

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e
Ambiente

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
APPLICATE**

TESI DI LAUREA

Estrazione supercritica dell'*Hypericum perforatum* L.

Relatore: Professor Stefano Bona

Correlatore: Dottor Nicola De Zordi

Laureanda: Michela Casanova

Anno Accademico 2021/2022

SOMMARIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | RIASSUNTO | 1 |
| 2 | ABSTRACT | 1 |
| 3 | INTRODUZIONE | 2 |
| 4 | <i>HYPERICUM PERFORATUM</i> L. | 3 |
| 4.1 | Descrizione botanica..... | 3 |
| 4.2 | Profilo fitochimico | 4 |
| 4.3 | Tecniche colturali..... | 7 |
| 5 | ATTIVITÀ TERAPEUTICHE ED INTERAZIONI | 9 |
| 5.1 | Proprietà farmacologiche..... | 9 |
| 5.1.1 | Attività antidepressiva..... | 9 |
| 5.1.2 | Attività antibatterica/antivirale | 10 |
| 5.1.3 | Attività antineoplastica..... | 11 |
| 5.1.4 | Attività antinfiammatoria | 12 |
| 5.2 | Effetti avversi ed interazioni farmacologiche | 12 |
| 5.3 | Uso tradizionale e popolare..... | 14 |
| 6 | ESTRAZIONE CON I FLUIDI SUPERCRITICI | 15 |
| 6.1 | Fluidi supercritici e loro proprietà | 15 |
| 6.2 | Estrazione SFE con CO ₂ supercritica | 19 |
| 7 | RISULTATI DELL'ESTRAZIONE | 23 |
| 7.1 | Parametri estrattivi..... | 23 |
| 7.1.1 | Effetto della densità | 23 |
| 7.1.2 | Effetto della pressione e della temperatura | 24 |
| 7.1.3 | Effetto del tempo di estrazione e del flusso del solvente | 26 |
| 7.1.4 | Effetto dell'utilizzo di un co-solvente | 27 |
| 7.2 | Composizione fitochimica dell'estratto supercritico..... | 27 |
| 7.2.1 | Profilo fenolico e derivati naftodiantronici..... | 28 |
| 7.2.2 | Profilo lipidico e ceroso | 30 |
| 8 | USI DELL'ESTRATTO SUPERCRITICO DI IPERICO | 33 |
| 9 | CONCLUSIONE | 35 |
| | BIBLIOGRAFIA | 36 |
| | SITOGRAFIA | 39 |

1 RIASSUNTO

Il lavoro presentato di seguito va ad approfondire l'estrazione con la tecnica dei fluidi supercritici applicata alla pianta *Hypericum perforatum* L.

Si procede inizialmente con una descrizione botanica della pianta di iperico, del profilo fitochimico e una breve spiegazione delle tecniche utilizzate per la coltivazione.

Si discutono, poi, le principali proprietà farmacologiche, terapeutiche, gli effetti avversi, le interazioni riscontrate e l'uso tradizionale e popolare che ne viene fatto.

Infine, dopo aver trattato i fluidi supercritici con riferimento all'anidride carbonica utilizzata come solvente e definendo brevemente l'impianto base utilizzato per questo tipo di estrazione, attraverso una ricerca bibliografica si identificano i parametri migliori per ottenere la massima resa estrattiva, si indaga sulle principali molecole che vengono rilevate nell'estratto e i possibili impieghi che sono stati riscontrati.

2 ABSTRACT

The work presented below goes to deepen the extraction with the technique of supercritical fluids applied to the plant *Hypericum perforatum* L.

It begins with a botanical description of the hypericum plant, of the phytochemical profile and a brief explanation of the cultivation.

Then, the main pharmacological and therapeutic properties, the adverse effects, the interactions and the traditional and popular use are discussed.

Finally, after the discussion of supercritical fluids with reference to the carbon dioxide used as a solvent and briefly defining the basic implant used for this type of extraction, through a bibliographic search the best parameters are identified to obtain the maximum extraction yield, the main molecules are detected in the extract and the possible uses that have been found.

3 INTRODUZIONE

Il mercato dei prodotti erboristici e degli estratti ottenuti dalle piante è in continua crescita e le ricerche in ambito fitochimico e farmacologico risultano fondamentali per il miglioramento dei rimedi tradizionali erboristici. L'identificazione dei costituenti attivi è essenziale per garantire la qualità e l'attività terapeutica della droga e dei suoi estratti (A. Nahrstedt, V. Butterweck, 2010).

L'incremento delle ricerche volte all'estrazione delle molecole bioattive d'interesse dalle piante ha portato allo sviluppo di tecnologie estrattive innovative, non inquinanti, economiche ed efficienti (T. Arumugham *et al.*, 2021). Una di queste tecniche che negli ultimi anni sta guadagnando sempre più importanza è l'estrazione con i fluidi supercritici (SFE) (H. Römpf *et al.*, 2004), in quanto si tratta di una tecnologia sostenibile, pulita e con una buona resa.

La tecnica SFE è stata applicata a numerose piante, tra cui *Hypericum perforatum* L.; la natura delle molecole lipofile che costituiscono il profilo fitochimico della pianta, come i floroglucinoli (iperforina e adiperforina) e la componente di olio essenziale, sono risultate affini e vantaggiose all'estrazione con questa tecnica rispetto ad altre metodiche di uso più tradizionale.

H. perforatum è una delle 496 specie del genere *Hypericum* e ad oggi è considerata una delle piante medicinali più consumate; attualmente è la più studiata e impiegata in terapia (E. Napoli *et al.*, 2018). Si tratta di una pianta con un importante uso tradizionale e popolare per il trattamento di ferite e ustioni. Molti studi clinici e preclinici hanno, inoltre, confermato altre attività terapeutiche come antidepressivo, antibatterico, antivirale, antineoplastico e antinfiammatorio; questo ha portato all'incremento di interesse delle singole molecole e dello sviluppo di metodiche estrattive altamente selettive come, appunto, l'estrazione con i fluidi supercritici.

4 *HYPERICUM PERFORATUM* L.

4.1 Descrizione botanica



Figura 1. *Hypericum perforatum* L. Fonte: L. Celli (2017)

Hypericum perforatum L. (iperico) (figura 1), appartenente alla famiglia delle *Hypericaceae*, è una pianta erbacea perenne glabra, si trova comunemente nelle zone temperate ed è ormai diffusa in tutto il mondo.

La pianta può raggiungere fino al metro d'altezza e l'apparato radicale è fittonante.

Il fusto è rotondeggiante, di colore rossastro, eretto, presenta due coste lungo tutta la lunghezza in rilievo ed è molto ramificato nella parte superiore.

Le foglie si presentano di piccole dimensioni (8-35 mm), intere, piane, opposte, sessili, di forma ovale-lanceolata e di colore verde-giallo; la lamina fogliare è caratterizzata dalla presenza di una punteggiatura traslucida (strutture ghiandolari) che la attraversa da parte a parte e osservandola in controluce sembra avere l'aspetto perforato dal quale prende il nome.

I fiori (figura 2) sono raggruppati in grandi infiorescenze cimose di colore giallo-oro, sono simmetrici, composti da 5 petali e 5 sepali. Essi presentano lungo tutto il perimetro delle ghiandole puntiformi di colore nero-marrone e contengono i principi attivi; il calice è di piccolissime dimensioni posto sotto i petali ed è formato da sepali affusolati provvisti anche loro di ghiandole traslucide; sono presenti tre fascetti di stami di colore giallo dorato.



Figura 2. Fiori di iperico. Fonte: *cnr.it*

L'ovario è di forma allungata, conico e provvisto di tre stili.

I frutti maturano dal fiore in tarda estate e sono formati da una capsula a tre lobi deiscente contenente numerosi semi bruni cilindrici lunghi 1 mm, provvisti di perforazioni disposte longitudinalmente.

4.2 Profilo fitochimico

I principali componenti chimici presenti nella pianta sono:

- naftodiantroni: sono derivati antrachinonici, le principali molecole appartenenti a questa classe sono l'ipericina (0,05%) (figura 3) e la pseudoipericina, (0,30%) le quali vengono accumulate all'interno delle ghiandole nere. La loro origine biosintetica segue la via dei polichetidi, a partire da un ottachetide si arriva alla formazione dell'emodina antrone che rappresenta il precursore iniziale; successivamente si ha una reazione di condensazione e si forma l'emodina diantrone che subisce un'ossidazione fenolica creando la protoipericina, la quale in seguito all'esposizione alla luce e ad un enzima diventa ipericina (V. S. Velingkar *et al.*, 2017) (OMS: monografie di piante medicinali, 2004). Nella pianta ritroviamo i precursori (protoipericina, protopseudoipericina e ciclopseudoipericina) i quali esposti alla luce vengono convertiti nei derivati ipericina e pseudoipericina. L'ipericina (4, 5, 7, 4', 5', 7'-esaidrossi-2', 2'-dimetil-mes-*o*-naftodiantrone) chimicamente è un chinone policiclico avente sei gruppi ossidrilici; viene

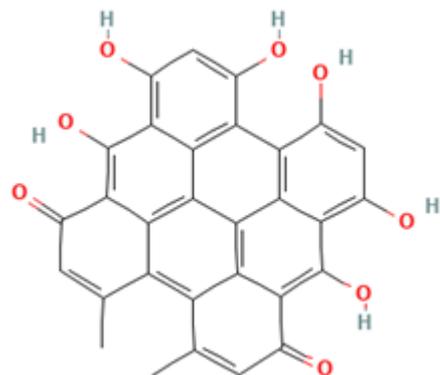


Figura 3. Struttura chimica dell'ipericina. Fonte: *pubchem.com*

considerata un fotosensibilizzante, ossia un composto che si attiva in presenza dei raggi UV e induce una reazione cutanea avversa, e i suoi effetti fototossici sono stati studiati in cellule, batteri, virus e animali (G. P. De Andrade *et al.*, 2021).

- **floroglucinoli:** si tratta di floroglucinoli prenilati bioattivi, il principale è l'iperforina (dal 2% al 4,5%) (figura 4) e fa parte della famiglia degli acilfloroglucinoli policiclici prenilati, denominati PPAP. La famiglia dei PAPP è costituita da composti da una struttura altamente sostituita e ossigenata (L. C'izmek *et al.*, 2021). Viene sintetizzata nelle ghiandole lucide e in minima parte in quelle più scure. La biosintesi deriva dalla via del non-mevalonato dei terpeni dove tre molecole di dimetilallil difosfato e una molecola di geranyl difosfato si legano a una porzione di floroglucinolo e la chiusura dell'anello dà origine all'iperforina (V. S. Velingkar *et al.*, 2017). È una molecola relativamente lipofila, suscettibile al calore e alla luce, in presenza dei quali viene indotta una decomposizione ossidativa (S. Glisic *et al.*, 2008). Troviamo presente anche l'adiperforina in quantità minori (dallo 0,2% al 1,9%) (J. Barnes *et al.*, 2001).

