



**Università degli Studi di Foggia**  
Facoltà di Economia

**XXI Congresso Nazionale di Merceologia con partecipazione internazionale**  
**Risorse naturali e sviluppo economico-sociale. Contributi delle Scienze**  
**Merceologiche.**



Foggia, 22-24 settembre 2004



Wip Edizioni

## NUOVA TECNOLOGIA DI ESTRAZIONE DI PRINCIPI ATTIVI DA PIANTE OFFICINALI

GIUSEPPE MICALI\*, GIOACCHINA CAPPELLANO\*\*, FILIPPO LO COCO\*\*\*,  
FABIO MONDELLO\*\*, FRANCESCO LANUZZA\*

### Abstract

The substantial development of the phytotherapy industry has followed from the ever increasing scientific and clinical evidence of the healing powers of medicinal plants demonstrated by their use for treating common illnesses. In this work, a novel technique for solid-liquid extraction was utilised to obtain extracts from medicinal plants. This makes use of a heightened solvent pressure on the raw solid material in order to obtain the extract and differs from currently used methods that rely on heating of the system.

The method is more effective than existing extraction techniques and extracts the raw solid material more quickly. *Hypericum perforatum* was used to point out the performance of this method and to compare it with currently used extraction techniques and with the officially approved methods of Pharmacopea. As the extraction is carried out at room temperature, the method avoids the thermic stress of heat sensitive active principles and enables phytotherapy extracts high in active ingredients to be obtained in a short time.

### Introduzione

I progressi compiuti dalla farmacologia nella comprensione del legame tra struttura ed attività farmacologica hanno determinato lo sviluppo di farmaci di sintesi sempre più potenti ma, se da una parte ciò ha consentito di conseguire risultati importanti nella cura di diverse malattie, dall'altra parte ci si è accorti che l'azione terapeutica è spesso accompagnata dal rischio di importanti effetti iatrogeni che non sempre è giustificato far correre al paziente.

Negli anni ottanta si è sviluppato un vero e proprio "movimento culturale" che richiedeva l'uso di terapie più rispettose dell'ecologia dell'organismo. In questo ambito si è sviluppato un rinnovato interesse per l'uso di sostanze naturali e per la farmacologia dei complessi vegetali. Così oggi la fitoterapia sta conoscendo un notevole sviluppo, grazie soprattutto ad un numero crescente di studi scientifici e clinici, che l'hanno fatta uscire dall'empirismo che la caratterizzava, rendendo noti i meccanismi d'azione delle piante medicinali e confermando le loro proprietà curative.

La moderna fitoterapia si basa sul concetto della "attività terapeutica globale della pianta" secondo cui nessun suo costituente può considerarsi "attivo" o "inerte". La pianta medicinale è un organismo unitario nel quale ogni costituente ha una propria ragione d'essere nell'economia fisiologica della pianta stessa, ed esercita una determinata funzione. Tutti i costituenti, sia quelli farmacologicamente attivi che quelli non farmacologicamente attivi, ma che modificano spesso l'assorbimento dei primi, concorrono a determinare l'attività terapeutica globale della pianta medicinale. Per tale motivo si preferisce dire che l'effetto biologico è da attribuire al "complesso fitoterapico in toto" estratto dalla pianta.

La parte della pianta che viene utilizzata, chiamata "droga vegetale", può essere usata come tale, o più propriamente sotto forma di preparati fitoterapici ottenuti con varie metodiche (polveri, estratti, tinture, oli essenziali, ecc.), alcuni dei quali presenti nella Farmacopea ed in specialità

---

\*Università degli Studi di Messina, Facoltà di Economia, Dipartimento di studi su Risorse, Impresa, Ambiente e Metodologie Quantitative, p.zza S. Pugliatti 1, 98122 Messina, tel. 090/771548; fax: 090/6764920;  
e-mail: [micali.giuseppe@unime.it](mailto:micali.giuseppe@unime.it); [francesco.lanuzza@unime.it](mailto:francesco.lanuzza@unime.it)

