

AURUMFOLIUM



Regione Toscana

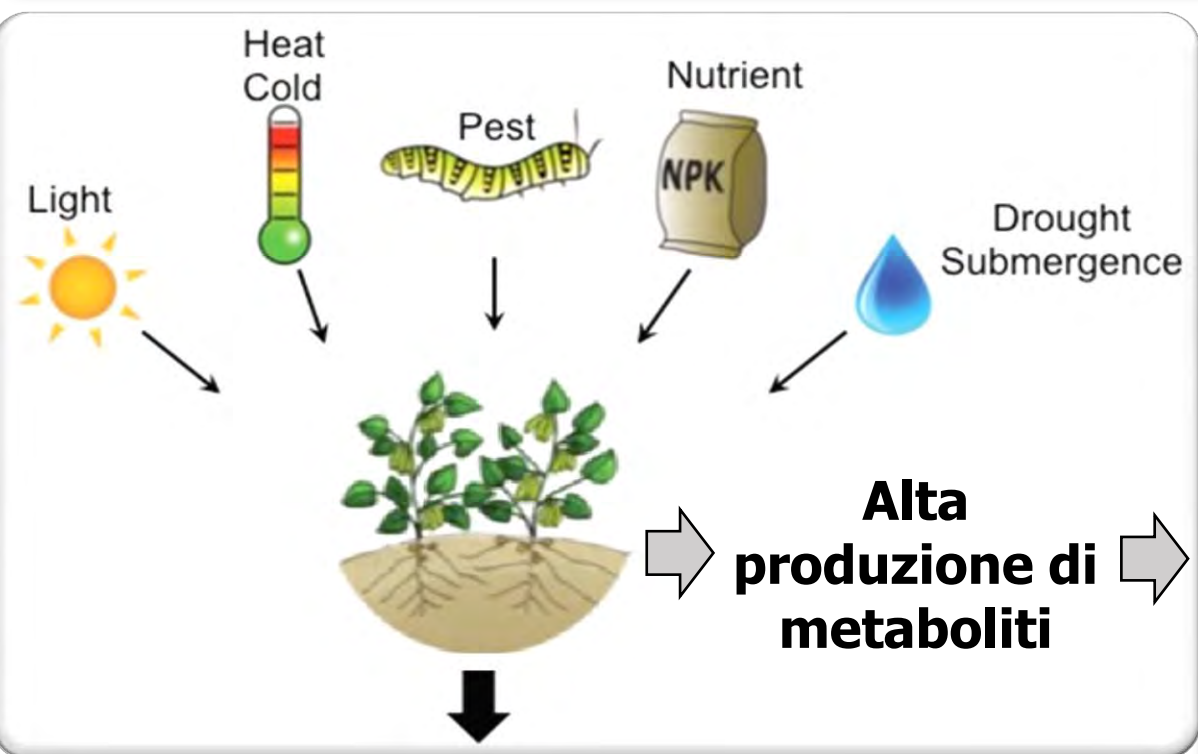


AURUMFOLIUM

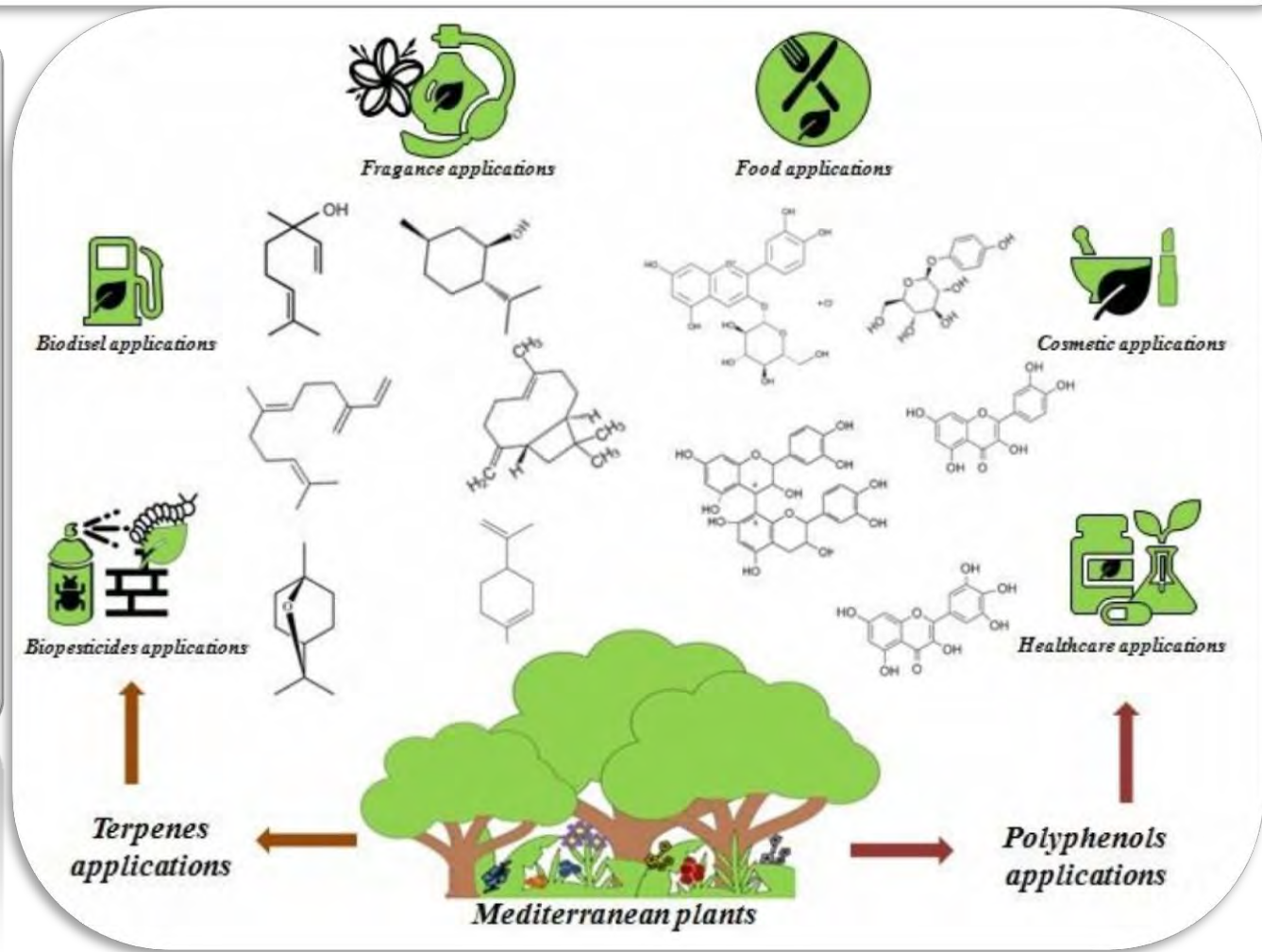
La diffusione delle piante della Macchia allo stato spontaneo in molti ecosistemi costieri congiuntamente alla possibilità di estrarre le molecole d'interesse offre alle aziende agricole toscane di individuare fonti di reddito alternative a quelle tradizionali con ricadute economiche importanti oltre alla possibilità di recuperare in modo sostenibile i terreni agricoli "marginali".



