

Attività nutraceutica dell'estratto acquoso di limone (*Citrus lemon* Burm) ottenuto con il Naviglio estrattore®

Lydia Ferrara¹, Daniele Naviglio²

¹Dipartimento di Farmacia-Facoltà di Farmacia - Università di Napoli "Federico II" - E-mail: lyferrar@unina.it

²Dipartimento di Scienze Chimiche- Università di Napoli "Federico II" - Via Cintia, 4 - 80126 Napoli
E-mail: daniele.naviglio@unina.it

Riassunto. L'estratto di limone ottenuto con metodo di estrazione innovativo, il Naviglio estrattore®, si è rivelato dotato di attività nutraceutica per la sua composizione in sostanze antiossidanti e minerali. Utilizzando come liquido estraente esclusivamente acqua distillata è stato possibile estrarre dalla polpa del limone sostanze con azione neuroprotettiva, per la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica senza manifestare effetti collaterali indesiderati. Anche se il meccanismo di azione di tali sostanze non è ancora conosciuto, il loro impiego come integratori, potrebbe essere di grande utilità nella prevenzione delle sindromi neuro-degenerative.

Parole chiavi: Estratto di limone, flavonoidi, attività nutraceutica, Naviglio estrattore®

«NUTRACEUTICAL ACTIVITIES OF AQUEOUS EXTRACT OF LEMON (*CITRUS LEMON* BURM) OBTAINED WITH THE EXTRACTOR NAVIGLIO®»

Summary. The lemon extract made with innovative extraction method, the Naviglio extractor® proved with activities for its nutraceutical composition of antioxidants and minerals. Using only distilled water as a extractive liquid has been possible to extract substances with neuroprotective action, for the ability to cross the blood brain barrier without manifesting undesirable side effects. Although the mechanism of action of these substances is not yet known, their use as supplements, could be of great utility in the prevention of neuro-degenerative syndromes.

Keywords: Lemon extract, flavonoids, nutraceutical properties, extractor Naviglio®

Introduction

Il limone *Citrus lemon* Burm è un albero da frutto appartenente al genere *Citrus* ed alla famiglia delle Rutaceae. La pianta varia le sue dimensioni a seconda del clima in cui vive: da piccolo arbusto di meno di un metro di altezza fino a un grande albero che può raggiungere anche i 6 metri, esso è sempreverde, con un tronco grigiastro e con foglie di consistenza coriacea di color verde intenso che presentano delle zone particolarmente lucide per la presenza di ghiandole ricche di olio profumato. Il frutto del limone è un esperidio

di forma ovale, con scorza più o meno sottile, verde da giovane e di colore giallo citrino a maturità. Originario dell'Asia, il limone si è diffuso nell'area mediterranea ed in modo particolare nell'Italia meridionale ed insulare.

Le prime precise indicazioni sull'impiego del limone a scopo terapeutico risalgono a Teofrasto, l'allievo di Aristotele, considerato il fondatore della fitoterapia, che ne evidenziò le proprietà terapeutiche già nel V secolo a.C. Anche Plinio (I sec. d.C.) parlò del limone nei suoi trattati e lo prescrisse, tra l'altro, come antidoto per diversi veleni. Nel XV secolo si scoprì ca-

sualmente che il succo di limone curava e preveniva lo scorbuto, malattia diffusa tra i naviganti che si cibavano per lunghi periodi solamente con farine e alimenti conservati. Si iniziò così ad utilizzare i limoni in grande quantità a bordo delle navi e tramite i viaggi per mare il frutto fu introdotto nei paesi del Nord Europa. Le navi che tenevano a bordo una certa quantità di limoni non avevano morti per scorbuto, grazie all'elevato contenuto di vitamina C che in quel tempo era considerato il fattore terapeutico presente nel succo di questo frutto. Più tardi, quando fu prodotta vitamina C sintetica fu scoperto che da sola non eliminava tutti i sintomi della malattia, in particolare la fragilità capillare. Szent-Gyorgyi nel 1936 scoprì un altro gruppo di sostanze aventi ruolo curativo e preventivo sullo scorbuto, presenti nel succo di limone: i flavonoidi, molecole appartenenti ad un importante gruppo di pigmenti vegetali responsabili del loro colore giallo arancio. Solamente a partire dal XVIII secolo il limone comincia ad essere usato in cucina per aromatizzare alcuni cibi.