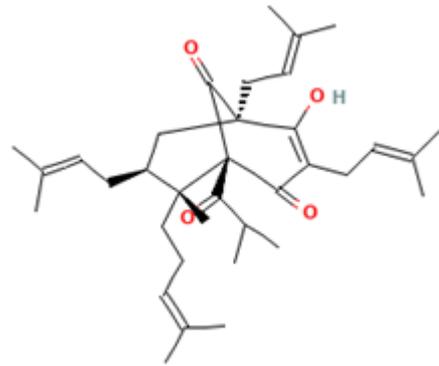


Figura 4. Struttura chimica dell'iperforina. Fonte: pubchem.com

- **flavonoidi:** sono metaboliti secondari derivati dalla fenilalanina e seguono la via del fenilpropanoide. La biosintesi inizia dall'acido cinnamico che viene attivato a 4-idrossicinnamoil-CoA, al quale si legano 3 unità di acetato per formare un polichetide, la struttura si ripiega generando il secondo anello; avviene un'aromatizzazione con la riduzione dei gruppi carbossilici in ossidrilici portando alla formazione della molecola di calcone. L'ultimo passaggio prevede la chiusura del terzo anello con la formazione della naringenina, il precursore dei flavonoidi. Sono una classe di composti fenolici a basso peso molecolare, distribuiti in modo ubiquitario nel regno vegetale e vengono accumulati nei vacuoli come glicosidi (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019). All'interno della pianta troviamo flavoni

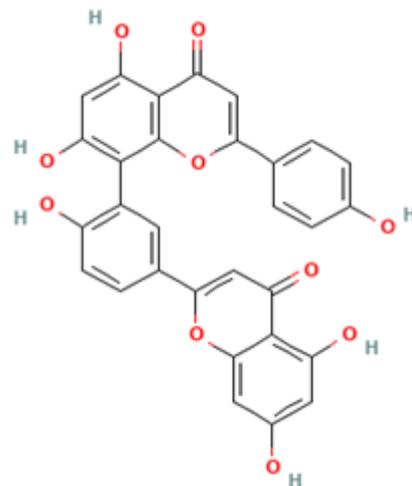


Figura 5. Struttura chimica dell'amentoflavone. Fonte: pubchem.com

(luteolina), flavonoli (quercetina), biflavonoidi come la biapigenina e l'amentoflavone (figura 5), catechine e glicosidi (iperoside, isoquercitrina, quercitrina, rutina,) che sono presenti circa al 2-4% (J. Barnes *et al.*, 2001) (OMS: monografie di piante medicinali, 2004).

- olio essenziale: è presente intorno allo 0,05-0,9% e a questo gruppo appartengono molte molecole principalmente terpenoidi. Sono liquidi a temperatura ambiente, volatili e lipofili. Il maggior componente presente è il metil-2-ottano e sono contenute tracce di metil-2-decano e n-undecano, α e β -pinene, α -terpineolo, mircene, limonene (monoterpeni), cariofillene e umulene (sesquiterpeni) (J. Barnes *et al.*, 2001).
- acidi fenolici: sono derivati dell'acido cinnamico, presentano un anello aromatico collegato ad una catena a tre termini, sono solubili in solventi organici in condizioni leggermente acide per stabilizzarli. Nella pianta troviamo l'acido caffeico (0,1%) (figura 6), acido ferulico e acido clorogenico (inferiore allo 0,1%) (J. Barnes *et al.*, 2001) (V. S. Velingkar *et al.*, 2017).

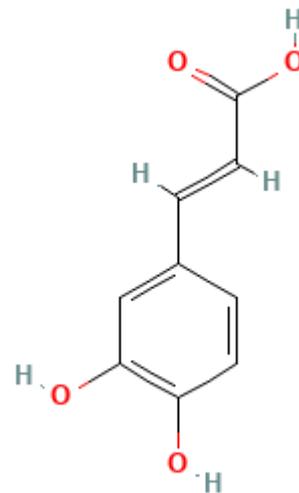


Figura 6. Struttura chimica dell'acido caffeico. Fonte: pubchem.com

- tannini: composti polifenolici solubili in acqua, nella pianta è stata riportata la presenza di proantocianidine, strutture condensate di un numero variabile di unità flavan-3-oliche, presenti circa per l'8-9% (J. Barnes *et al.*, 2001).
- altri componenti: acido nicotinico, miristico, palmitico, stearico, carotenoidi, pectine (J. Barnes *et al.*, 2001).

4.3 Tecniche colturali

L'iperico predilige zone soleggiate e climi miti, ma essendo molto adattabile può essere coltivato anche in penombra e in quasi tutti i tipi di terreno a condizione che siano ben drenati in quanto teme i ristagni d'acqua.

La tolleranza per il pH del suolo varia da 4.3 a 7.6 (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019) e il range di temperatura alla quale resiste va da +25 °C a -10 °C.

La pianta non ha bisogno di irrigazioni frequenti, ma sono necessarie durante la semina, dopo il trapianto e dopo il taglio.

La preparazione del terreno prevede l'aratura autunnale e l'erpatura, nel caso in cui si faccia la semina diretta è consigliabile effettuare anche la rullatura, in quanto il terreno deve essere lavorato finemente per poter ospitare il seme di piccole dimensioni (peso di 1000 semi = 0,1 g), durante la preparazione del terreno si effettua la concimazione di fosforo e potassio, mentre l'azoto viene distribuito dopo il trapianto e dopo i tagli.

Le nuove piante si possono ottenere per semina diretta o trapianto. Se si procede con la semina diretta bisogna accertarsi che il terreno sia nelle condizioni di lavorazione ottimali e, siccome la germinabilità è bassa (20-25%), si utilizzano circa 3 kg/ha di semente. Il seme viene deposto con le apposite macchine sulla superficie del terreno e non deve essere interrato, ma rullato per farlo attecchire meglio. La semina nell'emisfero settentrionale viene eseguita ad inizio maggio e la pianta emerge dopo circa tre settimane. Essa può essere effettuata anche a settembre-ottobre lasciando il seme dormiente per tutto l'inverno, oppure in aprile trattando prima la semente con una refrigerazione per 7 giorni a 4 °C. Per quanto riguarda il trapianto, si procede al posizionamento del seme nelle apposite cassette verso metà febbraio in ambiente umido e ad una temperatura di 20-25 °C, nel giro di 2-3 settimane in queste condizioni si avrà la germinazione. Quando le piantine raggiungono la grandezza adeguata e sviluppano l'apparato radicale possono essere introdotte in campo.

Le piantine germogliate necessitano di lavorazioni meccaniche tra le interfile e manuali tra le file per evitare la crescita di piante infestanti.

La coltura di iperico viene attaccata soprattutto da funghi (ad esempio *Verticillium* e *Fusarium*) che provocano ingiallimento e imbrunimento delle foglie e nei casi peggiori la morte della pianta, per evitare questo non deve esserci ristagno idrico e le piante non devono essere troppo fitte, la densità consigliata per l'impianto è di 3 piante su m².

La parte della pianta che viene utilizzata come droga e che viene raccolta durante la fioritura (24 giugno) sono le sommità fiorite composte dai fiori e dalle foglie (ultimi 30-60 cm).

Il primo anno si ha una resa di circa 15-30 q/ha e il secondo anno varia da 15 a 70 q/ha in base allo stato della pianta, raramente viene mantenuta in campo dopo i due anni.

Una volta raccolte le parti interessate della pianta vengono essiccate a circa 40-60 °C per 24 ore fino a raggiungere un'umidità inferiore al 10%.

5 ATTIVITÀ TERAPEUTICHE ED INTERAZIONI

In commercio è possibile trovare fitofarmaci, integratori, estratti oleosi (olio di iperico) e prodotti cosmetici come creme dermoattive preparate a partire da *H. perforatum* ed utilizzate per numerose attività.

Le recenti ricerche in ambito clinico e preclinico hanno dimostrato numerose altre attività da parte dei costituenti chimici principali come antidepressivo, antivirale, antibatterico, antineoplastico e antinfiammatorio; di seguito si espongono le principali attività e gli studi a supporto.

5.1 Proprietà farmacologiche

5.1.1 Attività antidepressiva

Studi controllati e randomizzati hanno dimostrato che l'estratto di iperico possiede un maggiore effetto antidepressivo rispetto al placebo per trattare la lieve/moderata depressione (J. Barnes *et al.*, 2001).

Inizialmente l'attività antidepressiva è stata attribuita all'ipericina, oggi con le nuove ricerche sappiamo che anche l'iperforina e i flavonoidi partecipano, (A. Nahrstedt *et al.*, 2010) anche se il meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiarito.

In base alle ultime ricerche, il meccanismo più probabile con il quale l'estratto di *H. perforatum* esplicherebbe il suo effetto di blando antidepressivo risiede nell'inibizione della ricaptazione delle monoamine con attività inibitorie rivolte alle monoamino ossidasi (MAO) e altri effetti sinergici (T. Herraiz *et al.*, 2018). Le MAO sono enzimi fondamentali per il Sistema Nervoso Centrale (SNC) e periferico e presentano due isoforme: MAO-A, coinvolte nelle depressioni e nel metabolismo della adrenalina, serotonina e noradrenalina, e MAO-B, coinvolte nelle malattie neurodegenerative e nel metabolismo della tiamina e β -fenilaltilammina. Gli estratti idro-alcologici di *H. perforatum*, analizzati tramite HPLC-DAD-MS, contenevano ipericina, pseudoipericina, iperforina, adiperforina, iperforina e flavonoidi, con il contenuto maggiore nell'estratto ricavato dai fiori, e hanno dimostrato attività inibitoria per le MAO-A. L'inibizione è stata riscontrata da parte dell'ipericina con un valore di concentrazione inibente IC_{50} del 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e della quercetina con un valore di IC_{50} dello $11,1 \pm 0,8 \mu\text{M}$, mentre l'iperforina non ha avuto alcuna attività (T. Herraiz *et al.*, 2018). L'effetto antidepressivo sembra sia dovuto sia all'ipericina che alla componente flavonoidica, e si può dedurre che i flavonoidi lavorano in maniera sinergica

all'ipericina per l'attività antidepressiva. Studi *in vivo* su ratti in gravidanza trattati con un estratto di iperico acquoso alle dosi di 72 o 144 mg/kg al giorno per via orale, hanno dimostrato che si attenuavano i sintomi della depressione post-partum, l'estratto secco conteneva lo 0,3% di ipericina e non ha avuto effetti collaterali (V. S. Velingkar *et al.*, 2017).

Anche l'iperforina ha dimostrato attività antidepressive. Studi *in vitro* hanno confermato che la molecola era in grado di inibire la ricaptazione della serotonina, dopamina, acetilcolina e noradrenalina in modo uguale o addirittura superiore ai farmaci antidepressivi sintetici (A. Nahrstedt *et al.*, 2010). Il bersaglio molecolare dell'iperforina è il recettore canale TRPC6 presente nel SNC, ossia un canale cationico non selettivo, l'attivazione di questo aumenta l'introito di ioni Ca^{2+} e Na^+ nello spazio intracellulare e di conseguenza diminuisce l'entrata di neurotrasmettitori (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019).

Infine, la pseudoipericina svolge un antagonismo selettivo per i recettori CRF, presenti nella membrana dei neuroni, legati alle risposte di stress e ansia (V. S. Velingkar *et al.*, 2017).

5.1.2 Attività antibatterica/antivirale

L'attività rivolta contro i microrganismi patogeni è dovuta ai floroglucinoli e naftodiantroni, mentre i flavonoidi sono inattivi.

L'azione antibatterica dell'estratto di iperico è stata evidenziata per la prima volta nel 1959 attribuita all'iperforina. Studi *in vitro* hanno confermato che l'iperforina inibisce i batteri Gram positivi come per esempio penicilline, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium diphtheriae* con un range di concentrazione da 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$, ma risulta inefficace contro i batteri Gram negativi. L'ipericina ha dimostrato attività antibatteriche *in vitro* per lo *Staphylococcus aureus* ad una concentrazione di 40 μM incubato per 30 minuti e poi irradiato con 5-12 J/cm^2 di luce visibile ad una lunghezza d'onda tra 600-800 nm, ma non ha presentato nessuna attività per l'*Escherichia Coli* (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019).

L'attività antivirale è esplicata dall'ipericina contro i virus dotati di envelope, involucro proteico che circonda il capsido e protegge il materiale genetico, come ad esempio *Herpes simplex*, virus dell'influenza A e anche il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), tuttavia i virus nudi non sono stati inibiti. Il meccanismo non è ancora del tutto compreso, ma alcuni ricercatori hanno ipotizzato che, siccome l'attività dell'ipericina viene aumentata dalla luce con generazione di un ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) molto

reattivo, questo vada ad interferire con la costruzione proteica dell'involucro (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019).