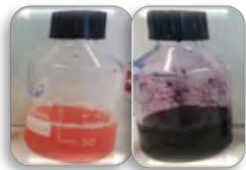
Piante mediterranee come "BIOFACTORIES" di metaboliti secondari



Bassi input agronomici

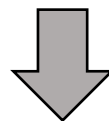


Produzione sostenibile di Fitocomplessi

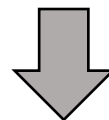


FITOCOMPLESSO

Miscela chimicamente complessa ricavata da una droga vegetale



Che contiene molteplici composti chimici, anche molto diversi fra loro



Che **insieme** hanno un'azione biologica **sinergica**, quindi maggiore rispetto all'azione che i singoli composti separati avrebbero sulla nostra salute



Dalla ricerca scientifica alle prospettive applicative

- Caratterizzare i composti presenti e determinarne il contenuto negli estratti**
- Incrementarne l'accumulo nei tessuti vegetali mediante una ridotta irrigazione e forme di allevamento specifiche**
- Selezionare possibili applicazioni nutraceutiche e cosmetiche degli estratti**
- Incrementare la diversificazione delle colture in azienda**



Il progetto AURUMFOLIUM prevede il trasferimento delle conoscenze scientifiche acquisite dal DAGRI sulla coltivazione di piante della macchia mediterranea a due aziende agricole che si stanno proponendo come obiettivo l'ottenimento di materiale vegetale ricco in metaboliti secondari ad azione nutraceutica attraverso pratiche agronomiche a basso input ambientale. Le piante di interesse, selezionate in accordo con le aziende agricole, sono:

				
CISTUS INCANUS cisto	MYRTUS COMMUNIS mirto	PISTACIA LENTISCUS lentisco	ARBUTUS UNEDO corbezzolo	OLEA EUROPAEA olivo

Le piante selezionate per il progetto



Frutti

Foglie



Foglie



Foglie

Frutti



Foglie

Frutti

Dove sono state raccolte?

Isola del Giglio

"Greppe del Giglio", Società Cooperativa



- ❖ Installazione centraline climatiche
- ❖ Raccolta campioni di piante spontanee a livello stagionale in tre diverse località:

Monticello
Loc. Olivello
Loc. Le porte

(versante Est)
(versante Ovest)
(versante Ovest)



Coltivazione di *Arbutus unedo*



Coltivazione di *C. incanus*,
P. lentiscus e *M. communis*



Olive Grove Partners S.r.l.
Scarlino, Grosseto



- Installazione sensoristica
- Attività agronomiche
- Misure di ecofisiologia e raccolta campioni

Perché sono state scelte queste specie?



Etnobotanica

La ricerca etnobotanica costituisce inoltre un tassello per la tutela della biodiversità vegetale nonché per la conservazione della diversità bio-culturale.

Conoscenze CNR-IPSP e UNIFI-DAGRI

Gli studi precedenti condotti in collaborazione hanno permesso di evidenziare le potenzialità nutraceutiche e farmacologiche delle piante selezionate, nonché l'elevata tolleranza di queste piante agli stress ambientali (abiotici e biotici).

1)Gori, A., Nascimento, L. B., Ferrini, F., Centritto, M., & Brunetti, C. (2020). Seasonal and diurnal variation in leaf phenolics of three medicinal mediterranean wild species: what is the best harvesting moment to obtain the richest and the most antioxidant extracts?. *Molecules*, 25(4), 956.

2)Gori, A., Nascimento, L. B., Ferrini, F., Centritto, M., & Brunetti, C. (2020). Seasonal and diurnal variation in leaf phenolics of three medicinal mediterranean wild species: what is the best harvesting moment to obtain the richest and the most antioxidant extracts?. *Molecules*, 25(4), 956.

3)Agati, G., Brunetti, C., Fini, A., Gori, A., Guidi, L., Landi, M., ... & Tattini, M. (2020). Are flavonoids effective antioxidants in plants? Twenty years of our investigation. *Antioxidants*, 9(11), 1098.

Attività di CNR e Università di Firenze



Scambi gassosi



Stato idrico della pianta



Fluorescenza della
clorofilla

Misure di ecofisiologia per capire lo stato di salute delle piante

**Attività di CNR
e Università di
Firenze**

Estrazione ed analisi dei polifenoli in foglie e frutti



Analisi dei metaboliti secondari

Arbutus unedo



un ettaro di *Arbutus unedo*



Etnobotanica



I **decotti fogliari** sono utilizzati sin dal Medioevo per il trattamento di **problemi gastrointestinali** (in particolar modo per aiutare il lavoro epatico e biliare) e **urologici** (trattamento di cistiti)

Obiettivi del progetto

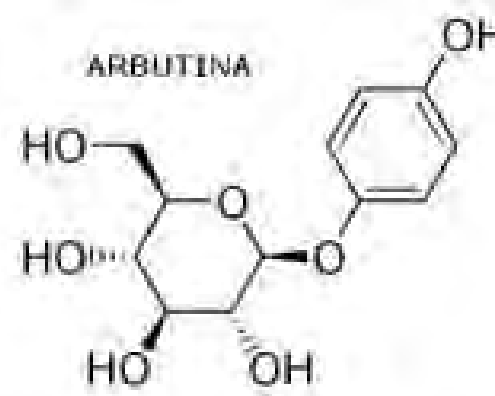
- Ottimizzare forma di allevamento per produzione intensiva di frutti
- Preparazione di estratti di foglie arricchiti in derivati dell'arbutina
- Incrementare il contenuto di polifenoli fogliari tramite coltivazione con ridotta irrigazione
- Utilizzare i frutti per la produzione di estratti con attività nutraceutica

Possibili applicazioni

- Valorizzazione dei frutti in preparazioni alimentari (**functional foods**)
- Estratti fogliari per preparazioni cosmetiche



Arbutina



Derivato
dell'idrochinone



Questo composto è importante per l'industria cosmetica per il **trattamento della pelle iperpigmentata** e può sostituire l'uso dell'alfa-arbutina sintetica (Rendon et al., 2005; Morag et al., 2015). In particolare, l'arbutina può legare i siti attivi della **tirosinasi** senza essere ossidata, rendendolo un potente inibitore antagonista di questo enzima e **prevenendo così la formazione di melanina nel tessuto cutaneo** (Garcia-Jimenez et al., 2017; Kaewduangdee et al., 2020).

Può essere veicolata con nanostrutture (**ciclodestrine**) per aumentarne ulteriormente l'efficacia favorendo un rilascio protratto della sostanza.

Arbutus unedo L.

