



Recupero di molecole di interesse da matrici di *Eruca Sativa*

*Giuseppe Giusto*¹

Abstract

L'interesse verso l'*Eruca Sativa* e le altre piante appartenenti alla famiglia delle Brassicacee, dovuto alle proprietà benefiche antiossidanti e chemiopreventive attribuite agli isotiocianati come l'erucina, ha portato al bisogno di individuare un metodo di estrazione valido ed efficace per tali sostanze. Questo lavoro ha visto l'utilizzo di un metodo di estrazione basato sui seguenti step: macerazione/idrolisi (estrazione solido-liquido) della rucola macinata fresca in acqua a 40°C; processo di idrodistillazione in grado di separare nel condensato le molecole di interesse; estrazione liquido-liquido con diclorometano per portare nel solvente organico le molecole di interesse; concentrazione al rotavap per allontanare il solvente organico. Il metodo descritto è stato applicato in due modi differenti: un primo con macerazione e successiva estrazione, e un secondo simile al primo, ma prevedendo due stadi di macerazione. Successivamente, l'analisi e la quantificazione del contenuto di erucina è avvenuta mediante l'utilizzo dell'HPLC. Dalle analisi cromatografiche è emerso come il processo a doppia macerazione sia più efficace, avendo estratto in totale 36,4 µg/g di secco, superiori ai 26,5 µg/g di secco estratti nel processo a singola macerazione. Inoltre è stata osservata una migliore efficacia dello step di idrodistillazione, quando questa è avvenuta in presenza dei residui solidi della fase di macerazione. Sia dal processo a singola che a doppia macerazione, dei campioni a diversi tempi di miscelazione sono stati prelevati per analizzare la cinetica di estrazione del diclorometano. Dai risultati delle analisi cromatografiche è emerso che la quantità di erucina ottenuta dalla fase di estrazione liquido-liquido non risente, nel range analizzato, del tempo di miscelazione; poiché le analisi effettuate mediante HPLC a 30 minuti, data da un'area di valore 47,3 mAU·s, sono simili a quelle ottenute a più di 20 ore.

¹ Relatori: Prof. Ing. Gaetano Lamberti, Dott. Ing. Diego Caccavo, Ing. Raffaele Mancino

1. Introduzione

1.1 *Eruca Sativa*

L'*Eruca Sativa*, comunemente chiamata rucola, è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Brassicacee. Essa contiene 3709 specie e 338 generi, molte delle quali vengono usate per la preparazione di fibre, oli e insalate [1]. Originaria dei Paesi del Mediterraneo e dell'Asia centro-occidentale, viene oggi coltivata anche in altre parti del mondo. Il nome *Eruca Sativa* è usato per distinguere la specie coltivata dalla corrispettiva selvatica, che prende il nome di *Diplotaxis tenuifolia* e presenta caratteristiche botaniche leggermente diverse. In tempi antichi, tra le civiltà romane e della penisola balcanica, le foglie di rucola venivano usate per la produzione di deodoranti, cosmetici e medicinali [1]. Ad oggi l'uso più comune è quello in ambito culinario, visto il sapore acre e amarognolo (il nome *eruca* deriva dalle parole latine "uro" o "urere" che significa bruciare) dovuto alla presenza di determinati composti bioattivi chiamati glucosinolati [1].

1.2 Glucosinolati

I glucosinolati sono composti organici contenenti zolfo e solubili in acqua. Sono formati a partire da 8 amminoacidi e si dividono in: alifatici, benzenici e indolici [1]. Fanno parte dei composti bioattivi insieme a: fibre, flavonoidi e carotenoidi, composti fenolici, vitamine e minerali. Il loro ruolo biologico è quello di scoraggiare gli erbivori e gli agenti patogeni a cibarsi di parti della pianta, quindi si presume si siano sviluppati come meccanismo di difesa [1]. Grazie alle loro proprietà, sono anche in grado di fornire protezione al nostro organismo contro agenti carcinogeni e mutageni, ma non possono considerarsi bioattivi nel corpo umano finché non vengono convertiti in isotiocianati. Ad oggi sono stati individuati 120 diversi glucosinolati, 14 dei quali sono contenuti all'interno delle foglie e dei semi di *Eruca Sativa*; tra questi è di particolare interesse riportare la glucorafanina e la glucoerucina [1]. Un aspetto importante da sottolineare è che il livello di contenuto e di diversità dei glucosinolati presenti è fortemente influenzato dalle condizioni climatiche in cui la pianta cresce e dal suo corredo genetico.