5.1.3 Attività antineoplastica

L'attività antineoplastica è stata studiata studiando l'ipericina. Questa molecola è un fotosensibilizzante e le varie ricerche hanno sfruttato questa sua caratteristica per la fotochemioterapia o terapia fotodinamica (PDT). La PDT è ormai usata da anni in campo dermatologico e oncologico e prevede l'applicazione di una crema con la presenza di una sostanza fotosensibilizzante e poi l'irradiazione con luce visibile con una determinata lunghezza d'onda. L'ipericina tende ad accumularsi nelle cellule tumorali e, dopo un certo periodo di incubazione, viene esposta alla luce visibile (luce rossa) ad una lunga lunghezza d'onda definita portandola ad uno stato eccitato. La molecola eccitata reagisce con l'ossigeno presente formando i radicali liberi, come l'ossigeno singoletto, che danneggiano le cellule che li accumulano. I meccanismi con i quali esplicherebbe la sua azione sono: perdita dell'integrità della membrana, restringimento cellulare ed esternalizzazione della fosfatidilserina. I target per l'ipericina fotosensibilizzata sono i mitocondri, l'apparato del Golgi e il reticolo endoplasmatico e può indurre apoptosi o autofagia (V. S. Velingkar *et al.*, 2017).

Una recensione condotta nel 2021 ha raccolto tutti i vari studi *in vitro*, quello che è emerso è che c'è una correlazione tra concentrazione di ipericina e l'energia della luce utilizzata, quasi tutte le ricerche concordano nell'affermare che dosi elevate di luce inducono elevati indici di necrosi, mentre dosi più basse inducono apoptosi (P. De Andrade *et al.*, 2021).

Gli aspetti positivi dell'ipericina sono riconducibili al fatto che presenta un veloce assorbimento e rapida rimozione dai tessuti sani, quindi, possiede un'elevata selettività per i tessuti tumorali; formulazioni idrosolubili di ipericina (0,1 mg/kg) hanno dimostrato un'efficacia circa del 90% verso i tumori (V. S. Velingkar *et al.*, 2017).

Anche l'iperforina ha dimostrato attività antineoplastiche *in vitro*, è stato riscontrato il rilascio di citocromo C da mitocondri isolati attivando così l'apoptosi (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019); tuttavia non viene utilizzata per la preparazione di farmaci antitumorali in ambito clinico perché è scarsamente solubile e instabile in acqua. Per ovviare a questi problemi è stata sintetizzata un'altra molecola, l'aristoforina (S. Velingkar *et al.*, 2017).

5.1.4 Attività antinfiammatoria

L'estratto di iperico ha dimostrato attività antinfiammatorie inibendo l'espressione dei geni che hanno portato alla formazione di sostanze pro-infiammatorie come ciclossigenasi 2 (COX-2), interleuchina 6 (IL-6) e dell'ossido nitrico sintasi (NO sintasi) (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019).

Uno studio *in vivo* su 70 ratti ai quali era stata indotta una sintomatologia infiammatoria al colon fornendogli 2 ml di acido acetico al 3% e successivamente trattati con un estratto di iperico orale con due dosaggi diversi (300 e 600 mg/kg) e con un gel intracolonic al 10% e 20%, hanno dimostrato all'esame isto-patologico una diminuzione dell'infiammazione dose-dipendente: a dosi più elevate si riduceva maggiormente la flogosi (S. Velingkar *et al.*, 2017). In un altro studio, l'estratto di iperico ha diminuito l'infiammazione dovuta alla pleurite indotta ai topi trattati con carragenina andando ad inibire l'NF-KB e STAT-3 (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019).

In particolare, l'ipericina attenua l'espressione di proteine attivate dalla proteina-chinasi C (PKA) e inibisce la produzione di IL-2 e l'iperforina inibisce le COX-1, la 5-lipossigenasi e prostaglandina E2 (PGE2). Inoltre, è stato dimostrato che anche l'acido clorogenico, l'amentoflavone, la quercetina e la pseudoipericina hanno diminuito l'infiammazione dovuta dalla PGE2 (M. Yaseen Mir *et al.*, 2019).

5.2 Effetti avversi ed interazioni farmacologiche

L'iperico risulta essere una pianta ben tollerata e sicura, soprattutto se assunta come terapia singola; sono riportati dei casi di reazioni avverse ma di natura lieve come irritazioni gastrointestinali, stanchezza e irrequietezza (S. Velingkar *et al.*, 2017).

La pianta non è, però, priva di pericoli, presenta interazioni con molti farmaci e si è dimostrata un agente fotosensibilizzante.

La sua assunzione, in casi riportati nell'uomo, ha indotto la riduzione della concentrazione ematica di numerosi farmaci, tra cui ciclosporina, indinavir, metadone, midazolam e warfarin (S. Chrubasik-Hausmann *et al.*, 2019). La letteratura riporta l'inizio delle segnalazioni di interazioni farmacologiche con l'aumento del contenuto di iperforina negli estratti (R. Madabushi *et al.*, 2006). Studi *in vitro* condotti su epatociti umani hanno evidenziato che è il contenuto di questa molecola che induce l'espressione del CYP3A4 e della p-glicoproteina. Il CYP3A4 è l'isoforma più abbondante del CYP450 e metabolizza il 50% dei farmaci assunti, mentre la P-glicoproteina è una proteina di membrana responsabile del trasporto di molti xenobiotici. Sempre *in vitro* è

stato dimostrato che l'iperforina si lega al recettore X pregnano (PXR) e aumenta l'espressione del CYP2B6 e 3A4 (S. Zhou *et al.*, 2004). A conferma di tutto ciò, studi clinici condotti utilizzando estratti a basso contenuto di iperforine hanno mostrato una bassa induzione enzimatica (R. Madabushi *et al.*, 2006).

Particolare attenzione si deve porre durante l'assunzione di contraccettivi orali e durante la gravidanza. Molti ormoni steroidei presenti negli anticoncezionali ormonali sono substrati del CYP3A4 (S. Zhou *et al.*, 2004). Inoltre, studi *in vivo* su cavie e conigli hanno dimostrato l'effetto uterotonico e una segnalazione di una donna in gravidanza che, ha iniziato ad assumere 900 mg di iperico al giorno alla ventiquattresima settimana fino ad assumere l'ultima dose 24 ore prima del parto, ha sviluppato una trombocitopenia. È quindi sconsigliata durante la gravidanza e l'allattamento (J. Barnes *et al.*, 2001).

L'ipericismismo, condizione di fotosensibilizzazione primaria causata dall'iperico associato alla luce, è dovuta all'ipericina, nota sostanza fotosensibilizzante. I casi riportati in letteratura sono pochi e riconducibili ad un trattamento prolungato nel tempo a dosi molto elevate. Uno studio svolto in doppio cieco su 13 volontari sani trattati con una singola dose di estratto di 900 mg (2,81 mg di ipericina), 1800 mg (5,62 mg di ipericina) e 3600 mg (11,25 mg di ipericina) e irradiati dopo 4 ore con raggi UVA e UVB non hanno presentato nessuna reazione di fotosensibilizzazione. Un altro studio condotto *in vivo* su 50 volontari sani trattati per 15 giorni con 600 mg di estratto per una quantità giornaliera di ipericina pari al 5,62 mg ha evidenziato un moderato aumento della sensibilità ai raggi UVA, ma le dosi utilizzate superano quelle terapeutiche (J. Barnes *et al.*, 2001).

Alla luce di tutto ciò, il Ministero della Salute nell'allegato 1 del D.M. del 10 agosto 2018, nel quale viene riportato l'elenco delle piante e loro parti ammesse per l'utilizzo negli integratori alimentari, alla voce di *H. perforatum* ha indicato un limite giornaliero di ipericina totale assumibile dello 0,7 mg e un rapporto di iperforine/ipericina non superiore a 7 (per iperforine si considera la somma di iperforina e adiperforina); inoltre è riportata l'avvertenza di consultare il medico prima di assumere prodotti contenenti iperico se si stanno assumendo anche altri farmaci.

5.3 Uso tradizionale e popolare

Nella tradizione popolare, la pianta viene usata per la preparazione di oli e tinture da applicare a livello topico per trattare ustioni, abrasioni, ferite, scottature e ulcere cutanee e per via interna per diverse condizioni di dolore; gli studi in campo scientifico hanno supportato tali applicazioni (U. Wölflé *et al.*, 2014).

H. perforatum è una pianta conosciuta fin dall'antichità, il primo testo in cui è menzionata per il suo aspetto curativo è “*Naturalis Historia*” di Plinio il Vecchio (23-79 d. C.) (N. Galeotti, 2017). È stata successivamente utilizzata dai medici greci per la cura di diverse condizioni come ustioni, ferite, ulcere e disturbi gastrointestinali, alcuni erboristi del XVI secolo la usavano anche contro punture e morsi di insetti velenosi (N. Galeotti, 2017). Le preparazioni che venivano utilizzate nella tradizione popolare, ma che sono preparate ancora oggi, erano l'oleolita, tinture e infusi.

L'olio di iperico viene preparato dalla macerazione delle parti aeree fresche o essiccate messe a contatto con oli vegetali, ad esempio oliva e girasole, con un rapporto droga: solvente di 1:4. Tutto il materiale viene inserito in un contenitore di vetro e lasciato a riposo, in seguito l'olio viene filtrato ed esposto alla luce per 4/6 settimane, assumerà così un colore rosso intenso caratteristico della preparazione dato dalla degradazione dell'ipericina (U. Wölflé *et al.*, 2014). L'estratto oleoso viene utilizzato per via esterna ed ha dimostrato proprietà cicatrizzanti, in quanto aumenta il numero totale di fibroblasti e anche in numero di cellule che si dividono per mitosi, inoltre è stato dimostrato che l'iperforina stimola la differenziazione dei cheratinociti in modo tale da ripristinare l'integrità della cute (U. Wölflé *et al.*, 2014).

Le altre due formulazioni vengono utilizzate per via interna per il trattamento di infiammazioni/infezioni urinarie, disturbi biliari e affezioni respiratorie (N. Galeotti, 2017); le tinture sono preparazioni liquide ottenute per macerazione della droga in un solvente idralcolico con un rapporto droga: estratto 1:5/10, mentre gli infusi sono ottenuti ponendo l'acqua alla temperatura di ebollizione a contatto con la droga con un rapporto 1:10/100 e dopo raffreddamento viene filtrato il tutto.

Attualmente in commercio si trovano anche altre preparazioni come unguenti, gel, pomate e spray che presentano una formulazione più stabile, sono più facili da applicare e utilizzabili per stimolare il rinnovamento cellulare e mantenere una barriera cutanea integra.

6 ESTRAZIONE CON I FLUIDI SUPERCRITICI

L'estrazione con fluidi supercritici (SFE) è una metodica estrattiva solido-liquido dove vengono utilizzati come solventi delle sostanze portate alle loro condizioni supercritiche. Può essere applicata a livello:

- Laboratoriale-analitico, utilizzando pochi grammi di campione
- Pilota, utilizzando chili di materiale
- Industriale, trattando tonnellate di materiale.

Le tecniche estrattive tradizionali, come macerazione, distillazione e Soxhlet, presentano molteplici svantaggi: tempi lunghi di estrazione, grande quantità di solvente utilizzato, bassa efficacia; inoltre, i solventi organici come l'esano, utilizzati nei processi estrattivi, sono inquinanti per l'ambiente e non sono sicuri da maneggiare (O. Wrona *et al.*, 2017).

La SFE presenta, invece, molti vantaggi:

- è una tecnologia verde a basso inquinamento ambientale perché non vengono utilizzati solventi organici
- un ridotto tempo di estrazione
- un'alta resa
- la produzione di estratti finali purificati grazie all'assenza del solvente

Nonostante l'elevato costo dell'impianto, per i motivi citati sopra, costituisce una valida alternativa rispetto le tecniche estrattive tradizionali e sta diventando sempre più utilizzata. La FDA (Food and Drug Administration) definisce questo processo come GRAS (Generally Recognized As Safe).

6.1 Fluidi supercritici e loro proprietà

Lo stato supercritico è stato scoperto nel 1822 dal Barone Charles Cagniard de la Tour, ma ha iniziato ad assumere importanza dagli anni '70.

Per comprendere il concetto di fluidi supercritici è opportuno fare un breve ripasso sugli stati di aggregazione della materia e i passaggi di stato.