AURUMFOLIUM

ETRURIO – Olive Grove Partners Srl Società Agricola

Nell'azienda il corbezzolo viene coltivato in due forme di allevamento:



monocaule



policaule

Con due trattamenti idrici:



Irrigato



non irrigato

Confrontare stagionalmente le risposte fisiologiche e biochimiche del corbezzolo sottoposto a stress idrico e coltivato in diverse forme di allevamento



- Sensori per monitoraggio umidità del suolo
- Misure stagionali di accrescimento, fisiologia e biochimica fogliare

Prove di coltura specializzata del Corbezzolo

Ad oggi, i frutti del corbezzolo vengono raccolti perlopiù con sistemi tradizionali che prevedono la raccolta direttamente da piante spontanee.

La realizzazione di un «Corbezzoletto» in coltura specializzata vuole offrire (al pari dei sistemi arborei da frutto) la possibilità di rendere razionali tutte le operazioni di coltivazione, in particolare migliorando l'efficienza della raccolta e incrementando le produzioni unitarie.

Per meglio comprendere l'adattabilità di questa pianta alla coltura specializzata sono state allestite due forme di allevamento: una forma a vaso policaule basso (forma libera che asseconda l'habitus naturale di questa specie) ed una forma a monocaule semilibero con le prime branche impalcate a circa un metro da terra.



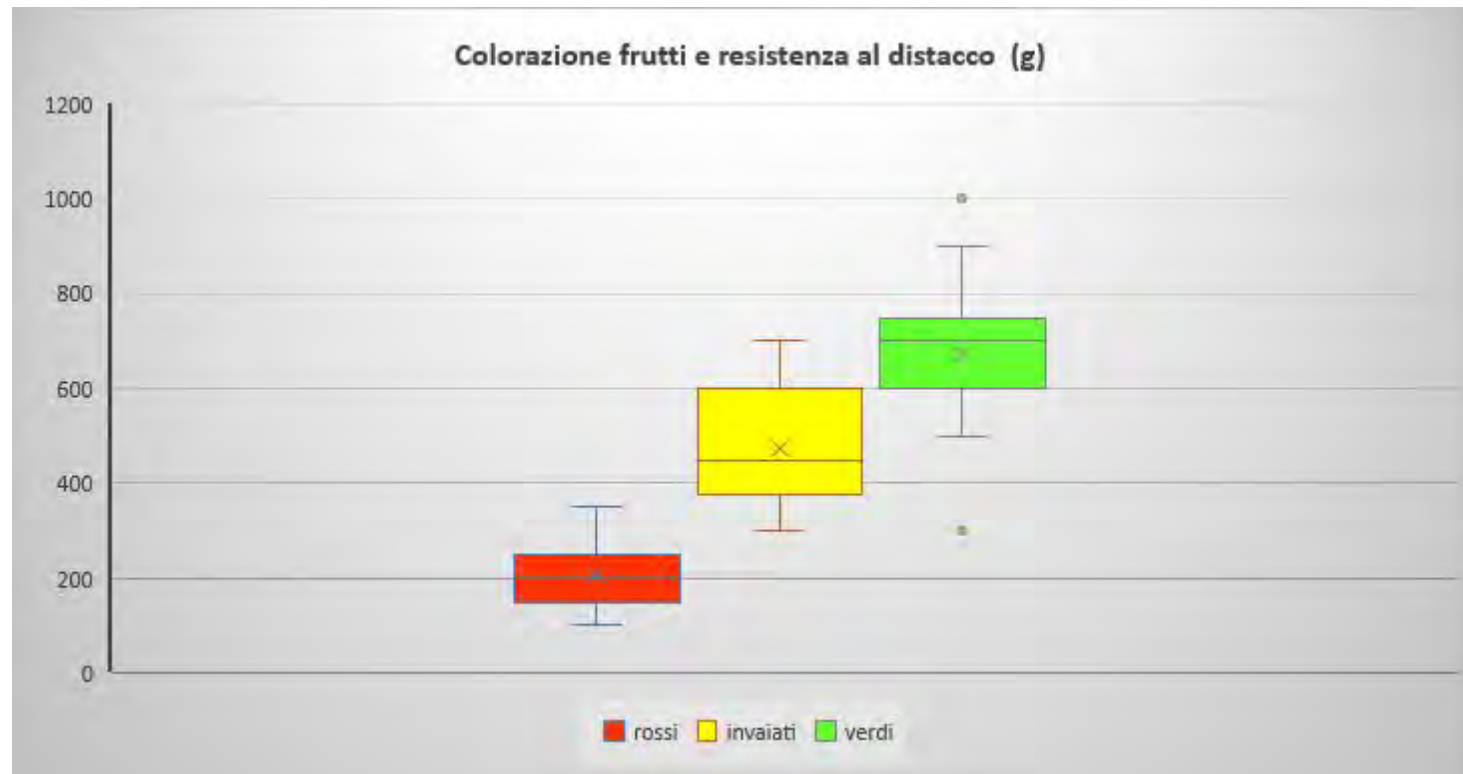
Policaule



Monocaule



Raccolta di un frutto a MATURAZIONE «SCALARE»



Miglioramento della raccolta

Sviluppo di forme di allevamento compatibili con la raccolta meccanica con agevolatori.

Il sistema di **scuotimento al tronco o branche**, appare come il più idoneo per questa specie, in quanto la maturazione scalare dei frutti e la concomitanza dell'antesi non permettono l'impiego di altre attrezzature più invasive quali abbacchiatori o pettini oscillanti