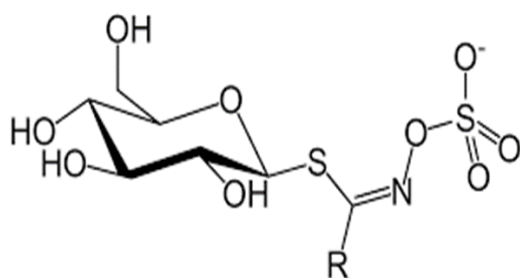


Figura 1. Struttura generale dei glucosinolati [2]

1.2.1 Il sistema glucosinolato-mirosinasi

Le 3 parti fondamentali che costituiscono i glucosinolati sono: il D-tioglucoio, il gruppo aldoxima sulfonato e la catena laterale derivante dall'amminoacido di formazione. Quest'ultima è responsabile della natura del glucosinolato. La bioattività attribuita a questi composti è dovuta però ai prodotti di idrolisi, anch'essi dipendenti dalla natura della catena laterale e dalle condizioni di reazione. Questi prodotti si dividono in: isotiocianati, tiocianati, nitrili e solfati. Per favorire la reazione di idrolisi si ricorre ad un enzima presente all'interno delle cellule vegetali e che prende il nome di mirosinasi. Poiché i glucosinolati sono contenuti nei vacuoli e l'enzima mirosinasi nel citosol [1], bisogna rompere le cellule tramite triturazione o semplice masticamento delle foglie. Una volta che glucosinolati e mirosinasi entrano in contatto, la reazione di idrolisi viene catalizzata e il glucosinolato viene scisso in β -D-tioglucoio e prodotti frammentari dell'aglicone, riportati in precedenza. A pH neutro, i composti più stabili sono gli isotiocianati.

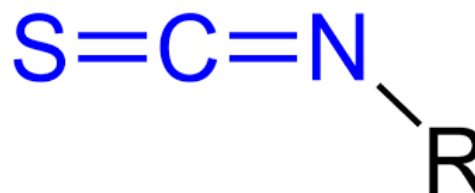


Figura 2. Formula generale di un isotiocianato [3]

1.3 *Erucina*

Tra gli isotiocianati, l'erucina è uno dei composti che ha ottenuto maggior importanza nel corso degli ultimi decenni per via delle sue interessanti proprietà in campo alimentare e farmaceutico. Essa può essere ricavata dall'idrolisi della glucoerucina; isolata per la prima volta nel 1970 dai semi di *Eruca sativa* [4], oppure tramite la riduzione del sulforafano che rappresenta strutturalmente l'analogo ossidato dell'erucina [4]. Il sulforafano è un altro isotiocianato che si ricava dall'idrolisi della glucorafanina, presente principalmente nei broccoli, ed è in grado di attivare enzimi che direttamente o indirettamente esercitano azioni antiossidanti [5]. Molti isotiocianati, come l'erucina, inducono effetti antiproliferativi in determinate cellule tumorali se presenti in alte concentrazioni [6]. In uno studio del 2019 è stato dimostrato come, tramite il lento rilascio di acido solfidrico e a concentrazioni tra 30-100 μ M, l'erucina sia stata in grado di inibire la crescita delle cellule tumorali dell'adenocarcinoma pancreatico (AsPC-1) [6]. Inoltre è stata inibita anche la migrazione delle suddette cellule tumorali e il loro ciclo di vita significativamente alterato. Tutto questo sottolinea come effetti antiossidanti, anti infiammatori e chemiopreventivi siano attribuiti al consumo di Crucifere come broccoli, cavolfiori, cavoli e rucola poiché contengono alti livelli di isotiocianati.

4. Conclusioni

L'interesse verso l'*Eruca Sativa* e le altre piante appartenenti alla famiglia delle Brassicacee, dovuto alle proprietà benefiche antiossidanti e chemiopreventive attribuite agli isotiocianati come l'erucina, ha portato al bisogno di individuare un metodo di estrazione valido ed efficace per tali sostanze. Questo lavoro ha visto l'utilizzo di un metodo di estrazione basato sui seguenti step: macerazione/idrolisi (estrazione solido-liquido) della rucola macinata fresca in acqua a 40°C; processo di idrodistillazione in grado di separare nel condensato le molecole di interesse; estrazione liquido-liquido con diclorometano per portare nel solvente organico le molecole di interesse; concentrazione al rotavap per allontanare il solvente organico. Il metodo descritto è stato applicato in due modi differenti: un primo con macerazione e successiva estrazione, e un secondo simile al primo, ma prevedendo due stadi di macerazione. Successivamente, l'analisi e la quantificazione del contenuto di erucina è avvenuta mediante l'utilizzo dell'HPLC. Dalle analisi cromatografiche è emerso come il processo a doppia macerazione sia più efficace, avendo estratto in totale 36,4 µg/g di secco, superiori ai 26,5 µg/g di secco estratti nel processo a singola macerazione. Inoltre è stata osservata una migliore efficacia dello step di idrodistillazione, quando questa è avvenuta in presenza dei residui solidi della fase di macerazione. Sia dal processo a singola che a doppia macerazione, dei campioni a diversi tempi di miscelazione sono stati prelevati per analizzare la cinetica di estrazione del diclorometano. Dai risultati delle analisi cromatografiche è emerso che la quantità di erucina ottenuta dalla fase di estrazione liquido-liquido non risente, nel range analizzato, del tempo di miscelazione; poiché le analisi effettuate mediante HPLC a 30 minuti, data da un'area di valore 47,3 mAU·s, sono simili a quelle ottenute a più di 20 ore. In conclusione, ulteriori studi sono necessari per capire se sia possibile l'utilizzo di metodi di estrazione non convenzionali, che non necessitano dell'uso di sostanze tossiche come il diclorometano. Tutto ciò affinché queste metodologie possano non solo essere utili per l'estrazione degli isotiocianati, ma possano favorire anche un'economia circolare se applicati alla gestione dei rifiuti alimentari, tenendo in conto sia il guadagno che la salvaguardia ambientale.