La parte del frutto più comunemente utilizzata è il succo che rappresenta circa il 50% del suo peso; esso contiene 50-80 grammi/litro di acido citrico, responsabile del tipico sapore acre del limone; inoltre, sono presenti diversi altri acidi organici tra cui l'acido ascorbico (0,5 grammi/litro); flavonoidi; minerali quali calcio, ferro, fosforo, potassio e vitamine del gruppo A e B. I flavonoidi presenti nel succo di limone sono caratterizzati dalla presenza di flavanon glucosidi quali esperidina ed eriocitrina e flavon glucosidi come la diosmina, responsabile del gusto amaro. Altri flavonoidi quali quercetina e miricetina sono presenti nel succo in concentrazione molto piccola (1-4). Il succo pastorizzato senza conservanti possiede una shelf-life di almeno un anno e viene usato come ingrediente in vari alimenti e bevande. Inoltre, il succo può essere concentrato per essere impiegato nell'industria conserviera dove viene aggiunto ai succhi oppure alle conserve. Per la presenza di mucillagini, il succo di limone trova oggi molte applicazioni nell'industria cosmetica in quanto può essere impiegato come lenitivo della pelle oltre che nutrirla con gli oligoelementi di cui è ricco. Inoltre, per il suo discreto contenuto di vitamina C, di acido citrico e malico, presenta azione tonificante, riduce la secrezione di sebo mantenendo la giusta acidità della cute e la sua azione sbiancante viene utilizzata nelle paste

dentifrice per ottenere denti bianchi (5).

Infine, è da tenere presente che il limone nella parte del flavedo, è ricco di olio essenziale che è un liquido giallo fortemente odoroso, solubile in alcool e costituito da terpeni il cui maggior rappresentante è il limonene. Viene industrialmente deterpenato sia mediante distillazione sottovuoto che con l'impiego di solventi. per poter essere poi impiegato nell'industria alimentare, in profumeria ed anche nella produzione di detersivi spesso diluito con prodotti meno costosi come l'olio di paraffina.

Parte sperimentale

Preparazione dell'estratto

Per la preparazione dell'estratto della polpa di limone è stato utilizzato il Naviglio Estrattore® serie LAB mod. 500mL (Fig.1) (Atlas Filtri Engineering); acqua demineralizzata e 2 Kg di limoni (12 limoni). I limoni sono stati privati del flavedo e suddivisi in quat-



Figura 1. Naviglio estrattore®

tro gruppi di tre; sono stati poi privati anche dell'albedo e ciascun limone veniva tagliato in otto pezzi. I pezzi derivanti da tre limoni sono stati inseriti in un sacchetto per uso alimentare con maglie grandi che è stato introdotto nella camera di estrazione, dopodiché sono stati aggiunti 500 mL di acqua demineralizzata e, alla fine il coperchio della camera di estrazione è stato ermeticamente chiuso.

Il Naviglio Estrattore® presenta nel corpo centrale di estrazione due camere cilindriche in cui scorrono i relativi pistoni spinti da un sistema pneumatico ad aria compressa. Alla base delle camere sono posti due setti porosi che permettono il passaggio del liquido di estrazione bloccando il passaggio delle particelle solide. Le due camere sono collegate tramite un condotto su cui viene intercettata una elettro-valvola che resta chiusa per tutto il periodo di funzionamento e permette, trascorso il tempo prefissato, di recuperare il solvente di estrazione. L'estrazione avviene in seguito alla generazione di un gradiente di pressione negativo dall'interno verso l'esterno della matrice solida in un periodo di tempo in cui si succedono alternativamente una fase di statica ed una fase di dinamica. Durante la fase di statica il solvente viene a contatto del solido per un certo periodo di tempo e sotto una pressione compresa tra sei ed otto atmosfere; nella fase dinamica il valore della pressione passa velocemente da zero ad otto atmosfere, per cinque volte in due minuti al fine di rimescolare il liquido all'interno del circuito estrattivo ed il solvente esercita il suo potere estraente facendo passare in esso le sostanze estratte. Le due fasi di statica e di dinamica possono essere ripetute ciclicamente fino ad esaurimento della matrice.