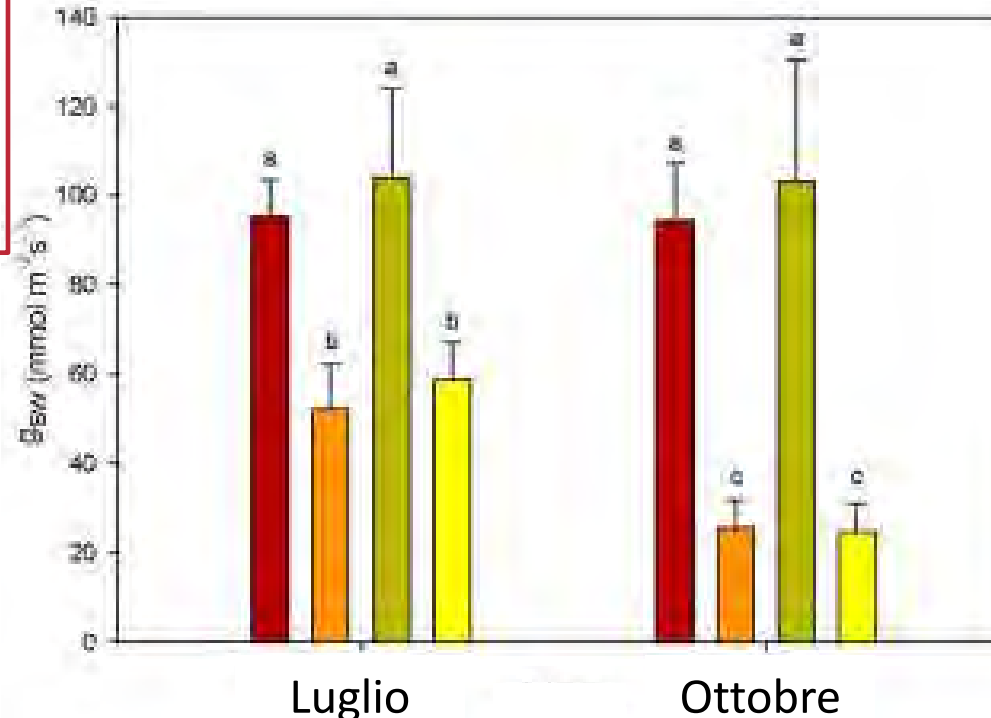
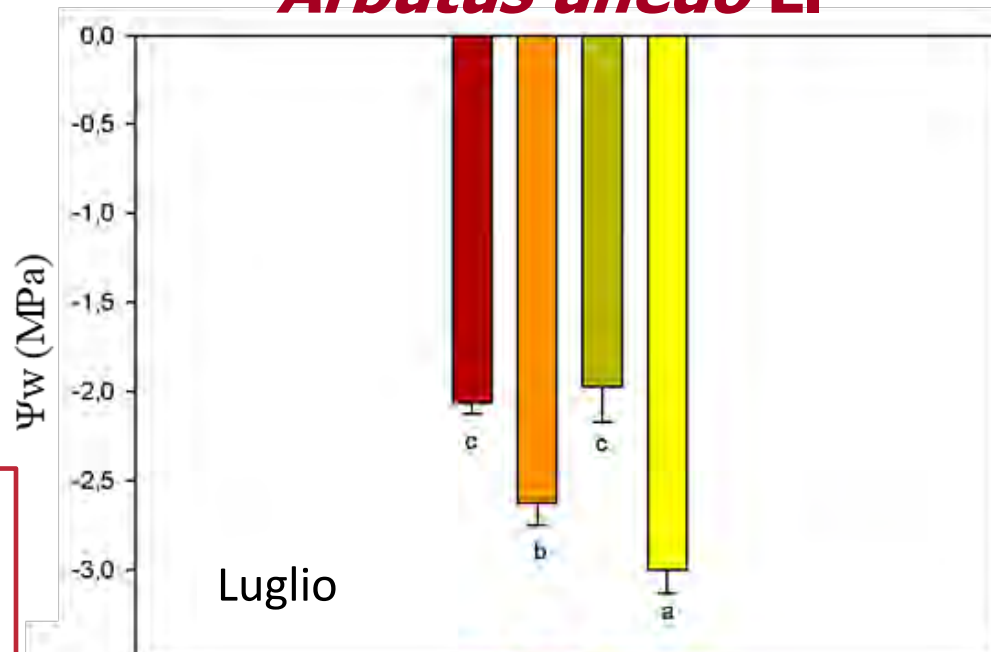
RISULTATI

Il **potenziale idrico** (Ψ_w) costituisce la forza motrice per il movimento dell'acqua nella **pianta**

Il corbezzolo in forma policaule è in stress più severo durante il periodo estivo per la maggior dimensione della chioma che porta ad una maggior traspirazione

La **conduttanza stomatica** misura l'apertura degli stomi che regolano gli **scambi gassosi** della pianta (CO_2 e acqua)

Arbutus unedo L.



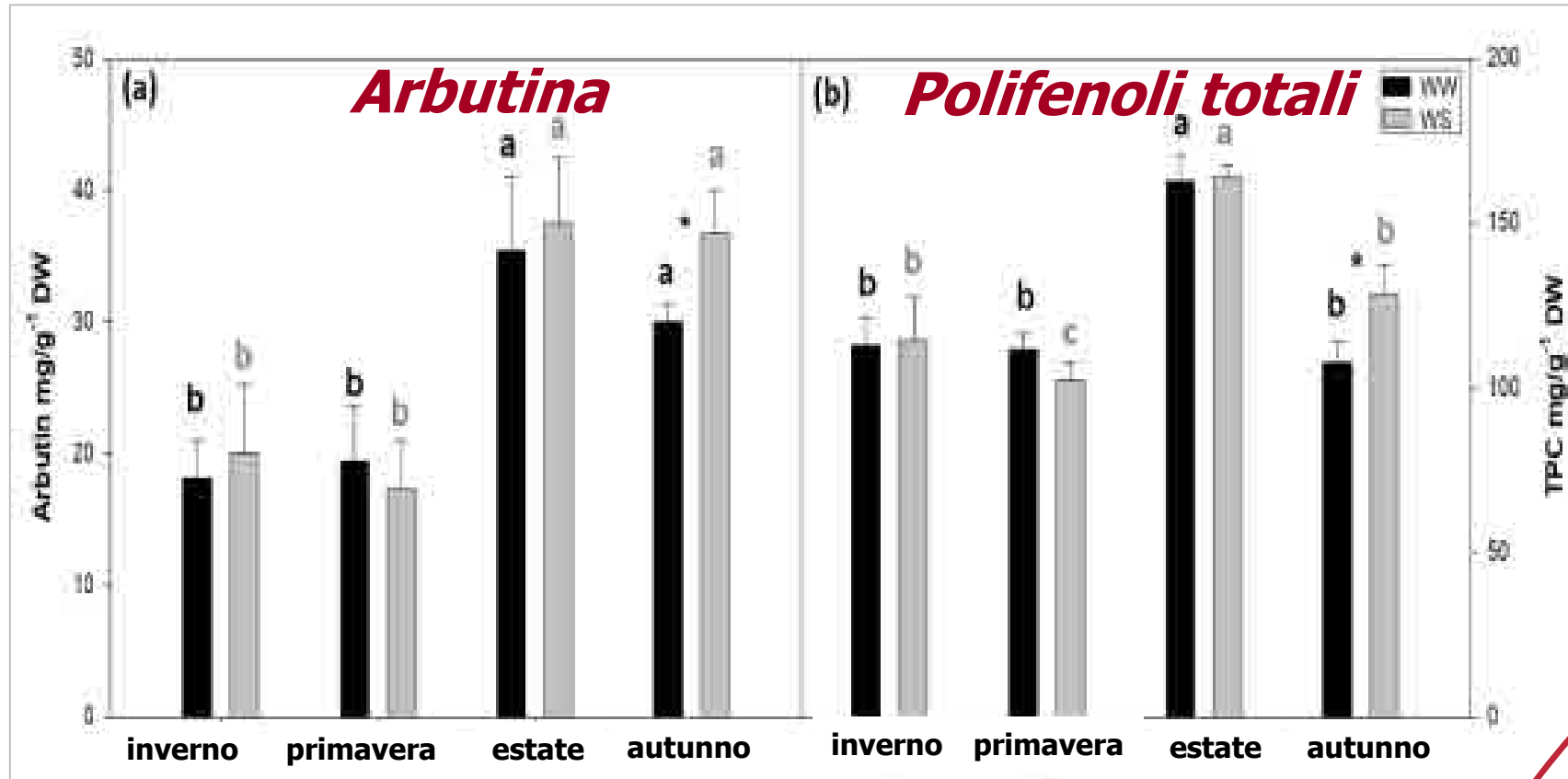
AURUMFOLIUM

- Mono WW → Monocaula ben irrigato
- Mono WS → Monocaula senza irrigazione
- Poli WW → Policaule ben irrigato
- Poli WS → Policaule senza irrigazione