La materia può presentarsi allo stato solido (dotato di forma e volume propri), liquido (con volume proprio ma non una forma) o gassoso (non ha né una forma né un volume proprio ma si espande fino ad occupare l'intero spazio a disposizione). Si può passare da uno stato ad un altro cambiando i parametri di pressione e temperatura. All'aumentare

della pressione, le molecole che compongono la materia sono meno libere di muoversi e si passa dallo stato gassoso a liquido (condensazione) a solido (congelamento). All'aumentare della temperatura, aumenta l'energia cinetica e le molecole si muovono più liberamente ottenendo un passaggio da stato solido a liquido (fusione) a gassoso (evaporazione).

Per afferrare questi concetti ci viene in aiuto il diagramma di fase (figura 7), esso rappresenta sul piano cartesiano il cambio dello stato fisico della sostanza o miscele di sostanze al variare della temperatura e pressione. La temperatura viene indicata sull'asse dell'ascisse e la pressione sull'asse delle ordinate, mentre le linee che separano i vari stati rappresentano le condizioni in cui si ha il passaggio di stato. Si notano altri due punti: punto triplo e punto critico. Il punto triplo rappresenta la coesistenza di tutti e tre gli stati in equilibrio, mentre il punto critico indica i valori massimi di temperatura e pressione ai quali le fasi gassose e liquide coesistono, al di sopra si entra nella regione supercritica e la sostanza si trova in uno stato indefinito.

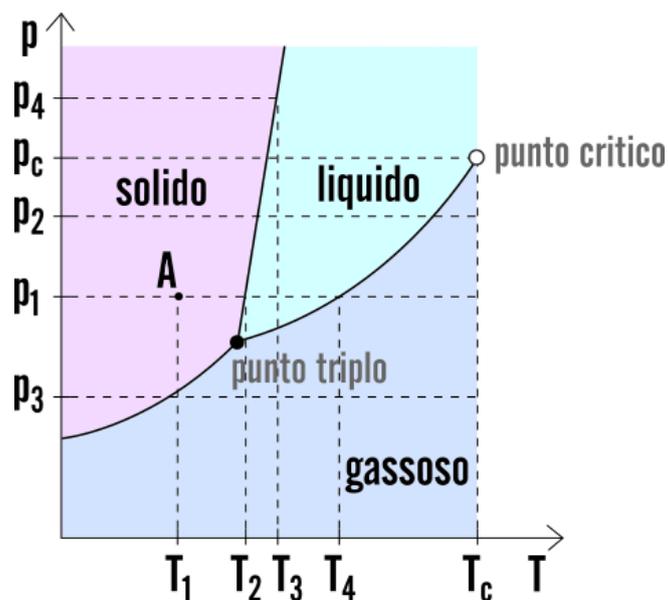


Figura 7. Diagramma di fase. Fonte: youmath.it

Una sostanza portata nella regione supercritica viene definita fluido supercritico e la IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) definisce il fluido supercritico come qualsiasi elemento, sostanza o miscela riscaldata sopra la temperatura critica (T_c) e pressurizzata al di sopra della pressione critica (P_c). Per T_c si intende la temperatura oltre la quale, anche aumentando la pressione, la sostanza rimane allo stato gassoso e non diventa liquida. Per P_c si intende il valore di pressione oltre al quale, anche con l'aumento della temperatura, la sostanza rimane allo stato liquido e non passa al gassoso. Visivamente si può notare che, quando la sostanza si trova al di sotto del P_c,

la fase liquida e gassosa sono divise da un menisco, mentre andandosi a ritrovare nella regione supercritica questo scompare creando così una fase omogenea.

Il fluido supercritico presenta caratteristiche intermedie tra lo stato gassoso e liquido, in particolare una viscosità simile ai gas con tensione superficiale molto bassa, densità simile ai liquidi che facilita l'eluizione e diffusività intermedia (tabella 1). Queste proprietà conferiscono delle caratteristiche particolari ai fluidi supercritici; modificando pressione e temperatura posso rendere l'estrazione più selettiva, la diffusività è più veloce rispetto ai liquidi e quindi l'estrazione può avvenire più velocemente. Tutto ciò rende i fluidi supercritici dei buoni solventi, riescono a penetrare facilmente all'interno del materiale vegetale e solubilizzare i componenti che più ci interessano.

| | liquido | fluido supercritico | gas |
|---------------------------------------|----------------|----------------------------|------------|
| Densità (g/ml) | 1 | 0,05-1 | 10^{-3} |
| Viscosità (Pa*s) | 10^{-3} | 10^{-4} - 10^{-5} | 10^{-5} |
| Diffusività (cm²/s) | 10^{-5} | 10^{-3} | 10^{-1} |
| Tensione superficiale (mN/m) | 20-50 | 0 | 0 |

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche dei liquidi, fluidi supercritici e gas. Fonte: Perry R.H. and Green D.W., Supercritical Fluid Separation Processes (2008)

Numerose sostanze possono essere utilizzate come fluidi supercritici (tabella 2), ma vengono privilegiate quelle che raggiungono la regione supercritica con valori di temperatura e pressione più bassi per avere costi più contenuti e non deteriorare i componenti termolabili.

L'anidride carbonica (CO₂) è la maggiormente utilizzata per diversi motivi:

- ✓ presenta T_c (31 °C) e P_c (73 bar) relativamente basse e quindi facili da raggiungere e che non degradano le molecole termolabili
- ✓ è economica e facile da produrre
- ✓ è chimicamente inerte, non tossica, inodore, non infiammabile
- ✓ è facilmente recuperabile e riutilizzabile
- ✓ diffonde più velocemente nelle matrici vegetali perché è una molecola piccola
- ✓ il tempo di estrazione è ridotto

| SOSTANZA | Tc (°C) | Pc (bar) |
|-----------------------------|----------------|-----------------|
| Metano | -82 | 46 |
| Etilene | 9 | 50.3 |
| Clorotrifluorometano | 29 | 38.7 |
| Anidride carbonica | 31 | 73.8 |
| Etano | 32 | 48.8 |
| Propilene | 92 | 46.2 |
| Propano | 97 | 42.4 |
| <i>i</i>-butano | 136 | 36.3 |
| <i>n</i>-butano | 152 | 38 |
| <i>n</i>-pentano | 197 | 33.7 |
| <i>n</i>-esano | 234 | 29 |
| Ammoniaca | 133 | 113 |
| Dietilere | 194 | 36.4 |
| Cloroformio | 263.4 | 53.7 |
| Acetone | 235 | 47 |
| Metanolo | 240 | 80.9 |
| Etanolo | 243 | 61.3 |
| Benzene | 289 | 48.9 |
| Toluene | 319 | 41.1 |
| Acqua | 374 | 220 |

Tabella 2. *Tc e Pc di alcune sostanze utilizzate come fluidi supercritici. N. De Zordi et al., Pharmaceutical and Nutraceutical applications of supercritical Carbon Dioxide (2014)*

6.2 Estrazione SFE con CO₂ supercritica

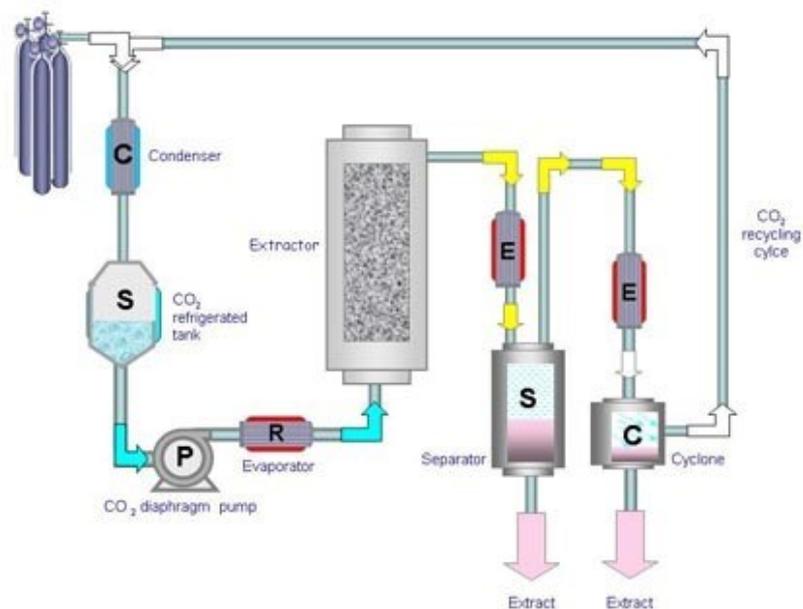


Figura 8. Impianto di estrazione con sc-CO₂. Fonte: avantech.it

L'impianto base (figura 8) è composto da un cilindro contenente la CO₂ allo stato liquido o gassoso, una pompa, una camera porta campione termostata, una valvola di laminazione, una camera di recupero e dispositivo di raccolta. La tecnica prevede due step: l'estrazione delle sostanze solubili nella CO₂ supercritica (sc-CO₂) e la separazione dell'estratto ottenuto dal solvente. La CO₂ viene pressurizzata e riscaldata per renderla supercritica, attraverso una pompa viene inviata all'interno della camera porta campione, dove è situata la sostanza da sottoporre al processo estrattivo. Il solvente diffonde nella droga e dissolve le sostanze interessate. Esce così dalla camera la sc-CO₂ arricchita che viene trasportata nella camera di recupero, qui viene abbassata la pressione per farla diventare gassosa ed essere riutilizzata per un altro ciclo, mentre i prodotti estratti si trovano allo stato liquido o solido e vengono recuperati dal dispositivo di raccolta.

Ci sono diversi fattori da tenere in considerazione quando si parla di estrazione con i fluidi supercritici. Il parametro della solubilità è fondamentale in quanto incide sulla forza di eluizione e quindi sull'efficacia dell'estrazione e la qualità del prodotto finale. La forza di eluizione dipende dalla densità che a sua volta dipende dalla temperatura e dalla pressione. La densità è la proprietà fisica più importante ed è stato dimostrato che vicino al P_c, l'aumento della densità è proporzionale all'aumento della pressione. Inoltre, sempre vicino al P_c, piccole variazioni della temperatura e della pressione,

causano grandi variazioni della densità. Diversi studi hanno dimostrato che maggiore è la densità, maggiore è la solubilità, in quanto a densità più elevate si instaurano più interazioni molecolari (O. Wrona *et al.*, 2017). La densità della sc-CO₂ è molto simile a quella dei liquidi, tra 0,2 e 1,5 g/cm³, e diminuisce all'aumentare della temperatura, questo vuol dire che la capacità solvente migliora a temperature più basse ed è interessante per i composti termolabili (figura 9).

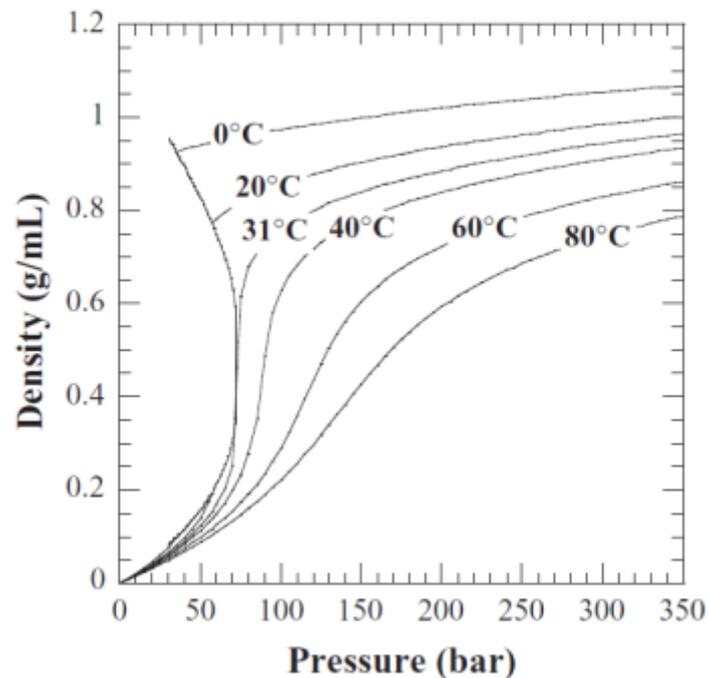


Figura 9. Grafico densità-pressione sc-CO₂ a diverse temperature. Fonte: Perry R.H. and Green D.W., *Supercritical Fluid Separation Processes* (2008)

Un'altra caratteristica fondamentale dei fluidi supercritici è la loro grande selettività; questa è associata alla solubilità e maggiore è la solubilità, minore è la selettività. Inoltre, è fondamentale tenere in considerazione la natura del solvente, maggiore è la capacità solvente nella fase liquida, più sostanze saranno disciolte quando questo si troverà in fase supercritica.