Nella nostra esperienza è stato impiegato un tempo di 1 ora; fase di statica: 1 minuto; fase dinamica: 5 colpi di pistone (1 min), tempo di corsa del pistone: 15"; cicli totali: 30. La standardizzazione del tempo di estrazione è un parametro fondamentale per ottenere la riproducibilità nella quantità di droga estratta, come è stato dimostrato in lavori riportati in letteratura (6,7).

L'estratto liquido recuperato alla fine del processo estrattivo è stato pastorizzato per 30 minuti all'ebollizione; dopodiché è stato trasferito in bottiglia di vetro e conservato in frigo a 4°C. In tali condizioni viene garantita la stabilità dei componenti attivi del limone per oltre sei mesi.

L'estratto ottenuto utilizzando il Naviglio Estrattore®, presenta un pH compreso tra 3 e 3,5 ed un contenuto di acido citrico compreso tra 6-7% (p/v) determinato mediante titolazione con NaOH 0,1 N.

Analisi dei flavonoidi

50 mL dell'estratto pastorizzato sono stati trattati con 30 mL di etile acetato e dopo evaporazione del solvente il residuo è stato disciolto in una miscela H₂O/CH₃CN (70:30) e 10 µL sono stati iniettati in un apparecchio HPLC Sunicom Oy corredato di degasser ErC3215 con detector UV/VIS Model 500 per la determinazione delle sostanze flavonoidiche a 350 nm. Per la separazione è stata utilizzata una colonna Luna ODS, di dimensioni 250x4,60 mm con diametro delle particelle 5 µ ed una miscela eluente a gradiente di H₂O/CH₃CN da 70:30 a 10:90 in 30 min. con flusso di 1 mL/min. Nel cromatogramma ottenuto riportato nella Fig 2, sono stati identificati i seguenti flavonoidi: esperidina, eriocitrina e diosmina.

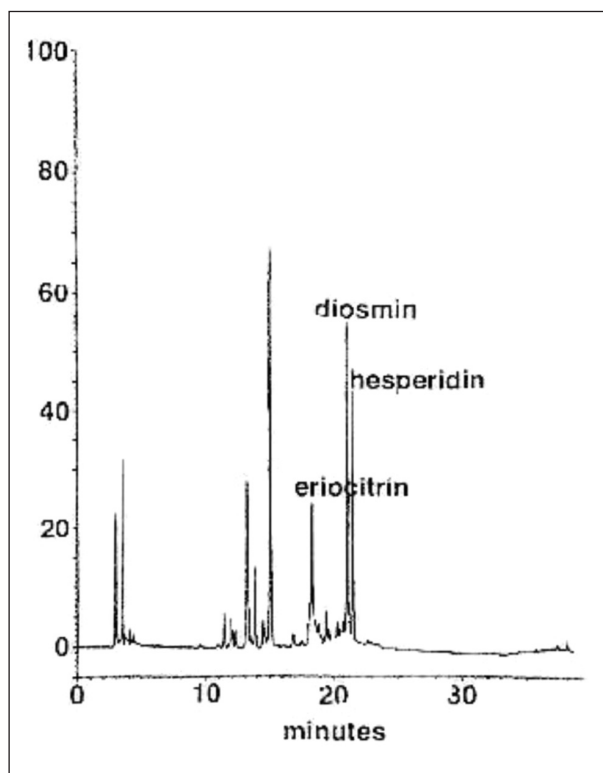


Figura 2. HPLC estratto acquoso di limone

Attività del succo di limone

Nella medicina tradizionale il succo di limone è stato sempre considerato un antisettico e battericida naturale tra i più potenti (8); producendo giovamento nelle otiti e nel raffreddore con una certa efficacia è stato impiegato anche nella cura delle infiammazioni della gola, delle afte della bocca, delle gengiviti e delle infiammazioni della lingua.