maggior resa in frutti nel monocaule

RISULTATI

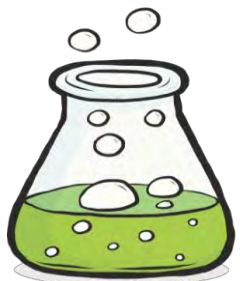


■ piante irrigate
 ■ piante senza irrigazione



↓
Tempo balsamico
 Contenuto ottimale
 di principi attivi

La mancanza
 d'irrigazione non porta
 differenze nell'accumulo
 dei metaboliti secondari
 in luglio (momento di
 maggior produzione)



Utilizzo dei frutti Corbezzolo e le loro applicazioni



**Frutti del
Corbezzolo**

I frutti del corbezzolo sono generalmente utilizzati per la preparazione di **bevande alcoliche** (vini, liquori e distillati), **marmellate** e **gelatine**, meno frequentemente consumati come frutta fresca, nonostante il loro aspetto gradevole.

I principali **acidi grassi** presenti nelle diverse fasi di maturazione sono **l'acido α -linolenico**, **l'acido oleico** e **acido linoleico** (Oliveira et al., 2011). Gli **acidi grassi polinsaturi** (PUFA) rappresentano fino al 60% degli acidi grassi totali, con un rapporto $\Omega 3/\Omega 6$ altamente favorevole, dovuto alla ricchezza in acido α -linolenico.

Ricchi in **tocoferoli**, **carotenoidi**, **catechine**, **derivati della quercetina**, **antociani** e **vitamina C**.

AURUMFOLIUM



**Inclusione in siero e
scotta per produzione
di *functional foods***



**In collaborazione con
Azienda Pianporcino**



***Myrtus communis* L., *Cistus incanus* L. e *Pistacia lentiscus* L.**

Campionamento fogliare in 4 punti dell'anno su base stagionale:

Primavera (Maggio), Estate (Luglio), Autunno (Ottobre) ed Inverno (Febbraio)

Per identificare il tempo balsamico per raccolta materiale vegetale e per estrazione dei fitocomplessi



Myrtus communis



Cistus incanus



Pistacia lentiscus

**Olive Grove Partners S.r.l.
Scarlino, Grosseto**

Estrazione dei polifenoli dalle foglie e analisi di caratterizzazione e quantificazione con cromatografia liquida



Test in vitro per valutarne le possibili applicazioni nutraceutiche, cosmetiche, terapeutiche



Isola del Giglio

Piante spontanee



3 Località

**Monticello
Loc. Olivello
Loc. Le porte**

**(versante Est)
(versante Ovest)
(versante Ovest)**





Cistus incanus

Nel progetto Aurumfolium sono stati coltivati 1000 mq con *Cistus incanus*, con densità variabile da 4,000 a 10,000 piante ad ettaro

Obiettivi del progetto

- produzione di foglie essiccate ricche in tannini condensati e flavonoidi

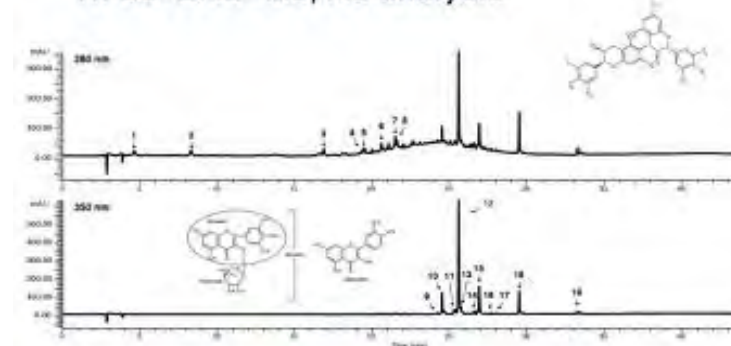
Possibili applicazioni nutraceutiche

- Thè con proprietà antiossidanti
- Estratti idroalcolici delle foglie come integratori
- Foglie essiccate e macinate come additivi alimentare

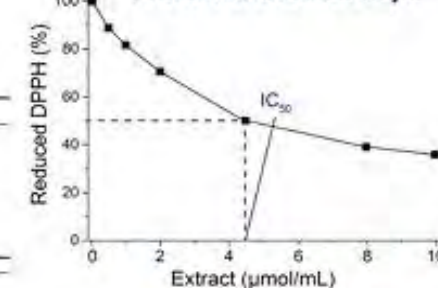


Decotto di foglie (thè) utilizzato per infiammazioni della pelle, problemi gastrici e febbre

HPLC-DAD-MS/MS analysis



Antioxidant assays



L'estratto etanolico di foglie di *C. incanus* contiene elevate quantità di **proantocianidine** e **flavonoli**

Come era stata testata *in vitro* l'azione dei principi attivi estratti dal *Cistus incanus*?



International Journal of
Molecular Sciences



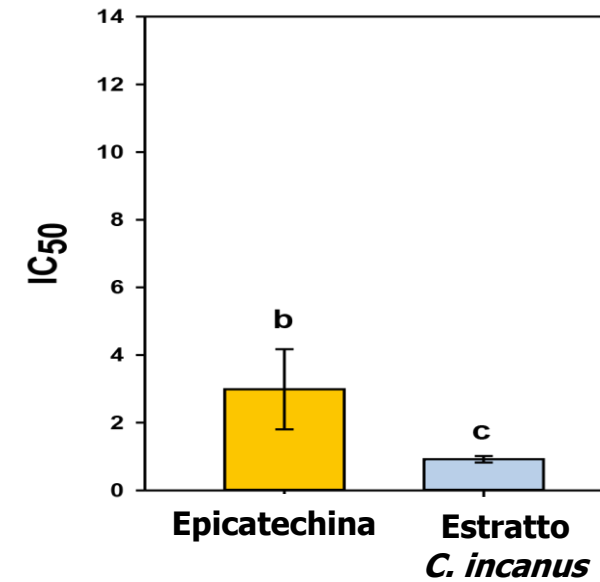
Article

Characterisation and Antioxidant Activity of Crude Extract and Polyphenolic Rich Fractions from *C. incanus* Leaves