\*\*Università degli Studi di Messina, Dottorato di Ricerca in TEPPSA, Dipartimento di studi su Risorse, Impresa, Ambiente e Metodologie Quantitative, p.zza S. Pugliatti 1, 98122 Messina, tel. 090/771548; fax: 090/6764920;  
e-mail: [gcappellano@unime.it](mailto:gcappellano@unime.it); [famondello@supereva.it](mailto:famondello@supereva.it)

\*\*\*Università degli Studi di Udine, Facoltà di Economia, Dipartimento di Scienze Economiche, via Tomadini 30/A, 33100 Udine, tel. 0432249225; e-mail: [filippo.lococo@uniud.it](mailto:filippo.lococo@uniud.it)

medicinali, prevalentemente OTC (Over The Counter, letteralmente “sopra il banco”, le cosiddette specialità da banco), ma utilizzabili anche per preparazioni galeniche di derivazione magistrale, su prescrizione medica.

Per isolare i composti estraibili contenuti nelle più svariate matrici di tipo vegetale spesso è richiesto l’uso di una tecnica di estrazione solido-liquido. Le tecniche più adoperate sono: la spremitura, la percolazione, la macerazione, l’estrazione in Soxhlet, la distillazione in corrente di vapore, gli ultrasuoni, l’estrazione con fluidi supercritici, l’accelerated solid-liquid extraction (Dionex<sup>®</sup>) ecc.

Ognuna di tali tecniche ha naturalmente vantaggi e svantaggi. Alcuni degli svantaggi più comuni sono: tempi lunghi per esaurire la matrice, l’uso di alte temperature, composizione qualitativa in principi attivi non soddisfacente, estratti non stabili ecc.

In questo lavoro si è voluta valutare una nuova tecnologia estrattiva solido-liquido che si basa sul “Principio di Naviglio” (1) che ha portato alla realizzazione dell’omonimo estrattore. Questo metodo di estrazione ha avuto poche applicazioni finora riportate in letteratura (1 - 6). Il suo impiego può essere sicuramente interessante nel settore erboristico – fitoterapico.

Per valutare l’efficienza di questo metodo di estrazione dinamica solido-liquido si è adoperata come matrice vegetale test, la pianta officinale *Hypericum perforatum*. Tale pianta sta rivestendo grande interesse, negli ultimi tempi, per l’industria fitoterapica per le sue interessanti proprietà terapeutiche. Infatti, approfonditi studi farmacologici hanno dimostrato un’importante azione antidepressiva dei suoi estratti nelle depressioni lievi e moderate con scarsi effetti collaterali (7-15). Altri studi riguardano la cura dell’AIDS e di alcune forme di cancro (15).

Il complesso fitoterapico ritenuto più efficace come antidepressivo si ottiene per estrazione alcolica. I componenti non ancora tutti identificati sono oltre una decina. Le classi chimiche a cui appartengono sono rappresentate da naftodiantroni, acilfloroglucinoli, flavonoidi, oli essenziali, benzofenoni e xantoni (16, 17). Nonostante non sia ancora del tutto chiaro quali siano i principi responsabili dell’attività biologica dell’Iperico, le preparazioni di Iperico usate in terapia sono standardizzate sul contenuto totale di naftodiantroni, calcolati come ipericina.

La tecnica di estrazione del complesso fitoterapico mediante Naviglio Estrattore<sup>®</sup> è stata confrontata con la macerazione idroalcolica al 65% per 21 giorni, che è il metodo ufficiale della Pharmacopée Européenne per ottenere gli estratti di *Hypericum perforatum*.

Per stabilire le prestazioni dei due metodi di estrazione si è usata come sostanza marker l’ipericina, uno dei composti presenti, la cui concentrazione viene anche adoperata per stabilirne il titolo negli estratti secondo le indicazioni della Farmacopea. La separazione ed il dosaggio dell’ipericina negli estratti è stata effettuata mediante RP – LC.