Gli effetti farmacologici dei flavonoidi furono osservati per la prima volta nel 1935 da Szent-Gyorgyi che isolò dalla buccia di limone una sostanza capace di diminuire la permeabilità capillare e di aumentare la resistenza vascolare, chiamata *citrina*, che risultò in seguito essere costituita dalla vitamina C e da due flavonoidi, esperidina ed eriocitrina (9,10).

L'eriocitrina è un bioflavonoide che ha dimostrato di possedere azione vasodilatatrice sui vasi sanguigni periferici con aumento del flusso sanguigno e della permeabilità capillare. La diosmina, invece, è un agente venotropico, in quanto aumenta la resistenza e la tonicità dei capillari sanguigni, presenta inoltre attività antinfiammatoria per inibizione della sintesi delle prostaglandine. L'esperidina è responsabile del gusto amaro del succo di limone ed è un flavonoide ampiamente diffuso nel regno vegetale; spesso, essa viene associata alla vitamina C della quale potenzia l'attività all'interno dell'organismo. La sua azione si esplica a livello della parete capillare e della produzione del collagene. Una carenza di esperidina nella dieta è stata collegata con rilassamento delle pareti dei capillari e con la sindrome dolorosa delle estremità, che provoca debolezza e crampi nel periodo notturno; inoltre, una integrazione con esperidina può contribuire a ridurre l'edema o eccesso di gonfiore alle gambe causato da ritenzione di liquidi. Recentemente esperimenti su animali con i flavonoidi diosmina ed esperidina da soli o in combinazione hanno evidenziato una riduzione di tumori orali con una inibizione dell'angiogenesi. I flavonoidi presenti nel succo di limone potrebbero pertanto svolgere un ruolo di chemioprevenzione e pertanto sarebbe opportuno incentivare l'uso nutraceutico di queste sostanze naturali (11). In un esperimento con il flavonoide eriocitrina ed i suoi metaboliti estratti dal succo di limone è stata evidenziata l'apoptosi cellulare in acuta leucemia mielomonocitica (12). Studi epidemiologici

associati al consumo di frutti di limoni hanno evidenziato un effetto protettivo sui tumori delle vie orali (13) attribuendo tale azione alla struttura chimica di sostanze particolari quali i flavonoidi (14).

Era già noto che i flavonoidi presentavano un'attività antivirale e antimicotica, ma recentemente l'attività antiossidante e l'attività anti-infiammatoria (15) dei flavonoidi sta diventando ogni giorno più importante (16), senza trascurare la loro azione antiallergica e analgesica. Nella prevenzione di varie forme cancerogene i flavonoidi sono importanti per la loro azione anti-proliferativa, anti-mutagenica ed anti-invasiva. A causa delle loro proprietà antiossidanti e della loro capacità di assorbire i raggi UV, possono intervenire in tutte le fasi del processo cancerogeno: danni al DNA, crescita del tumore e proliferazione. I flavonoidi sono efficaci inibitori dell'aggregazione piastrinica, abbassano il livello di colesterolo ed in tal modo hanno una azione molto positiva sulla aterogenesi e trombosi; agiscono sulla secrezione della serotonina; interferiscono con i meccanismi di formazione dell'edema edema e dell'iperpermeabilità indotta da farmaci.

Il succo di limone presenta effetti benefici su organi importanti come il fegato ed il pancreas: combatte l'ittero e l'insufficienza epatica e pancreatica ostacolando la formazione dei calcoli biliari; per le sue proprietà alcalinizzanti agisce come antiacido gastrico; costituisce un'ottima soluzione elettrolitica orale per la presenza di sali di potassio e vitamina C con azione tonica, diuretica ed antidiarroica; agisce contro le malattie da raffreddamento e contro l'asma. Contrariamente alla maggior parte dei frutti, che a causa della ricchezza in glucidi sono vietati ai diabetici, il limone ha invece proprietà favorevoli nel trattamento del diabete (17).