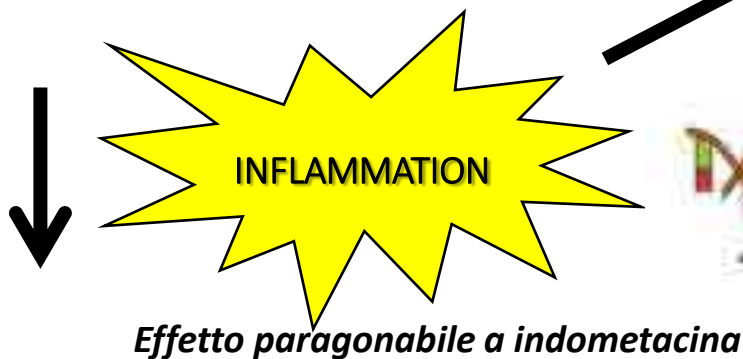
Antonella Gori ^{1,†}, Francesco Ferrigni ¹, Maria Cristina Marcano ¹, Massimiliano Taddei ², Mauro Costantino ², Maria Concetta Baratto ³, Rebecca Poggi ⁴ and Cecilia Bianchi ^{1,2,*}



In vitro: test attività antiossidante



In vitro: test su colture cellulari esposte a stress infiammatorio

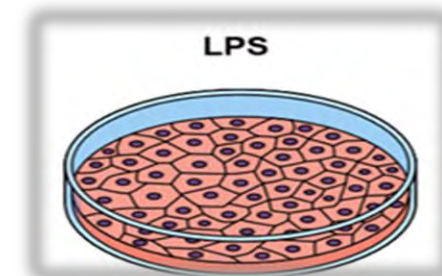


Fattori di trascrizione



Sinergia
del fitocomplesso

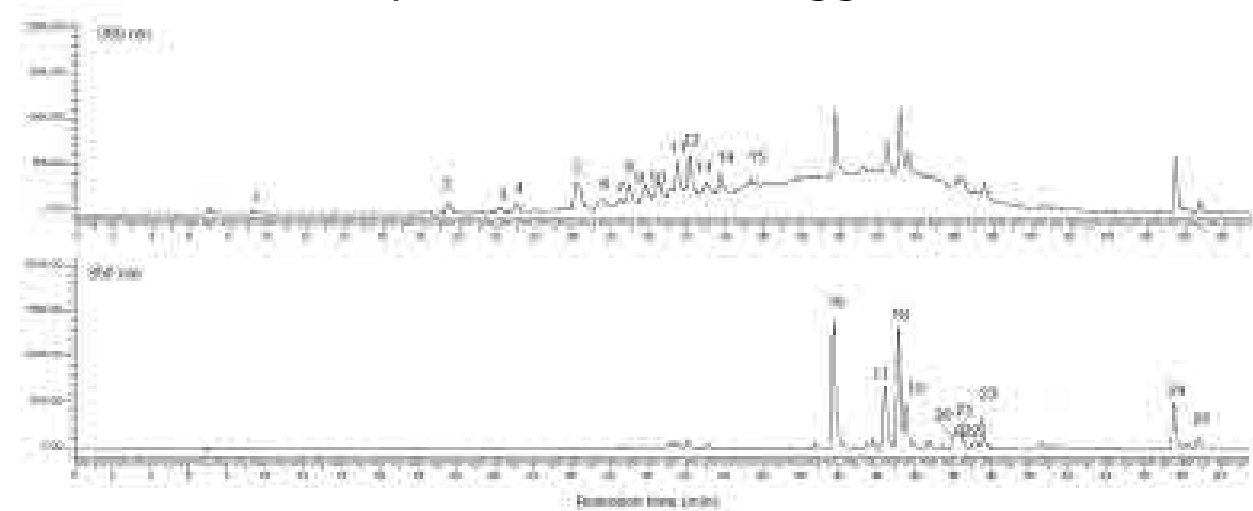
Myricitrin
Rutin



Analisi in corso.....

Cistus incanus

○ Ottimizzazione dell'estrazione con ultrasuoni per ottenere la maggior resa in polifenoli:



○ Analisi **dell'attività antiossidante *in vitro*** confrontando gli estratti ottenuti dal materiale raccolto durante le diverse stagioni e in diverse località (tre località del Giglio e Azienda Olive Grove Partners S.r.l. Scarlino, Grosseto)

○ Analisi **dell'attività antitumorale *in vitro*** che sarà condotta dalla Prof.ssa Paola Muti in collaborazione con colleghi dell'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena



Pistacia lentiscus

1/4 di ettaro di *Pistacia lentiscus* con sesto di impianto 2.5 x 2 e 2.5 x 1



Obiettivi del progetto

produzione di **estratti da foglie** (ricche in tannini idrolizzabili e flavonoidi) e da **frutti** (ricchi in tocoferolo e carotenoidi) dopo estrazione dell'olio



I **frutti** erano utilizzati in passato come coloranti naturali.

La pianta rappresentava una fonte importante per **aumentare la qualità del latte** e dei prodotti lattiero-caseari provenienti da ruminanti che brucano la macchia mediterranea.

Una degli usi più antichi risale alla civiltà nuragica (1800-238 a.C.) ed è stata attribuita alla popolazione sarda: l'**olio** ottenuto dalla spremitura a freddo delle bacche era ampiamente utilizzato per scopi sociali, cioè lampade a casa o votive, la cucina, nonché un rimedio popolare (curare le punture d'insetto, cicatrizzare le ferite e combattere i dolori muscolari).

Possibili applicazioni

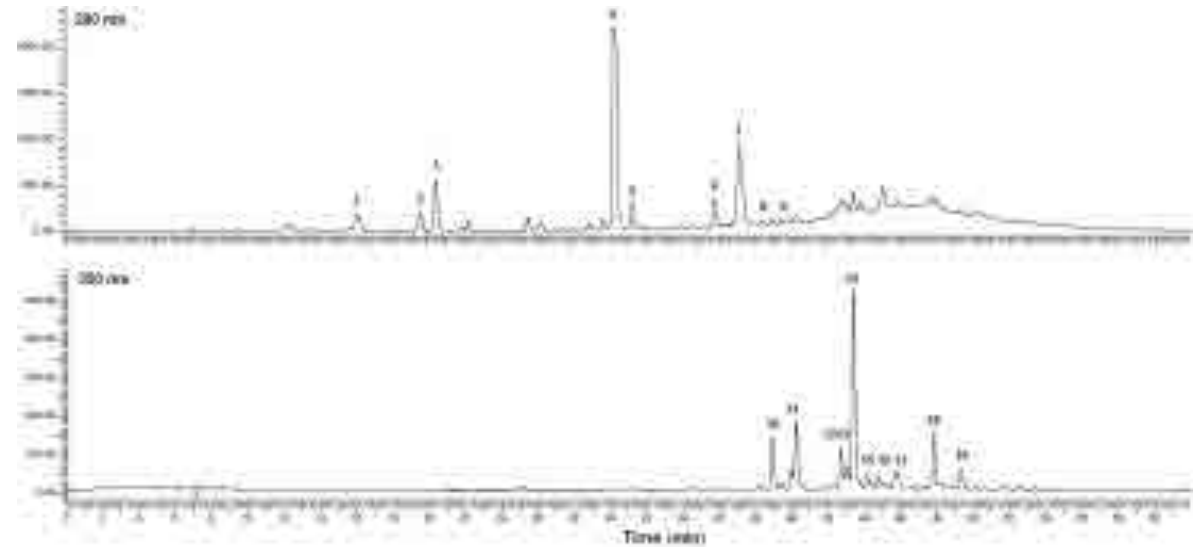
- **estratti** da foglie ricchi in polifenoli antiossidanti ad uso nutraceutico
- **olio** ottenuto per estrazione a freddo dai frutti per uso alimentare e cosmetico

Analisi in corso....