## Parte sperimentale

### Strumentazione

- Estrattore Naviglio<sup>®</sup> MNLAB/M 300, progettato e costruito dalla Depurex 88 S.r.l.. È costituito da una camera di estrazione cilindrica del volume di 500 ml e da una camera attigua alla prima in cui scorre un pistone spinto da un sistema pneumatico ad aria compressa.
- Sistema HPLC costituito da una pompa UV4000 Menus (Thermo Separation Products, USA), una valvola di iniezione manuale Rheodyne (Mod. 8125) con loop da 20 µl, un rivelatore Spectra System UV6000LP a serie di fotodiodi (Thermo Separation Products, USA) gestito dal software Chrom Quest (ThermoQuest Italia s.p.a.), un rivelatore spettrofluorimetrico Perkin Elmer LC-240 collegato in serie con il precedente.
- Sistema di acquisizione ed integrazione dati cromatografici Chrom Card (Fisons Instruments, Milano, Italia).

### Reagenti e standard

Metanolo ed Etanolo entrambi di grado HPLC sono stati acquistati presso la J.T. Backer Chemical Co Mallinckrodt (Deventer, Olanda), il potassio fosfato monobasico e il sodio fosfato bibasico per la preparazione del tampone fosfato 0,05M, pH 7 da Carlo Erba (Milano, Italia); l'acqua deionizzata è stata ottenuta per mezzo di un sistema Milli-Q Water Purification della Millipore (Bedford, Gran Bretagna). Lo standard di ipericina, purezza 97%, è stato acquistato presso la Extrasynthèse (Genay, Francia).

### Estrattore Naviglio<sup>®</sup> e suo funzionamento

Il Naviglio Estrattore<sup>®</sup> è costituito da una camera di estrazione in cui è collocata, in un apposito sacchetto in nylon chiuso, la matrice solida da estrarre. La camera è riempita con il solvente estraente e viene chiusa ermeticamente (Fig. 1a). Alla base della camera di estrazione vi è una griglia in acciaio inox che consente il passaggio del liquido e delle sostanze in esso solubilizzate e blocca invece la matrice solida e le eventuali parti grossolane di materiale. Dopo la chiusura della camera e l'avvio del programma di estrazione, il sistema è pressurizzato, ad una pressione variabile da 6 a 9 bar, dall'azione di un pistone spinto ad aria compressa. Raggiunta la pressione impostata, il sistema rimane fermo per il tempo necessario ad equilibrarsi. Questo stato viene definito "fase statica" (Fig. 1b).

Dopo la fase statica, il pistone decomprime e ripressurizza più volte il solvente nella camera; secondo il programma impostato; ogni fase di decompressione seguita da ripressurizzazione viene definita come "colpo del pistone". Inizia in questo modo la "fase dinamica" (Fig. 2) in cui si realizza il principio estrattivo: le sostanze estraibili vengono trasferite nel solvente estraente per il gradiente di pressione negativo che si è venuto a creare tra l'interno e l'esterno della matrice solida.