Recentemente molta attenzione è stata data all'influenza dei fattori dietetici sulla salute ed il benessere mentale ed è stata evidenziata per i flavonoidi una certa azione neuroprotettiva grazie alle loro proprietà antiossidanti ed antinfiammatorie (18). I flavonoidi degli agrumi ed in particolare l'esperidina presente nel succo di limone, non presentano alcuna tossicità per le cellule normali sane, mentre sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (19) esercitando un'azione preventiva nei confronti della neurodegenerazione (20, 21). Il succo di limone che è ricco di flavonoidi tra cui l'esperidina può pertanto essere considerato un nutra-

ceutico ed un alimento per il cervello nei processi neurodegenerativi.

Conclusioni

In questo lavoro è stato preparato un estratto della polpa di limone a partire da limoni senza flavedo e albedo e impiegando il Naviglio Estrattore come tecnica solido-liquida innovativa. L'estratto prodotto è stato pastorizzato e la sua shelf-life è risultata essere di circa un anno. Questo estratto può essere vantaggiosamente impiegato sia nel campo cosmetico come lenitivo della pelle sia nel campo alimentare come integratore.

Bibliografia

- Del Rio, J. A., Fuster, M. D., Gomez, P. et al. Citrus limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chem.* 2004, 84, 457-461.
- Robards, K., Antolovich, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst* 1997, 122, 11R-34R.
- Grandi R., Trifirò A., Gerardi S. et al. Characterization of lemon juice on the basis of flavonoid content. *Fruit Process.* 1994, 4, 355-359.
- Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1242-1246
- Pias MJ. The effects of lemon juice (citric acid) on the surfaces of teeth. *Chronicle* . 1972, 35(8), 217-218.
- Naviglio D., Pizzolongo F., Romano R. et al. An innovative solid-liquid extraction technology: use of the Naviglio Extractor for the production of lemon liquor. *African Journal of Food Science*, 2007, 1, 42-50.
- Martin, F. R., Martinez, M., Uribesalga, T., et al. Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chem.* 2002, 78, 319-324.
- D'Aquino M, Teves SA. Lemon juice as a natural biocide for disinfecting drinking water. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* 1994, 28(4), 324-330
- Caristi C, Bellocco E, Panzera V, et al. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from Sicilian cultivars. *J Agr Food Chem* 2003, 51(12), 3528-34.
- Benavente-García O., Castello J., Marin F.R., et al. Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 1997, 45, 4505-4515.
- Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., et al. Flavonoids, dietary derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Research* 1997, 57, 2916-2921.
- Ogata S., Miyake Y., Yamamoto K., et al. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* . 2000, 64(5), 1075-1078
- Pavia M., Pileggi C., Nobile C.G., et al. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* . 2006, 83(5), 1126-1134.
- Benavente-García O., Castillo J., Alcaraz M., et al. Beneficial action of Citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. *Curr Cancer Drug Targets* 2007, 7(8), 795-809
- Benavente -Gaecia O. and Castillo J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anti-cancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (15), 6185-6205
- Manthey J. A., Guthrie, N., Grohmann, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 135-153
- Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, et al. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids.* 1998, Jul, 33(7), 689-95.
- Manthey, J. A., Guthrie, N., Grohmann, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 135-153
- Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids *J Agric Food Chem.* 2012, 60(4), 877-85
- Cho J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Arch. Pharmacol Res.* 2006, 29, 699-706.
- Gutierrez-Merino C., Lopez-Sanchez C., Lagoa R., et al. Neuroprotective actions of flavonoids *Curr Med Chem.* 2011, 18(8), 1195-212.

Correspondence:
 Prof.ssa Lydia Ferrara
 Università di Napoli "Federico II"
 Via Domenico Montesano 49-80131 - Napoli
 E-mail: lyferrara@unina.it