*Pistacia
lentiscus*

- Ottimizzazione dell'estrazione di polifenoli dalle foglie con ultrasuoni:

Ricchi in derivati della catechinae glicosidi di kamperolo e della quercetina



Su foglie



- Analisi **dell'attività antiossidante *in vitro*** confrontando gli estratti ottenuti dal materiale raccolto durante le diverse stagioni e in diverse località (tre località del Giglio e Azienda Olive Grove Partners S.r.l. Scarlino, Grosseto)

Pistacia lentiscus

Su frutti



Fiori

Frutti



PIANTA DIOICA
Porta i fiori

♀ e ♂ **su individui diversi**

Analisi in corso....

- Ottimizzazione dell'estrazione di polifenoli dai frutti con *green extraction* (riduzione solvente organico)
- Caratterizzazione dei diversi composti contenuti nei frutti, inclusi i terpeni a cui è stata attribuita la proprietà di antagonizzare malattie neurologiche e neurodegenerative.



Contenuto totale di antociani: 480 µg/g PF

- Analisi **dell'attività antitumorale *in vitro*** che sarà condotta dalla Prof.ssa Paola Muti in collaborazione con colleghi dell'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena

Myrtus communis



Le **foglie di mirto** sono state utilizzate nella medicina tradizionale per curare diverse malattie grazie alle loro proprietà antisettiche e disinfettanti, ad esempio, nell'antico Egitto venivano usate per curare **disturbi della pelle e infezioni del seno** (Bird, 2003). Le inalazioni erano utilizzate per curare bronchiti e enfisema (Jabri et al., 2017). Nella medicina popolare, **foglie e frutti di mirto** sono stati applicati anche per curare **disturbi del sistema nervoso e malattie del fegato** (Sumbul et al., 2011).

Nel progetto Aurumfolium sono stati coltivati 1000 mq con *Myrtus communis*. Per lo studio sono stati raccolti sia i frutti sia foglie e fiori.

Obiettivi del progetto

- Produzione di estratti da foglie e frutti
- Produzione di olio essenziale da fiori

Possibili applicazioni

- estratti acquosi dei frutti per inclusione in prodotti caseari
- Idrolato di fiori come cosmetico
- Estratti di foglie per ricchi in polifenoli ad uso nutraceutico

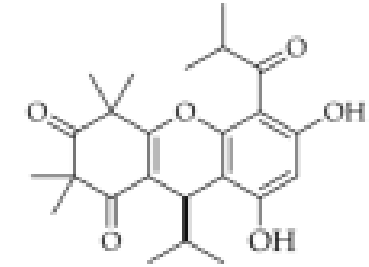
Analisi in corso....

Mirto

- Caratterizzazione dei diversi composti contenuti nelle **foglie** e successivi test per valutarne **l'attività antiossidante *in vitro*** confrontando gli estratti ottenuti dal materiale raccolto durante le diverse stagioni e in diverse località (tre località del Giglio e AziendaOlive Grove Partners S.r.l. Scarlino, Grosseto)



Foglie



le foglie di mirto sono caratterizzate dalla presenza di **derivati dell'acido gallico**, derivati dell'**acido ellagico**, **derivati flavonoidici** e **gallomirtocommuloni**

- Analisi **dell'attività antitumorale *in vitro*** che sarà condotta dalla Prof.ssa Paola Muti in collaborazione con colleghi dell'Istituto Nazionale Tumori Regina Elena



- Analisi dei **terpeni** presenti nell'olio essenziale dei fiori per valutarne possibili applicazioni cosmetiche

Utilizzo dei frutti Mirto e le loro applicazioni



Frutti del mirto

ricchi in antociani



Utilizzo alimentare



Celikel et al., 2008; Sumbul et al., 2012

~~AURUMFOLIUM~~



Inclusione in siero e
scotta per produzione
di *functional foods*



In collaborazione con
Azienda Pianporcino



Produzione di *functional foods* con gli estratti dei frutti



AURUMFOLIUM



Arbutus unedo L.
(corbezzolo)



Myrtus communis L.
(mirto)



Valorizzazione del siero di latte con estratti polifenolici di mirto e corbezzolo

Sottoprodotto

Siero del latte



ricchi di proteine
e minerali

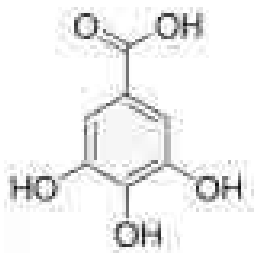
Valorizzazione di
questo **sottoprodotto** con
estratti di frutti di **piante
mediterranee ad azione
antiossidante**



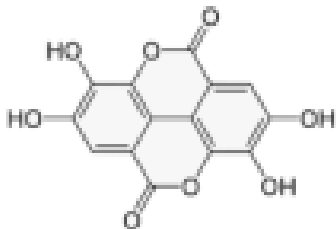
Classi di composti rilevati all'interno dei frutti di corbezzolo