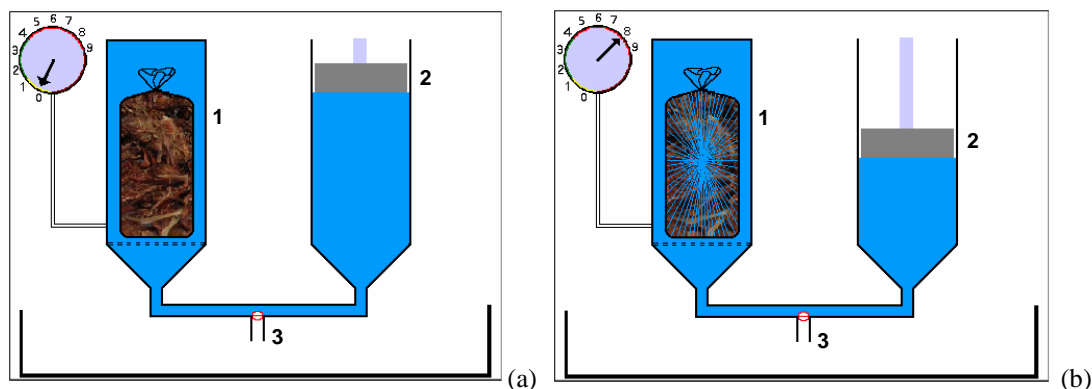


Figura 1 - (a) Riempimento della camera estrattiva con la matrice solida e il solvente estraente; (b) pressurizzazione del sistema ed inizio della fase STATICA.

1) Camera di estrazione; 2) pistone pneumatico; 3) elettrovalvola per lo svuotamento

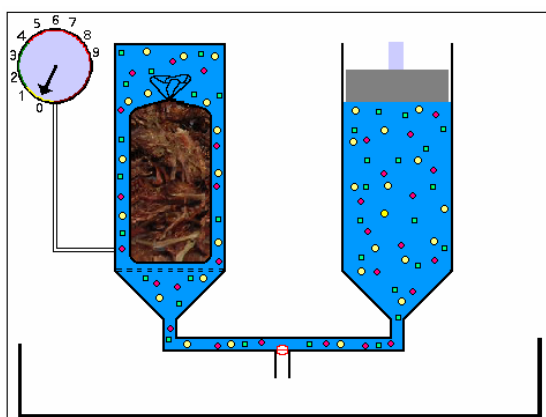


Figura 2 - Fine della fase STATICA ed inizio della fase DINAMICA

La fase dinamica ha, inoltre, la funzione di rimescolare il liquido evitando la formazione di gradienti di concentrazione nelle immediate vicinanze della superficie esposta del solido.

I parametri programmabili dell'estrattore sono:

- tempo di sosta durante il quale il pistone mantiene la compressione per la fase dinamica;
- numero di colpi del pistone durante la fase dinamica;
- cicli di estrazione (costituiti dalla somma di una fase dinamica e di una fase statica);
- tempo di permanenza del sistema in pressione (tempo di fase statica);
- tempo di immissione dell'aria all'interno della camera di estrazione necessaria per effettuare lo scarico dell'estratto;
- tempo necessario per lo scarico dell'aria residua all'interno della camera di estrazione dopo aver effettuato lo scarico.

La porosità del sacchetto, nel quale è contenuta la droga vegetale, va scelta in funzione della granulometria della matrice solida ed è possibile operare sotto gas inerte per evitare l'ossidazione delle molecole di interesse.

#### *Preparazione dei campioni*

La pianta è stata raccolta nei mesi di giugno e luglio 2003, cioè in corrispondenza del tempo balsamico, sui monti Peloritani selezionando il materiale sul luogo di raccolta. Esso è stato riposto in sacchetti di carta asciutti e puliti, trasferito in laboratorio e quindi essiccato all'aria aperta, evitando l'esposizione diretta alla luce del sole. Il materiale vegetale è stato disposto, allo scopo, in strati sottili su telai collocati ad una sufficiente distanza dal suolo in modo da assicurare la libera circolazione dell'aria. Il prodotto dell'essiccazione è stato infine chiuso in sacchetti di carta puliti e perfettamente asciutti e conservato in ambiente secco per le successive analisi.

L'Iperico, essendo una pianta erbacea semilegnosa che presenta una certa rigidità quando è secca, è stato ridotto in frammenti usando una piccola cesoia. Una certa quantità delle piante raccolte è stata suddivisa per tipologia (capsule, foglie e fusti), ed un'altra parte è stata usata come pianta intera, con l'esclusione delle parti ipogee.