Per una corretta estrazione con SFE, è necessario conoscere le proprietà di trasporto del solvente quali viscosità, diffusività e conducibilità termica che influenzano il trasporto di massa e la concentrazione (O. Wrona *et al.*, 2017). La viscosità (resistenza di un fluido allo scorrimento) del fluido supercritico a temperatura tenuta costante, aumenta all'aumentare della pressione, mentre a pressione costante diminuisce all'aumentare della temperatura fino ad un certo valore per poi aumentare di nuovo. La diffusività (capacità di diffondersi) per quanto riguarda la sc-CO₂ aumenta all'aumentare della temperatura, mentre diminuisce all'aumentare della pressione. La conducibilità termica (capacità di un materiale di trasmettere energia sotto forma di calore) è influenzata dalla

temperatura, pressione e densità del solvente, diminuisce con l'aumento della temperatura e poi raggiunto un valore minimo aumenta all'aumentare della temperatura. Anche il tempo di estrazione è un fattore determinante, diminuisce all'aumentare della pressione e dovrebbe essere mantenuto il più breve possibile. Infine, anche la grandezza del materiale posto ad estrazione è fondamentale per la cinetica estrattiva, più piccole sono le dimensioni delle particelle del campione migliore è la resa e il tasso di estrazione.

Ritornando alla CO₂, la molecola non presenta dipoli, è considerata un solvente non polare, può essere applicata a matrici solide, liquide o viscosi e si possono ottenere degli estratti maggiormente purificati. Le ricerche hanno dimostrato che idrocarburi e molecole organiche poco polari con peso molecolare inferiore a 250 sono molto solubili in sc-CO₂, come lattoni, esteri, aldeidi, chetoni, e si possono usare pressioni relativamente basse; i composti mediamente polari con peso molecolare tra 250 e 400, come sesquiterpeni, sono moderatamente solubili ma necessitano di alte pressioni; sostanze polari con alto peso molecolare, come zuccheri e proteine, sono poco solubili in sc-CO₂ (O. Wrona *et al.*, 2017). Per ovviare a questo problema e poter estrarre composti polari, si può utilizzare un co-solvente in aggiunta che grazie alla sc-CO₂ viene trasportato nel campione vegetale per estrarre i composti idrofili. I co-solventi maggiormente studiati ed utilizzati sono l'acqua e gli alcoli, come metanolo ed etanolo (T. Arumugham *et al.*, 2021). Queste sostanze vanno a legarsi facilmente alla CO₂ e vengono trasportati all'interno della matrice vegetale per favorire rese estrattive più rapide ed efficienti (Y. Cui *et al.*, Y. W. Ang, 2002).

Le prime applicazioni della SFE con sc-CO₂ riguardano il settore alimentare ed era utilizzata per la decaffeinizzazione del caffè e del tè. L'utilizzo per la separazione di prodotti naturali ha inizio negli anni '80 ed ora la tecnica è molto migliorata; si è passati a 279 studi nel 2015 a 431 nel 2020 con un totale di più di 2000 pubblicazioni (T. Arumugham *et al.*, 2021) Oggi trova applicazione anche per altri campi come la produzione di nutraceutici, farmaci, rimozione della nicotina e purificazioni di sostanze di sintesi.

Con l'estrazione SFE con sc-CO₂ si possono ottenere estratti vegetali come oli essenziali, grassi ottenuti dai semi e sostanze nutraceutiche con attività antiossidanti come carotenoidi. È stata applicata principalmente a semi, foglie, frutti, radici, fiori, rizomi e corteccia. I composti che sono stati maggiormente ritrovati negli estratti sono: trigliceridi, acidi grassi, terpenoidi, fitosteroli, tocoferoli, tocotrienoli, flavonoidi, saponine e composti fenolici (M. M. R. De Melo *et al.*, 2014).

Trova applicazione anche per la rimozione di contaminanti ambientali come idrocarburi polinucleati aromatici, organoclorurati, pesticidi e metalli tossici.

Inoltre, grazie alle sue attività antimicrobiche e antivirali, la sc-CO₂ viene impiegata per la pulizia e disinfezioni di tessuti; uno studio ha rilevato un'efficacia del 97-99%

nell'efficienza della pulizia di un campione di seta contaminato da olio e fungo *Aspergillus flavus* della tecnica SFE con sc-CO₂ e una sospensione acquosa come co-solvente a 150 bar, 40 °C con 5% p/p di Ca(OH)₂ (T. Arumgham *et al.*, 2021).

Gli estratti che si ottengono dalla SFE sono microbiologicamente stabili (non è necessaria l'aggiunta di conservanti), di altissima purezza (non sono necessarie ulteriori lavorazioni per eliminare il solvente) e selettivi (contengono solo le molecole d'interesse che possono essere utilizzate immediatamente).

Tuttavia, l'estrazione SFE con sc-CO₂ presenta degli svantaggi:

- costo elevato della strumentazione
- necessità di apparecchiature che sopportino pressioni elevate (rischiose e costose)
- costo elevato per aumentare la pressione oltre il P_c, esigenza di pompe molto potenti e tarate a pressioni elevate
- data $PV=nRT$, se si aumenta la pressione a parità di volume (e di n) aumenta la temperatura e quindi bisogna raffreddare con costi energetici molto elevati

7 RISULTATI DELL'ESTRAZIONE

In questa revisione sono stati presi in considerazione degli articoli scientifici per un periodo incluso dal 2002 fino al 2022 riguardo l'estrazione con SFE con sc-CO₂ per determinare quali siano i valori per una resa estrattiva migliore e cosa si ritrova nell'estratto. I parametri che sono stati studiati ed analizzati per l'estrazione supercritica di *H. perforatum* sono densità, pressione, temperatura, tempo di estrazione e flusso del solvente. La variazione di questi valori modifica la composizione dell'estratto, quindi è opportuno ottimizzare l'estrazione in base alla pianta presa in esame e ai target molecolari che si vogliono estrarre (K. Schoss *et al.*, 2022).

7.1 Parametri estrattivi

7.1.1 Effetto della densità

La potenza con cui avviene l'estrazione dipende, in modo particolare, dalla densità del fluido in condizioni supercritiche, per cui è uno dei fattori incisivi. La temperatura e la pressione (di discutono in seguito) sono i parametri che definiscono la densità del fluido supercritico, ma agiscono in maniera diversa: aumenta all'aumentare della pressione e diminuisce all'incremento della temperatura (Y. Cui *et C. Y. W. Ang*, 2002).

Considerando il contenuto totale di materiale estratto (mg/g di materiale vegetale) di *H. perforatum* con fluido supercritico dalla figura 10 si può desumere che all'aumentare della densità corrisponde un aumento della resa estrattiva, mentre all'abbassarsi della densità la resa diminuisce (S. Glisic *et al.*, 2008).

Tenendo in considerazione nello specifico i due flavonoidi, iperforina e adiperforina, uno studio condotto nel 2008 ha dimostrato che ad una densità della sc-CO₂ di 384 kg/m³ diminuiva la resa; l'estrazione ottimale dei due metaboliti veniva raggiunta a densità superiori a 620 kg/m³ con una resa estrattiva del 50% circa mantenendo la densità della sc-CO₂ tra i valori di 600 e 700 kg/m³ (S. Glisic *et al.*, 2008).

Tuttavia, una densità maggiore non solo aumenta la resa estrattiva come già visto, ma influisce sulla selettività diminuendola notevolmente questo implica che aumentando la densità si ritrovano negli estratti maggiori quantità di molecole, anche componenti indesiderati e un contenuto di iperforina inferiore. (H. Römpf *et al.*, 2004).

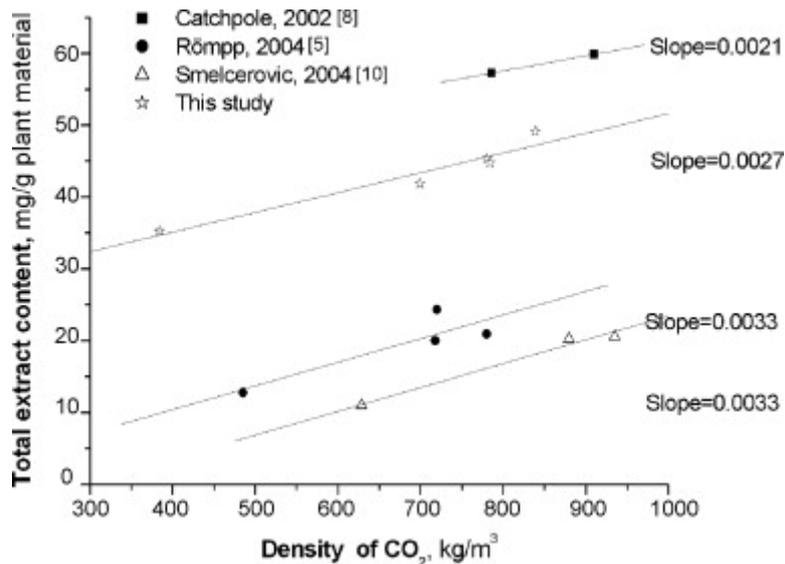


Figura 10. Resa estrattiva totale e densità sc-CO₂. Fonte: S. Glisic, A. Smelcerovic, S. Zuehlke, M. Spiteller and D. Skala, *Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (Hypericum perforatum L.) by supercritical carbon dioxide* (2008)

7.1.2 Effetto della pressione e della temperatura

Lavorando sulla pressione e temperatura della sc-CO₂ vengono definite delle condizioni che portano all'estrazione di composti diversi (figura 11). Dall'immagine si può notare che nella zona supercritica a combinazioni di pressioni e temperature non eccessivamente elevate rispetto ai P_c e T_c della CO₂ vengono estratti composti come lipidi, steroli, composti fenolici e terpenoidi. Per l'estrapolazione di molecole come diterpeni c'è la necessità di iniziare ad aumentare la pressione, fino ad arrivare ad un aumento anche della temperatura per sostanze più complesse.

L'aumento della pressione porta ad un aumento della densità e quindi ad una maggiore capacità solvente con conseguente co-estrazione di sostanze lipofile come grassi e cere (H. Römpp *et al.*, 2004). H. Römpp in uno studio del 2004 ha confrontato la resa totale e la quantità di iperforina estratta utilizzando tre pressioni diverse nell'esperimento, 90, 120 e 150 bar a temperatura costante. L'effetto che è stato notato era l'aumento della resa estrattiva totale all'aumentare della pressione, ma diminuiva il contenuto di iperforina; a 90 bar la resa di quest'ultima era del 35% mentre a 120 bar diminuiva al 25%. Un altro studio sempre del 2004 ha riportato che un aumento della pressione da 250 a 350 bar a 40 °C raddoppiava la quantità di estratto, ma diminuiva il contenuto di olio essenziale (A. Smelcerovic *et al.*, 2004). Anche la componente lipidica varia la sua composizione; tendenzialmente vengono estratti diterpeni e sesquiterpeni e con l'aumento dei parametri si ritrovano anche composti cerosi (L. C'izmek *et al.*, 2021).

Analizzando l'estratto con gas cromatografia-spettrometria di massa (GS-MS) i picchi relativi ai monoterpeni aumentavano all'aumentare della pressione, mentre i sesquiterpeni diminuivano (K. Schoss *et al.*, 2022).

Come accade per la densità e la pressione, anche per la temperatura si ha un aumento della resa estrattiva con l'incremento dei gradi utilizzati nel processo. È noto che la Tc della CO₂ è di 31 °C e per la tecnica SFE questa viene utilizzata una temperatura superiore per portare il solvente e mantenerlo allo stato critico.