Tannini

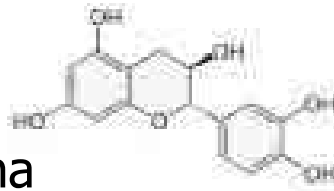


derivati dell'acido gallico

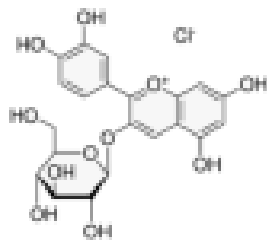


Derivati dell'acido ellagico

derivati della catechina

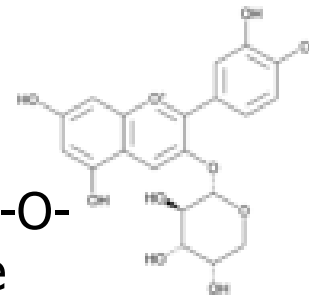


Antociani

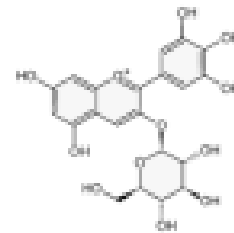


Kuromanina

Cianidina 3-O-araboside

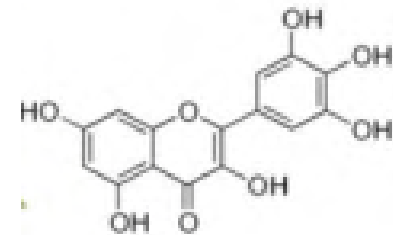


Delfinidina 3-O-galactoside

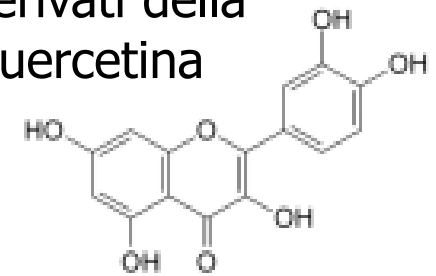


Flavonoidi

derivati della Miricetina



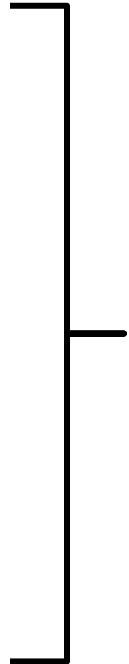
derivati della Quercetina



Metodologia di estrazione degli estratti dei frutti

3 diverse tipologie di frutto: Fresco, Secco e Liofilizzato

sono stati pesati (50 g) macinati (mortaio e pestello) ed estratti in due diversi processi di estrazione, con lo stesso tempo di estrazione



Decotto
Utilizzando
solo acqua



**Estrazione assistita da
ultrasuoni**
Soluzione al 75% di etanolo



**Analisi per la quantificazione
dei polifenoli**

*Selezione del
decotto dell'estratto dei frutti freschi*

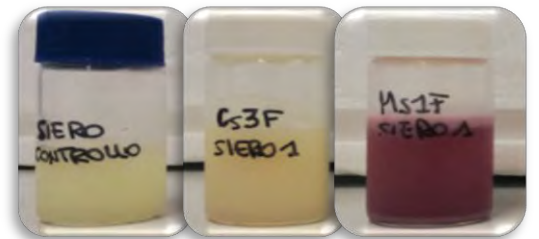
Inclusione nel siero di latte



→ Estratto liquido
+
→ Estratto Polvere
(dopo liofilizzazione)



Inclusione nel Siero di Latte



Inclusione Liquida e Polvere

Attività antiossidante



pH

Analisi di Stabilità

chimica



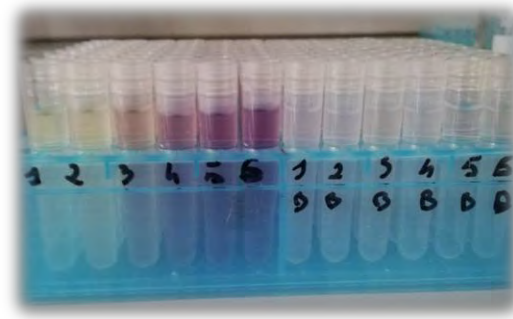
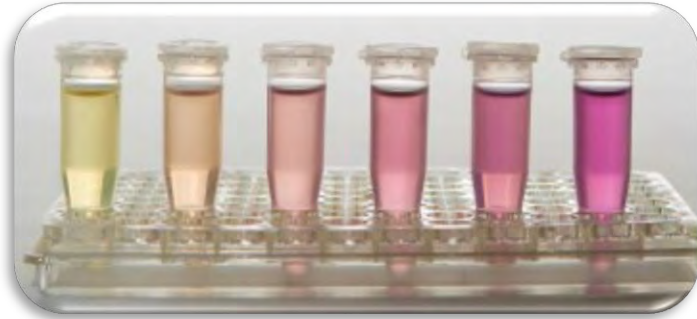
Analisi cromatografiche

microbiologica



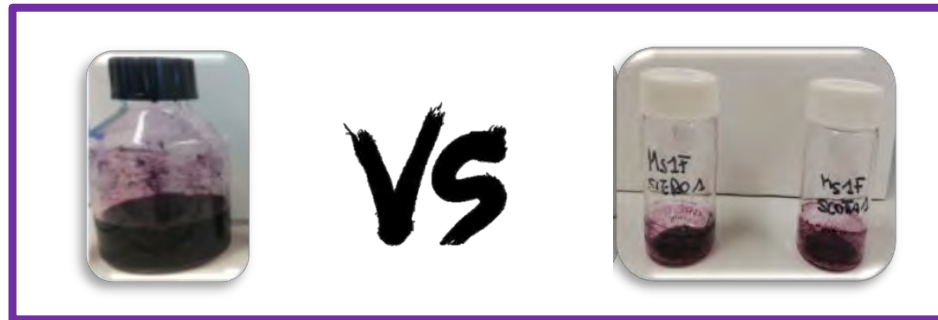
T0 → T15 → T30 → T45 → T60

Risultati



**Analisi della attività
antiossidante delle
inclusioni**

Inclusioni con Mirto



T₀  **T₆₀**

*Non ci sono differenze tra le
due forme di inclusione
(liquida e polvere)*

Inclusioni con Corbezzolo



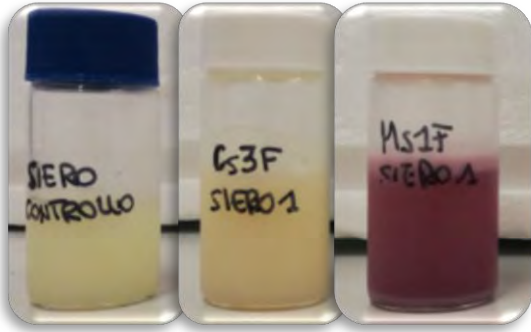
T₀  **T₆₀**

*L'attività antiossidante della forma liquida è rimasta
stabile per 60 giorni,
mentre la polvere per 45 giorni*

Risultati



Il **decocto** dei frutti freschi di mirto e corbezzolo è il metodo di estrazione più efficiente per ottenere alte quantità di polifenoli



Le inclusioni con l'estratto di **mirto in forma liquida e polvere** sono chimicamente stabili fino a 60 giorni.

Per il **corbezzolo l'estratto in forma liquida** si è rivelato una scelta migliore per l'inclusione nel siero rispetto a quello in polvere

Questi risultati sono importanti per una possibile valorizzazione del siero di latte come ingrediente funzionale per formulare nuovi prodotti con potenziale applicazione nelle industrie nutraceutiche e alimentari

Il gruppo di ricerca



Dr. Cecilia Brunetti (CNR-IPSP)
Prof. Francesco Ferrini (UNIFI)
Dr. Antonella Gori (UNIFI)
Dr. Luana Nascimento (UNIFI)
Dr. Cassandra Detti (CNR-IPSP)
Dr. Mauro Centritto (CNR-IPSP)
Francesca Alderotti (UNIFI)
Lucrezia Muti (UNIFI)

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

cecilia.brunetti@ipsip.cnr.it