Bibliografia

1. Hall, M., J. Jobling, and G. Rogers, *Some perspectives on rocket as a vegetable crop: A review*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 2012. **76**(1): p. 21-41.
2. Wikipedia. *Glucosinolati*. Available from: <https://it.wikipedia.org/wiki/Glucosinolati>.
3. Wikipedia. *Isotiocianati*. Available from: <https://it.wikipedia.org/wiki/Isotiocianati>.
4. Melchini, A. and M.H. Traka, *Biological profile of erucin: a new promising anticancer agent from cruciferous vegetables*. Toxins, 2010. **2**(4): p. 593-612.
5. Haack, M., et al., *Breakdown products of neoglucobrassicin inhibit activation of Nrf2 target genes mediated by myrosinase-derived glucoraphanin hydrolysis products*. 2010.
6. Citi, V., et al., *Anticancer properties of erucin, an H2S-releasing isothiocyanate, on human pancreatic adenocarcinoma cells (AsPC-1)*. Phytotherapy research, 2019. **33**(3): p. 845-855.
7. Coskun, O., *Separation techniques: chromatography*. Northern clinics of Istanbul, 2016. **3**(2): p. 156.
8. Chemistrystudent. *Schema di separazione degli analiti*. Available from: <https://www.chemistrystudent.com/chromatography.html>.
9. Sahu, P.K., et al., *An overview of experimental designs in HPLC method development and validation*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2018. **147**: p. 590-611.
10. Dokumen. *Schema generale HPLC*. Available from: <https://dokumen.tips/documents/cromatografia-liquida-ad-alta-pressione-5689c4eb9ee27.html?page=1>.
11. Arora, R., et al., *Conventional and modified hydrodistillation method for the extraction of glucosinolate hydrolytic products: A comparative account*. SpringerPlus, 2016. **5**: p. 1-4.
12. Melchini, A., et al., *Erucin, a new promising cancer chemopreventive agent from rocket salads, shows anti-proliferative activity on human lung carcinoma A549 cells*. Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**(7): p. 1430-1436.
13. Villatoro-Pulido, M., et al., *An approach to the phytochemical profiling of rocket [*Eruca sativa* (Mill.) Thell.]*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013. **93**(15): p. 3809-3819.
14. Bell, L., et al., *Changes in rocket salad phytochemicals within the commercial supply chain: Glucosinolates, isothiocyanates, amino acids and bacterial load increase significantly after processing*. Food chemistry, 2017. **221**: p. 521-534.
15. Giannattasio, M., *Development and optimization of extraction conditions of Erucin from *Eruca sativa**, in *Industrial Engineering*. 2022/23, Università degli studi di Salerno.
16. Karanikolopoulou, S., et al., *Current methods for the extraction and analysis of isothiocyanates and indoles in cruciferous vegetables*. Analytica, 2021. **2**(4): p. 93-120.
17. Wikipedia. *Diclorometano*. Available from: <https://it.wikipedia.org/wiki/Diclorometano>.
18. Sigma-Aldrich. *Metanolo, scheda delle specifiche*. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sial/322415?utm_source=google&utm_medium=pc&utm_campaign=20849242302&utm_content=165215771268&gclid=EAlaIqobChMzLPwhrHYhgMVIKHoCR0I_gpMEAYASAAEglerPD_BwE.
19. Sigma-Aldrich. *Acetato di etile, scheda delle specifiche*. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigald/319902>.
20. You, Y., et al., *Screening of Chinese brassica species for anti-cancer sulforaphane and erucin*. African Journal of Biotechnology, 2008. **7**(2).