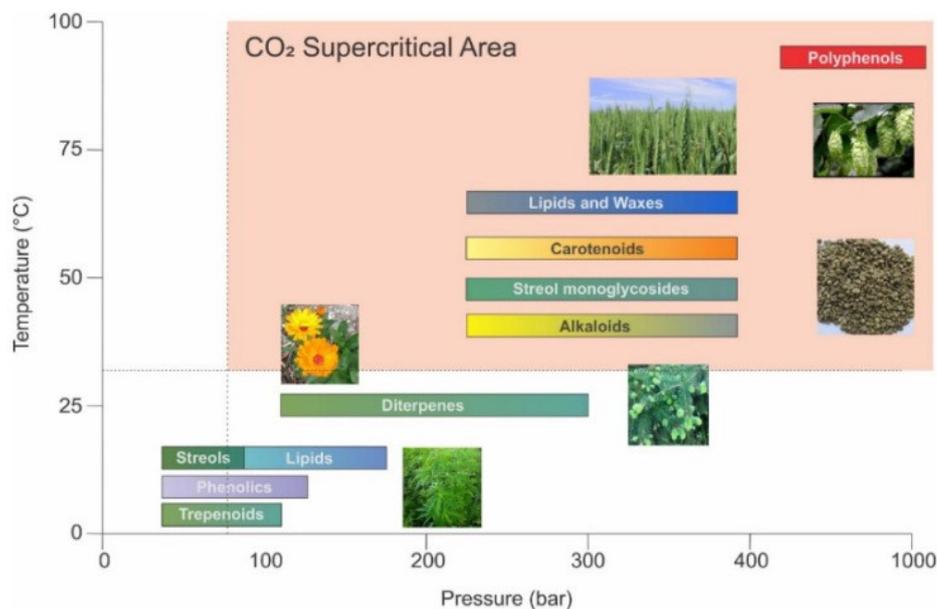


Figura 11. Parametri temperature-pressioni e composti bioattivi estratti. Fonte: L. Cížmek *et al.*, *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Four Medicinal Mediterranean Plants: Investigation of Chemical Composition and Antioxidant Activity* (2021)

Per valutare l'influenza della temperatura senza l'interferenza della densità, H. Römpf (2004) ha confrontato l'estrazione a 40 °C con 50 °C innalzando anche la pressione così da ottenere la stessa densità di 716 kg/m³. Nei risultati riportati dello studio si nota che a 50 °C si ha un aumento della resa di estrazione ma una diminuzione della quantità di iperforina, che passa dal 25% a 40 °C al 22% a 50 °C. L'iperforina è un composto instabile al calore e può essere facilmente degradata portando alla formazione di prodotti di ossidazione. Non è conveniente utilizzare temperature troppo elevate in quanto si otterrebbero nell'estratto più prodotti di ossidazione, come l'ortoforina, rispetto all'iperforina, che è il composto desiderato. Per ottenere una estrazione più selettiva del floroglucinololo principale è opportuno non operare al di sopra dei 50 °C (H. Römpf *et al.*, 2004).

Per massimizzare l'estrazione, si possono definire dei valori di temperatura e di pressione ottimali per l'estrazione SFE con sc-CO₂ dell'*H. perforatum*, secondo uno studio condotto utilizzando un algoritmo genetico i valori sono 200 bar e 39,5 °C (T. Hatamia *et al.*, 2012).

7.1.3 Effetto del tempo di estrazione e del flusso del solvente

Per migliorare l'efficienza estrattiva è importante massimizzare il contatto del solvente con la droga utilizzata per l'estrazione SFE (Y. Cui *et al.*, 2002), per questo il tempo di estrazione è un parametro da tenere in considerazione. Se si aumenta l'intervallo da 1 a 3 ore, la resa estrattiva totale aumenta circa dal 1,6% al 1,9% poiché il fluido supercritico possiede un tempo più prolungato per solubilizzare i fitocostituenti all'interno della droga. Tuttavia, l'aumento del tempo di estrazione non è accompagnato dall'incremento del contenuto di iperforina nell'estratto, anzi questo diminuisce dal 35% al 25% (H. Römpf *et al.*, 2004). Risulta più conveniente operare per un tempo ridotto, ad esempio 1 ora, per avere un'estrazione più selettiva e ricca di iperforina anche se ridotta quantitativamente. Inoltre, operando sempre alle stesse condizioni estrattive (120 bar e 40 °C) ma analizzando gli estratti dopo 1, 3 e 5 ore l'iperforina veniva degradata aumentando il contenuto in ortoforina (H. Römpf *et al.*, 2004). Operando a circa 40 °C e a 100 bar e procedendo a delle estrazioni da 0 a 3 ore si può notare che l'estratto totale aumenta e conseguentemente il contenuto di iperforina e adiperforina diminuiscono (S. Glisic *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il flusso della sc-CO₂, in un esperimento ne sono stati valutati 3 di diversa portata, 4, 8 e 12 kg*h⁻¹, per valutare l'influenza nel risultato dell'estrazione; la variazione del flusso del solvente non ha portato a nessuna modifica significativa né per la quantità di estratto totale né per il contenuto di iperforina (H. Römpf *et al.*, 2004). Si può quindi affermare che la variazione del flusso del solvente non ha implicazioni nel processo estrattivo (E. Reverchon, I. De Marco, 2006).

Tuttavia, per un risparmio economico nell'utilizzo della CO₂ e per una riduzione del tempo di estrazione, alcuni ricercatori suggeriscono un'ottimizzazione del processo: durante la prima ora si mantiene la droga pressurizzata all'interno dell'estrattore senza il flusso del solvente, completato questo tempo si può procedere con il flusso di sc-CO₂ per un'altra ora, così da far fluire il solvente all'interno del materiale vegetale; così facendo l'estrazione risulta più rapida (S. Glisic *et al.*, 2008).

7.1.4 Effetto dell'utilizzo di un co-solvente

Per ottenere un arricchimento anche di composti idrofili come i flavonoidi e per favorire una migliore penetrazione in certe matrici vegetali, si può ricorrere all'estrazione con l'aggiunta di un modificatore, un co-solvente, associato alla sc-CO₂; i più utilizzati sono l'etanolo e il metanolo.

Applicando come parametri estrattivi 300 bar e 40 °C ed effettuando due estrazioni con e senza co-solvente (etanolo al 10% in massa), i risultati delle analisi hanno riportato che la resa estrattiva totale aumentava, si passava da un estratto totale del 6,69% al 10,72%, mentre il contenuto di iperforina e adiperforina diminuiva, inoltre l'ipericina e i flavonoidi non erano stati estratti in modo efficiente con l'aggiunta di etanolo (O.J. Catchpole *et al.*, 2002).

Anche il metanolo è stato utilizzato come co-solvente; uno studio ha utilizzato una quantità pari a 100 µL a 50 °C e 379 bar da utilizzare per 1,0 grammi di droga composta da un misto di foglie e fiori. Sono stati estratti 5.79±0.42 mg di iperforina e 0.90±0.09 mg di adiperforina; questi valori non si discostavano molto da quelli ottenuti senza co-solvente, ma con la presenza di sostanze polari (Y. Cui *et C.* Y. W. Ang, 2002).

Si può, quindi, affermare che l'aggiunta di un modificatore come etanolo e metanolo non vada ad influire sulla resa estrattiva di iperforina e adiperforina e non incida significativamente neppure per l'estrazione di ipericina, ma se si vogliono estrarre altri flavonoidi come la rutina e la quercetina è necessaria l'aggiunta di un co-solvente polare al 10-15% (V. V. Milevskaya *et al.*, 2019).

7.2 Composizione fitochimica dell'estratto supercritico

La tecnica SFE con sc-CO₂ è stata applicata e studiata per estrarre la componente fenolica e lipidica dall'*H. perforatum*. Tecniche di rilevamento dei composti come gascromatografia-spettrometria di massa ad alta risoluzione (GC-HRMS) e cromatografia liquida-spettrometria di massa ad alta risoluzione (LC-HRMS) hanno identificato per la pianta presa in esame i seguenti composti: flavonoidi, terpeni, terpenoidi, acidi grassi e polifenoli (L. Ċizmek *et al.*, 2021)

Le estrazioni in condizione supercritiche della droga con i parametri sopra descritti hanno identificato due fasi: una prima fase più densa e di colore bruno (ricca di iperforina e adiperforina) e una seconda fase bianca e cerosa (ricca di olio essenziale) (O. J. Catchpole *et al.*, 2002) (C. Seger *et al.*, 2004).

7.2.1 Profilo fenolico e derivati naftodiantronici

Sebbene l'estrazione supercritica con CO₂ risulti essere una tecnica che fornisce un'estrazione piuttosto bassa della componente fenolica, soprattutto per le molecole più polari, è selettiva per i floroglucinoli, mentre le sostanze più idrofile rimangono nella droga. Il suo confronto con altre metodiche (figura 12) fa emergere la sua natura vantaggiosa in particolare per il recupero dell'iperforina e i suoi derivati (L. C'izmek *et al.*, 2021). Con questa tecnica estrattiva, infatti, si ottiene il contenuto maggiore tracciabile nell'estratto arrivando a 23,97 g/kg di sostanza secca, mentre i valori più bassi li si ottengono con n-esano in quanto l'iperforina viene degradata (D. Cossuta *et al.*, 2012). Il recupero di iperforina risulta essere il più vantaggioso e il maggior contenuto (35%) lo si ottiene applicando 90 bar di pressione e 40 °C di temperatura per un'ora (H. Römpp *et al.*, 2004).

Svolgendo un'estrazione a 90-120 bar a 40 °C per un'ora e analizzando il prodotto ottenuto con cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore a serie di fotodiodi (HPLC-DAD), sono stati rilevati floroglucinoli in entrambe le fasi. Il contenuto di iperforina e adiperforina nella prima fase risulta essere più alto (36±1,3%), mentre la seconda risulta essere meno ricca (18,4±4,2%), ma non assente (C. Segre *et al.*, 2004). Anche utilizzando pressioni e temperature più elevate (200-450 bar e di 50 °C) e analizzando gli estratti con cromatografia liquida con spettrometro di massa (LC-MS/MS), l'iperforina e l'adiperforina sono sempre state rilevate.

L'estrazione porta con sé anche altri metaboliti, oltre ai principali floroglucinoli, attribuibili ai prodotti di ossidazione dell'iperforina (C. Segre *et al.*, 2004).

Da una recente analisi di questi composti nell'estratto sono stati ritrovati furoiperforina, 8-idrossiperforina 8,1-emiacetale e oxepaiperforina (L. C'izmek *et al.*, 2021). I prodotti di ossidazioni riportati in letteratura sono molti di più rispetto a quelli ritrovati, per questo l'estrazione supercritica con CO₂ dimostra che la tecnica è adeguata all'estrazione selettiva di iperforina senza portare ad una eccessiva degradazione della stessa. È stato ipotizzato che i composti lipofili che vengono co-estratti proteggano l'iperforina dalla luce e dall'ossidazione (C. Segre *et al.*, 2004). Recentemente è stato anche calcolato il contenuto di polifenoli totali come milligrammi equivalenti dell'acido gallico sui grammi dell'estratto totale con estrazione sc-CO₂ e valutati per via spettrofotometrica; l'*H. perforatum* presenta un contenuto di 2.70±0.02 mg/g ottenuto a 40 °C e 230 bar e la presenza anche di tre isomeri del siringaresinolo, un lignano. (L. C'izmek *et al.*, 2021).