#### *Estrazione con Naviglio Estrattore®*

Un'aliquota del campione di *Hypericum perforatum* è stata accuratamente pesata (37 g), trasferita in un sacchetto filtrante di nylon avente tessitura con maglie di 50 µm, porosità che ci ha consentito di ottenere i migliori risultati di estrazione, e chiusa con una fascetta per evitare la fuoriuscita della droga; il sacchetto è stato posto quindi sulla griglia metallica all'interno della camera di estrazione dello strumento.

La camera è stata successivamente riempita con il solvente di estrazione (370 ml di alcol etilico al 65%), e chiusa ermeticamente. In Tab. 1 è riportato il programma di estrazione che prevede più cicli, per una durata complessiva di 150 minuti per singola estrazione.

Tabella 1 - Programma di estrazione adoperato

Tempo di fase statica	5 minuti
Numero colpi pistone in fase dinamica*	5 colpi
Numero di cicli	20 cicli
Tempo di immissione aria per lo svuotamento	15 secondi
Tempo di scarico dell'aria residua per lo svuotamento	5 secondi

\*ad ogni colpo, in fase di compressione, il pistone resta fermo 15 sec.

Il programma selezionato deriva da una serie di prove nelle quali è stato cambiato di volta in volta un singolo parametro. Esso è risultato quello ottimale in base alla determinazione della concentrazione del marker ipericina nell'estratto finale.

Al fine di vedere dopo quante estrazioni la matrice vegetale si poteva considerare esaurita, le estrazioni, con il programma sopradetto, sono state ripetute più volte. I singoli estratti erano raccolti separatamente e portati a volume addizionandoli con azoto e conservati in bottiglie di vetro scuro in assenza di luce a 4°C. In ogni estratto è stata dosata l'ipericina per HPLC.

#### Estrazione per macerazione

Un'aliquota del campione di *Hypericum perforatum* è stata accuratamente pesata (5 g) e trasferita in una bottiglia in vetro scuro, all'interno della quale sono stati versati 50 ml di alcol etilico al 65%. La bottiglia è stata chiusa con tappo a smeriglio e sigillata con parafilm. È stata quindi conservata in luogo fresco in assenza di luce per 21 giorni, come previsto dalla Farmacopea.

Trascorsi i 21 giorni, l'estratto è stato raccolto, avendo cura di strizzare, mediante una pressa, la droga imbibita al fine di recuperare quanto più solvente possibile.

I campioni di estratto sono stati portati a volume e, dopo appropriata diluizione con metanolo, sono stati filtrati utilizzando un filtro Millex®-GV, 0,22 µm della Millipore ed un'aliquota è stata analizzata per HPLC nelle stesse condizioni cromatografiche adottate per l'analisi degli estratti ottenuti con l'Estrattore Naviglio®.

#### Analisi cromatografica

L'ipericina è stata separata e dosata mediante la messa a punto di un metodo HPLC che adopera una colonna a fase inversa Perkin-Elmer HS C18 (3 µm) 8.3 x 0.4 cm I.D., connessa ad una pre-colonna Supelguard LC 18 (5 µm) 2 x 0.46 cm I.D. (distribuita da Supelco, Bellefonte, PA, USA), termostata a 50°C.

L'analisi cromatografica è stata condotta mediante un gradiente di eluizione. La fase mobile era costituita da: A) tampone fosfato (pH 7) – metanolo (30:70); B) acqua deionizzata – metanolo (30:70). Il flusso era di 1,5 ml/min.

La soluzione tampone è stata filtrata con filtri a membrana Millipore HAWP 047 00 0,45 µm e il metanolo con filtri Millex FG 0,2 µm. Il programma di eluizione è riportato in Tab. 2.

