

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

2.4.2 Inibizione della crescita microbica determinata con calorimetria isoterma

L'attività antimicrobica degli estratti di *Picea abies* è stata valutata sulla crescita di *E. faecalis* ed *S. thermophilus* mediante calorimetria isoterma (Thermal Activity Monitor, Model 421 TAM III, TA Instruments). Per eseguire l'esperimento, una colonia dei due ceppi microbici è stata trasferita in 10 mL di brodo di coltura (TSB) ed incubata a 37°C per *E. faecalis* e 40°C per *S. thermophilus*. Il tempo di incubazione è stato fissato a 18 ore per ottenere le cellule in fase di crescita stazionaria. Le sospensioni microbiche con una concentrazione finale di 10⁸ UFC/mL (unità formanti colonie per mL) sono state diluite in TSB ottenendo soluzioni con una concentrazione microbica finale pari a 10⁵ UFC/mL. Anche gli estratti di *Picea abies* ottenuti con estrazione con fluidi supercritici ed estrazione Soxhlet sono stati diluiti in brodo di coltura TSB sterile. Quindi, sono stati miscelati con le colture microbiche raggiungendo concentrazioni finali pari a 1, 3 e 5 mg/mL. Circa 1 mL dei campioni preparati sono stati successivamente trasferiti in provette di acciaio inossidabile (precedentemente sterilizzate) per iniziare l'analisi con calorimetria isoterma. Il calore generato durante le crescite microbiche in assenza e presenza di estratti è stato monitorato per 24 ore alle temperature di crescita dei microrganismi. Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato.

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

I composti fenolici degli estratti di *Picea abies* sono stati identificati mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPL-MS) utilizzando lo strumento Q-Exactive Orbitrap HRMS (Thermo Scientific, Milano, Italia) accoppiato ad un UHPLC (Ultimate 300). È stata utilizzata una colonna LC Accucore RP-MS (100 mm × 2,1 mm id, 2,6 μm) con una pre-colonna (Thermo Scientific, Milano, Italia) per ottenere la separazione dei composti fenolici. Le diverse masse dei composti sono state selezionate nel range da 100 a 1.000 m/z con una risoluzione di 70.000 ad un valore di 200 m/z, controllo del guadagno di 1·10⁶, massimo tempo di iniezione di 175 ms. I composti fenolici presenti negli estratti sono stati identificati in base al tempo di ritenzione e all'assorbanza UV misurata a 280 nm. I tempi di ritenzione sono stati confrontati con quelli di standard analitici. La correlazione delle abbondanze relative dei composti chimici e l'integrazione dell'area sotto ciascun picco sono state eseguite utilizzando il software Compound Discoverer 2.1 (Thermo Scientific, Milano, Italia).

Per identificare i composti fenolici responsabili dell'attività di inibizione, circa 5 mg di estratto sono stati aggiunti ad 1 mL di brodo di coltura (TSB) in presenza ed assenza del ceppo microbico di *E. faecalis* inoculato con una concentrazione pari a 10⁶ UFC/mL. Entrambi i campioni sono stati incubati a 37 °C per 24 ore. È stato inoltre preparato un terzo campione aggiungendo 5 mg di estratto ad 1 mL di brodo di coltura (TSB). I tre campioni sono stati analizzati mediante HPLC-MS. Per la fase di preparazione dei campioni, sono stati aggiunti 5 mL di una soluzione MeOH/acqua (70:30) a 500 mg del campione. La miscela è stata agitata su vortex per 5 minuti, sonicata a temperatura ambiente per 15 minuti e centrifugata a 10.000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato filtrato utilizzando filtri per siringa da 0.2 μm prima dell'analisi. Sono state eseguite tre estrazioni indipendenti per ciascun campione. L'analisi è stata effettuata in triplicato ed i risultati sono stati espressi come valori medi e deviazione standard.

3. Risultati e discussioni

3.1 Estrazione con sistema Soxhlet ed anidride carbonica supercritica

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

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

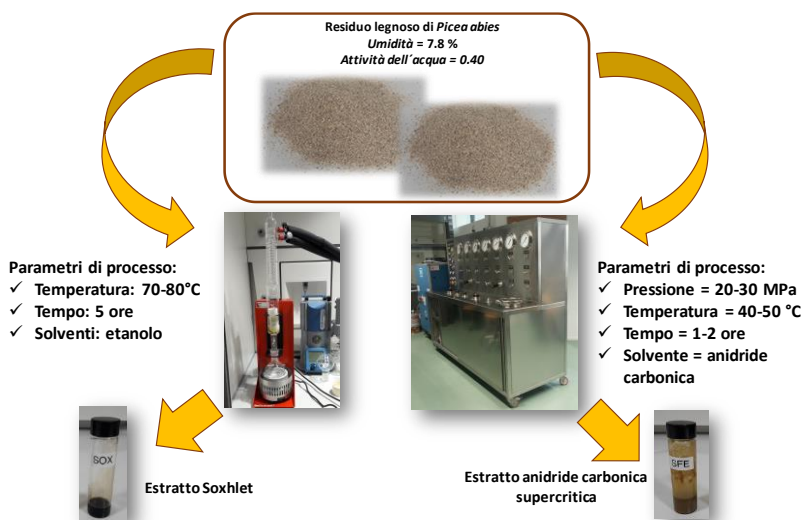


Fig. 1 – Estrazione con sistema Soxhlet e con anidride carbonica supercritica dai residui legnosi di *Picea abies*.

La caratterizzazione chimica di entrambi gli estratti è stata effettuata con HPLC-MS ed è riportata in Tabella 1.

I composti fenolici presenti in maggiore quantità sono: l'acido metilbenzoico, l'acido gallico, la catechina, la diidroquercetina, l'idrossipinoresinolo e l'isorapontina. Tali composti sono stati identificati in entrambi gli estratti.

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

Composto	Formula	[M-H] teorica	[M-H] misurata	Area estratto SFE 1*10 ⁶	Area estratto Soxhlet 1*10 ⁶
Acido 2-Metilbenzoico	C ₈ H ₈ O ₂	135.0452	135.0450	61.8 ± 0.8	50.1 ± 0.5
Acido cinnamico	C ₉ H ₈ O ₂	147.0451	147.0452	2.03 ± 0.1	1.5 ± 0.4
Acido protocatecuico	C ₇ H ₆ O ₄	153.0193	153.0192	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2
Acido cumarico	C ₉ H ₈ O ₃	163.0401	163.0401	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.4
Acido gallico	C ₇ H ₆ O ₅	169.0142	169.0143	4.1 ± 0.3	3.1 ± 0.5
Acido ferulico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0506	193.0507	0.60 ± 0.13	0.55 ± 0.12
(+)-Catechina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0718	289.0720	1.6 ± 0.3	0.84 ± 0.01
Diidrossiquercitina (Taxifolina)	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0513	303.0513	59 ± 2	42 ± 3
(+)-6- idrossipinoresinolo	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	373.1293	373.1293	312 ± 23	201 ± 12
Astringina	C ₂₀ H ₂₂ O ₂	405.1191	405.1196	16 ± 1	10 ± 2
Isorapontina	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	419.1348	419.1349	432 ± 56	323 ± 15