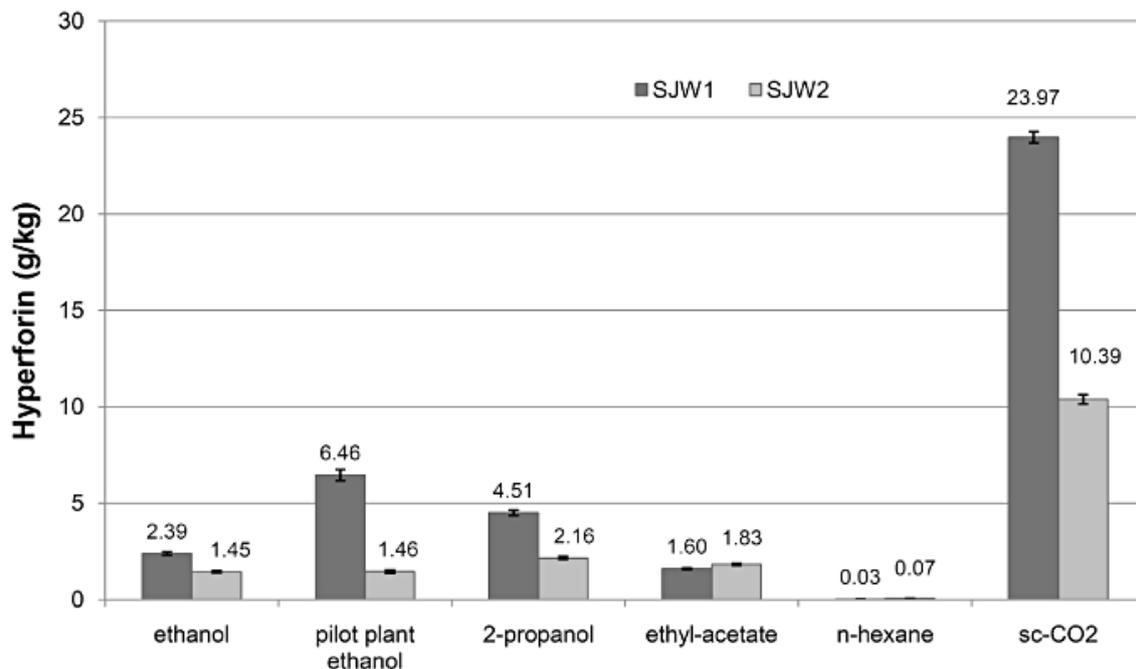


Figura 12. Recupero di iperforina con diversi metodi estrattivi. Fonte: D. Cossuta et al., *Extraction of hyperforin and hypericin from St. john's wort (Hypericum perforatum L.) with different solvents (2012)*

Eseguendo un'analisi degli estratti per rilevare la presenza di altri metaboliti secondari, come naftodiantroni o molecole cromofore, è stata rivelata l'assenza di altri composti flavonoidici (C. Segre *et al.*, 2004). L'ipericina e altri flavonoidi come rutina, quercitina e quercitina risultano essere assenti, quindi la loro estrazione non avviene (S. Glisic *et al.*, 2008), se non con l'aggiunta di un co-solvente polare. In particolare, l'ipericina non viene rilevata attraverso l'analisi HPLC di un estratto con sc-CO₂ e come previsto dalla natura chimica della molecola il recupero maggiore si ottiene con un solvente polare, come per esempio l'etanolo (figura 13).

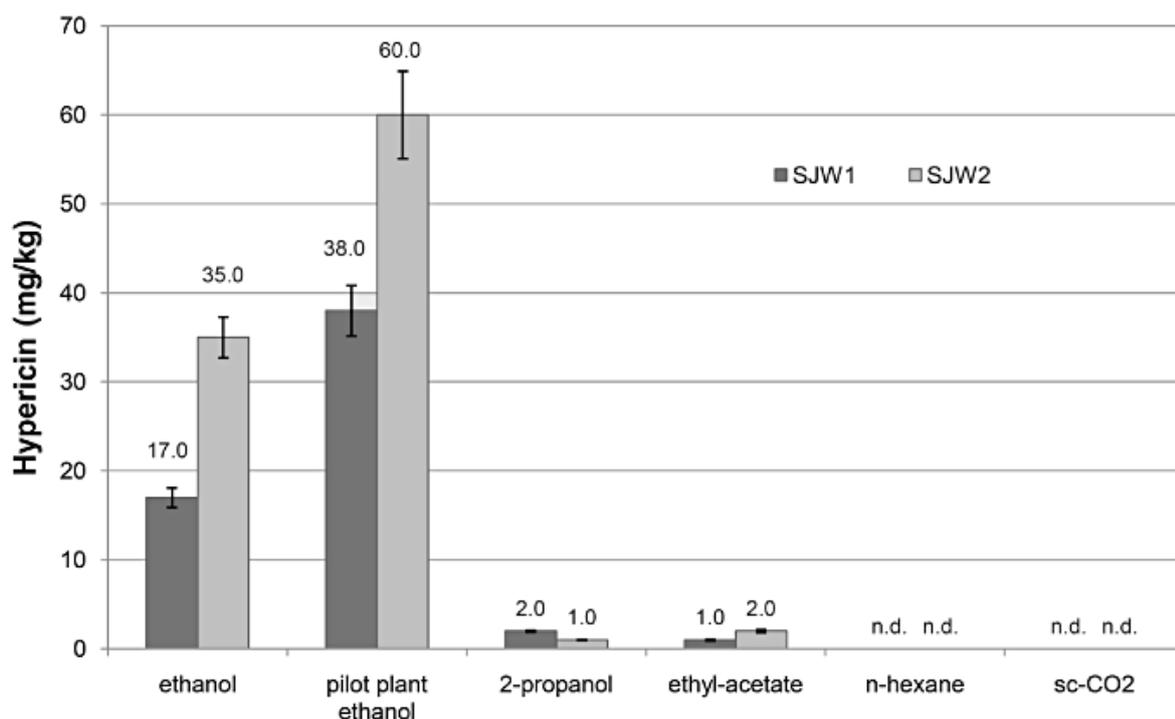


Figura 13. Recupero di ipericina con diversi metodi estrattivi. Fonte: D. Cossuta et al., *Extraction of hyperforin and hypericin from St. john's wort (Hypericum perforatum L.) with different solvents* (2012)

7.2.2 Profilo lipidico e ceroso

La fase cerosa è stata principalmente analizzata tramite GC-MS per determinare le altre sostanze lipofile e volatili presenti che possono essere attribuite a grassi e cere. Il risultato dell'analisi del prodotto ottenuto a 100 bar e 40 °C ha portato inizialmente all'identificazione di quarantadue esteri della cera, nove alcani, quattro alcanoli primari e uno secondario, un'aldeide, acidi alcanici, acidi grassi insaturi (acido linoleico, acido oleico, metillinoleato), gliceril-1-palmitato, alcol sesquiterpenico (nerolidolo), due diterpeni (neofitadiene e fitolo), sei triterpeni, (tra cui squalene, sitosterolo, stigmasterolo e nervisterolo) e due triterpeni pentaciclici (lupeolo e amirina) (C. Segre et al., 2004). La maggior parte del composto era formato da nonacosano, un idrocarburo lineare presente appartenente alla famiglia degli alcani che compone la cera cuticolare; questo indica che il solvente solubilizza in modo idoneo le porzioni esterne della cellula. La presenza, però, di acidi grassi insaturi e di componenti terpenoidi indicano che la sc-CO₂ riesce a penetrare anche in profondità e a solubilizzare sostanze lipofile interne alla cellula (C. Segre et al., 2004).

Questi dati risultano conformi con gli studi svolti successivamente; i composti principali rilevati tramite GC-MS (tabella 3) negli estratti in condizioni supercritiche (100 bar e 40 °C) e presenti maggiormente quantitativamente sono: il fitolo, l'acido 1,2-benzenedicarbossilico e n-tetratetracontano (A. Smelcerovic *et al.*, 2004). Anche utilizzando temperature e pressioni più elevate (45 °C, 150-230 bar), il fitolo, il cariofillene, il cariofillene ossido, l'eneicosano e il nonacosano erano presenti (G. Avsar *et al.*, 2018); altre sostanze che sono state riscontrate ulteriormente negli estratti sono α -pinene, β -farnesene e trans tetradec-2-enale (K. Schoss *et al.*, 2022).

| Componenti | Contenuto (%) |
|---------------------------------|----------------------|
| Mentone | 0.45 |
| (+) Isomentone | 0.23 |
| L-mentolo | 2.45 |
| Verbenone | 0.18 |
| 1S- neomentil acetato | 0.38 |
| Ciclotano | 0.77 |
| Alpha-amorfene | 0.25 |
| Germacrene D | 0.17 |
| Diidroattinidiolide | 0.44 |
| (-) Spathulenolo | 0.95 |
| Cariofillene ossido | 1.40 |
| Ciclotetradecano | 1.84 |
| 3-Tetradecano | 3.81 |
| 2-Pentadecanone | 1.31 |
| 7-Esadecene | 2.89 |
| n-Esadecano | 0.21 |
| Acido 1,2-benzenedicarbossilico | 13.44 |
| n-Ottadecano | 0.16 |
| n-Nonadecano | 1.20 |
| Fitolo | 7.13 |
| n-Tricosano | 1.29 |
| n-Ottacosano | 1.48 |
| n-Dotriacontano | 1.38 |
| n-Tetratriacontano | 25.95 |
| Esacosanale | 4.21 |
| n-Tetratetracontano | 0.30 |

Tabella 3. Composizione dell'estratto ottenuto tramite sc-CO₂. Fonte: A. Smelcerovic *et al.*, *Sub-and Supercritical CO₂-Extraction of Hypericum perforatum L.* (2004)

La composizione risulta essere diversa rispetto gli oli essenziali ottenuti mediante le tecniche classiche che contengono un ventaglio di sostanze più ampie come il limonene, l' α -cedrene, α -selinene, ciclosativene e α -ylangene (K. Schoss *et al.*, 2022), ma si avvicina a quella ottenuta con CO₂ liquida dove i metaboliti secondari principali sono: n-tricosano, n-eneicosano, n-tetracosano ed n-nonacosano; questa metodica risulta avere un'efficienza minore nell'estrazione, ma una quantità di olio essenziale estratto più alta (E. Yilmazoğlu *et al.*, 2022).

8 USI DELL'ESTRATTO SUPERCRITICO DI IPERICO

Gli estratti supercritici ottenuti da matrici vegetali contengono metaboliti secondari che appartengono a classi diverse di composti, come fenoli, flavonoidi, terpeni, steroli, sesquiterpeni e alcaloidi; l'estrazione è altamente selettiva nei confronti di determinate molecole estraibili da una singola pianta e dimostrano un'ampia gamma di proprietà come antiossidanti, antibatteriche, antifungine, antimalariche, antinfiammatorie e antineoplastiche (T. Arumugham *et al.*, 2021).

Gli studi hanno dimostrato che la SFE con sc-CO₂ applicata all'*H. perforatum* ha permesso l'estrazione di metaboliti secondari dotati di attività terapeutiche, come la componente fenolica e quella lipofila, questo permette di sfruttare le molecole per la creazione di farmaci, integratori e cosmetici.

L'estratto contiene per la maggior parte della sua composizione l'iperforina, la quale ha mostrato attività antidepressiva. La pianta si presenta come l'alternativo fitoterapico dell'antidepressivo sintetico e siccome manifesta bassi effetti collaterali e bassa tossicità risulta essere ben tollerato in terapia. L'ottenimento di estratti puliti e senza prodotti di degradazione dell'iperforina permette un minor dispendio economico per la produzione di fitofarmaci e somministrabili così come vengono preparati, inoltre estratti supercritici risultano contenere iperforina stabile (D. Cossuta *et al.*, 2012). L'effetto antidepressivo non viene esplicito solamente dall'iperforina, ma anche dall'ipericina e dai flavonoidi. Risulta necessario ottenere un prodotto unendo estratti ottenuti anche con metodiche differenti a causa della diversa natura chimica dei composti per espletare il massimo della sua attività terapeutica (D. Cossuta *et al.*, 2012). Gli estratti presentano un'attività clinica dimostrata per contenuti dello 0.3% di estratto standardizzato di ipericina e il 2-5% di iperforina (Q. Xiang Nga *et al.*, 2017). Inoltre, i costituenti lipofili, in particolare i sesquiterpeni come il cariofillene e il germacrene D, che si ritrovano nell'estratto della pianta, hanno mostrato attività contribuyente come antitumorali (T. Arumugham *et al.*, 2021). L'attività antineoplastica è stata rilevata utilizzando un estratto supercritico di iperico applicato a cellule di spermatozoi e ad embrioni; l'estratto primario non purificato ha ridotto la mobilità degli spermatozoi dopo 15-20 minuti dall'aggiunta, inoltre ha prodotto un disturbo dello sviluppo dei gameti. L'attività probabilmente non è attribuibile solo all'iperforina, ma anche ad altre sostanze presenti nell'estratto (A. L. Drozdov *et al.*, 2013).

I floroglucinolati prenilati hanno dimostrato anche un'attività antiossidante simile ai composti fenolici (L. Cížmek *et al.*, 2021). Anche la componente terpenoide ha evidenziato tale attività, infatti un'estrazione in cui venivano prelevati anche i diterpeni ha avuto una maggiore efficacia come effetto antiossidante.

Le condizioni operative in cui gli estratti hanno manifestato il maggior effetto antiossidante sono 40 °C e 300 bar (T. Arumugham *et al.*, 2021). Per questi risultati il prodotto ottenuto può essere utilizzato per la produzione di integratori alimentari per combattere lo stress ossidativo.

L'estratto supercritico di *H. perforatum* è stato testato anche per l'attività antibatterica, uno studio ha identificato che l'iperforina ottenuta a 40 °C e 200 bar e aggiunta in quantità di 100 µL a delle piastre di agar-agar contenenti diversi ceppi batterici e lasciata incubare per 24 ore a 35 °C ha un effetto tossico rivolto al batterio del pus blu (*Pseudomonas aeruginosa*); probabilmente l'effetto non è attribuibile solo al floroglucino, ma anche ad altri fitocostituenti presenti (A. L. Drozdov *et al.*, 2013). Inoltre, in letteratura si trovano studi che dimostrano l'attività battericida anche per *S. aureus*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. pyogenes* e *H. pylori* e attività antimicotica verso *M. gypseum*, *T. rubrum*, *A. flavus*, *C. lunatus*, *F. vasinfectum*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *F. graminearum* (K. Schoss *et al.*, 2022) che lo rendono valido per l'inserimento dell'estratto in creme cosmetiche per lenire affezioni cutanee. Una ricerca condotta ha indagato questa sua attività per la preparazione di cosmetici senza l'aggiunta di sostanze conservanti. Le formulazioni dove veniva aggiunto l'estratto supercritico di *H. perforatum* al 2%, 3% e 4% presentavano una conservazione del prodotto anche per 6 mesi dall'apertura, ciò è positivo in quanto i prodotti cosmetici devono presentare una conservazione piuttosto lunga perché non sempre vengono consumati rapidamente (G. Avşar *et al.*, 2018) e può essere una valida alternativa ai conservanti sintetici.

9 CONCLUSIONE

L'*H. perforatum* è una pianta molto interessante dal punto di vista fitochimico ed è considerata tra le erbe d'élite per il trattamento fitoterapico della depressione da lieve a moderata, ma viene utilizzata anche per le altre sue attività come antibatterica e antiossidante.

L'interesse sempre maggiore di questa pianta accoppiato all'utilizzo di tecniche estrattive innovative e che rispettano l'ambiente ha fatto sì che l'estrazione supercritica sia stata applicata anche all'*H. perforatum* sapendo la natura non polare dei metaboliti principali e che quindi potevano essere ritrovati nell'estratto.

Questo lavoro ha mostrato che tecnica SFE con sc-CO₂ è ottima e vantaggiosa per l'estrazione di alcuni composti lipofili dalla pianta senza andare a degradarli ed è un metodo molto conveniente per l'arricchimento di iperforina (H. Römpf *et al.*, 2004), molecola che sta suscitando sempre più interesse farmacologico. I vari ricercatori hanno studiato i range dei parametri estrattivi e analizzato l'estratto definendo la taratura migliore del sistema per ottenere la massima resa accompagnata da un buon profilo fitochimico del prodotto.

Il prodotto che si ottiene è altamente selettivo, purificato e stabile e alcuni studi lo hanno testato per vagliare le possibili attività terapeutiche. L'utilizzo di questi estratti supercritici ha fornito la prova delle loro attività antiossidanti, antibatteriche e antimicotiche, attraverso una serie di ricerche scientifiche, che li rendono validi per la preparazione di integratori e preparazioni cosmetiche da applicare a livello topico per affezioni cutanee.

Nonostante l'aumento del numero delle ricerche degli estratti ottenuti con fluidi supercritici, in commercio ancora non sono disponibili molti prodotti di *H. perforatum* ottenuti con questa metodica, soprattutto per quanto riguarda il settore degli integratori alimentari, dati i limiti posti dal Ministero Della Salute. L'argomento sarà oggetto ancora di ricerche e di studi futuri per implementare la conoscenza degli effetti terapeutici e per introdurre nuovi prodotti sul mercato ottenuti dall'iperico utilizzando la tecnologia supercritica.

BIBLIOGRAFIA

- Arumugham, Rambabu K, Hasan, Show, Rinklebe, Banat. *Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications - A review*. Chemosphere 271: (2021); 1-19
- Avşar, Yüksel, Emen, Demirdöğen, Yeşilkaynak, Kahriman. *Supercritical Carbondioxide Extraction of Lavandula Officinalis (Lavender) and Hypericum Perforatum (Centaury) Plants Grown in Mersin Region: Investigation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts and Usage as Cosmetic Preservatives in Creams*, Jotcsa. 5(3): (2018); 1215-1220
- Barnes, Anderson, Phillipson. *St John's wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties*. JPP: (2001); 53: 583-600
- Catchpole, Perry, da Silva, Grey, Smallfield. *Supercritical extraction of herbs I: Saw Palmetto, St John's Wort, Kava Root, and Echinacea*, Journal of Supercritical Fluids, 22: (2002); 129–138
- Celli. *Erbario*, Firenze, Giunti Editore S.p.A.: (2017); 73
- Chrubasik-Hausmanna, Vlachojoannisa and J. McLachlan. *Understanding drug interactions with St John's wort (Hypericum perforatum L.): impact of hyperforin content*, Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 71: (2019); 129–138
- Ċizmek, Kralj, Ċož-Rakovac, Mazur, Ul'yanovskii, Likon and Trebše. *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Four Medicinal Mediterranean Plants: Investigation of Chemical Composition and Antioxidant Activity*, Molecules, 26, 5697: (2021); 1-18
- Cossuta, Vatai, Báthori, Hohmann, Keve and Simánd. *Extraction of hyperforin and hypericin from St. john's wort (hypericum perforatum l.) with different solvents*, Journal of Food Process Engineering, 35: (2012); 222–235
- Cui and Ang. *Supercritical Fluid Extraction and High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Phloroglucinols in St. John's Wort (Hypericum perforatum L.)*, J. Agric. Food Chem., 50: (2002); 2755-2759
- De Andrade, Menegassi de Souza, Cerchiaro, Aparecida da Silva Pinhal, Orzari Ribeiro, Girao. *Hypericin in photobiological assays: An overview. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 35, 102343: (2021); 1-6

- De Melo, Silvestre, Silva. *Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology*, Journal of Supercritical Fluids, 92: (2014); 115–176
- De Zordi, Cortesi, Kikic, Moneghini, Solinas. *Pharmaceutical and Nutraceutical Applications of Supercritical Carbon Dioxide in Handbook on Supercritical Fluids*, Nova Science Publishers Inc.: (2014); Chap. 4, 83
- Drozdov, Beleneva, Lepeshkin, Krutikova, Ustinovich, Pokrovskii, and Parenago. *The Effect of St. John's Wort Supercritical Extract and Hyperforin Solution on Biological Subjects*, Russian journal of physical chemistry b, Vol. 7, No. 7: (2013); 854-862
- Gaid, Biedermann, Füller, Haas, Behrends, Krull, Scholl, Wittstock, Müller-Goymann, Beerhues. *Biotechnological production of hyperforin for pharmaceutical formulation*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 126: (2018); 10–26
- Galeotti. *Hypericum perforatum (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions*, Journal of Ethnopharmacology, 200: (2017); 136-146
- Glisic, Smelcerovic, Zuehlke, Spiteller, Skala. *Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (Hypericum perforatum L.) by supercritical carbon dioxide*, J. of Supercritical Fluids, 45: (2008); 332–337
- Hatamia, Glisic, Orlovicb. *Modelling and optimization of supercritical CO2 extraction of St. John's Wort (Hypericum perforatum L.) using genetic algorithm*, J. of Supercritical Fluids, 62: (2012); 102– 108
- Herraiz and Guillén. *Monoamine Oxidase-A Inhibition and Associated Antioxidant Activity in Plant Extracts with Potential Antidepressant Actions*, BioMed Research International Volume: (2018); 10 pages
- Khaw, Parat, Shaw, Falconer. *Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review*, Molecules: (2017); 1-22
- Madabushi, Frank, Drewelow, Derendorf, Butterweck. *Hyperforin in St. John's wort drug interactions*, Eur J Clin Pharmacol, 62:(2006); 225–233
- Milevskaya, Prasad, Temerdashev. *Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the Lamiaceae and Hypericaceae families: A review*, Microchemical Journal, 145: (2019); 1036–1049
- Nahrstedt and Butterweck. *Lessons Learned from Herbal Medicinal Products: The Example of St. John's Wort*, J. Nat. Prod. 73: (2010); 1015–1021

- Napoli, Siracusa, Ruberto, Carrubba, Lazzara, Special, Cimino, Saija, Cristani. *Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven Hypericum species e A comparative study*, *Phytochemistry*, 152: (2018); 162-173
- OMS. *monografie di piante medicinali volume 2*, Edizioni Le Nuove Scritture (2004)
- Perry R.H. and Green D.W. *Supercritical Fluid Separation Processes in Perry's Chemical Engineers Handbook, Alternative Separation Processes*: (2008); Chap. 20: 14
- Reverchon, De Marco. *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter*, *J. of Supercritical Fluids*,38: (2006); 146–166
- Römpp, Seger, Kaiser, Haslinger, Schmidt. *Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (Hypericum perforatum) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21: (2004); 443–451
- Schoss, Glavač, Koce, Anžlovar. *Supercritical CO₂ Plant Extracts Show Antifungal Activities against Crop-Borne Fungi*, *Molecules*: (2022); 1-15
- Seger, Römpp, Sturm, Haslinger, Schmidt, Hadacek. *Characterization of supercritical fluid extracts of St. John's Wort (Hypericum perforatum L.) by HPLC–MS and GC–MS*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21: (2004); 453–463
- Smelcerovic, Lepojevic, Djoredjevic. *Sub-and Supercritical CO₂-Extraction of Hypericum perforatum L.*, *Chem. Eng. Technol.* 27 No. 12: (2004); 1327-132
- Velingkar, Gupta, Hegde. *A current update on phytochemistry, pharmacology and herb–drug interactions of Hypericum perforatum*, *Phytochem Rev*: (2017); 16:725–744.
- Wölfle, Seelinger, Schempp. *Topical Application of St. John's Wort (Hypericum perforatum)*, *Planta Med*: (2014); 80: 109–120
- Wrona, Rafinska, Monzeski, Buszewski. *Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials*, *Journal of AOAC International* VOL. 100: (2017); 1624-1635
- Xiang Nga, Venkatanarayananb, Yih Xian Hoc. *Clinical use of Hypericum perforatum (St John's wort) in depression: A meta-analysis*, *Journal of Affective Disorders*, 210: (2017); 211–221
- Yaseen Mir, Hamid, Kamili, Hassan. *Sneak peek of Hypericum perforatum L.: phytochemistry, phytochemical efficacy and biotechnological interventions*, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 28(4): (2019); 357–373

Yilmazoğlu, Hasdemir, Hasdemir. *Recent Studies on Antioxidant, Antimicrobial and Ethnobotanical Uses of Hypericum perforatum L. (Hypericaceae)*, B. Jotcsa. 9(2): (2022); 373-394

Zhou, Chan, Pan, Huang, Deon Lee. *Pharmacokinetic interactions of drugs with St John's wort*, Journal of Psychopharmacology 18(2): (2004); 262–276

SITOGRAFIA

Avantech (www.avantech.it)

Consiglio Nazionale delle Ricerche (www.cnr.it)

Ministero della Salute (www.salute.gov.it)

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

YouMath (www.youmath.it)