Tabella 2 - Programma di eluizione messo a punto per l'analisi RP – LC di estratti di *Hypericum perforatum*

	Miscela eluente A	Miscela eluente B	Tempo (min)
<b>Fase di equilibrio</b>	100%	0	10
<b>Fase 1</b>	100%	0	3
<b>Fase 2</b>	0	100%	2
<b>Fase 3</b>	0	100%	13
<b>Fase 4</b>	100%	0	2

Per la rivelazione sono stati collegati in serie un rivelatore UV-VIS a serie di diodi e un rivelatore spettrofluorimetrico. Si è preferito utilizzare per la determinazione quantitativa e

qualitativa il rivelatore fluorimetrico per la sua sensibilità e specificità. Il rivelatore UV è servito per l'identificazione del picco a  $t_r$  più basso e per la verifica della purezza dei picchi.

La rivelazione spettrofluorimetrica è stata condotta a  $\lambda_{ecc}$  di 470 nm e a  $\lambda_{em}$  di 590 nm.

La durata di un completo ciclo di analisi era di 30 minuti, e l'ipericina aveva un  $t_r$  di 9 min. La Fig. 3 mostra un cromatogramma tipico di un estratto di iperico ottenuto con l'estrattore Naviglio<sup>®</sup>. Anche l'estrazione con il metodo ufficiale della Farmacopea dà un cromatogramma qualitativamente simile.

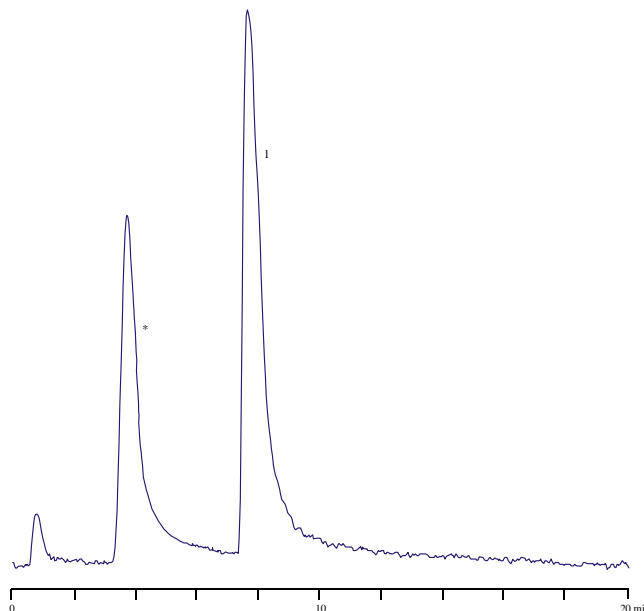


Figura 3 - Cromatogramma HPLC dell'estratto di iperico ottenuto con l'estrattore Naviglio<sup>®</sup>. Colonna Perkin-Elmer HS C18 (3  $\mu$ m) 8.3 x 0.4 cm I.D., termostata a 50°C; fase mobile A: tampone fosfato (pH 7) – metanolo (30:70); fase mobile B: acqua deionizzata – metanolo (30:70); flusso: 1,5 ml/min; condizioni di eluizione in gradiente come riportate nella Tab. 2; rivelatore spettrofluorimetrico:  $\lambda_{ecc}$  470 nm,  $\lambda_{em}$  590 nm.

(1) Ipericina; (\*) Pseudoipericina

L'identificazione dell'ipericina è stata effettuata comparando il comportamento cromatografico dei campioni con quello di soluzioni a titolo noto di ipericina standard e comparando gli spettri di eccitazione e di emissione degli standard con quelli ottenuti per il picco al tempo di ritenzione dell'ipericina.

La pseudoipericina è stata identificata comparando lo spettro UV-VIS del picco corrispondente registrato durante l'analisi con quello acquisito da una banca dati, poiché non era disponibile uno standard commerciale. Inoltre, sempre attraverso il rivelatore UV-VIS a serie di diodi, è stato verificato che entrambi i picchi erano puri.

L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante la costruzione di una retta di regressione lineare, ottenuta analizzando una serie di soluzioni standard a concentrazione nota.

Gli standard sono stati preparati in metanolo e conservati a 4°C in contenitori di vetro scuro. Essi hanno dimostrato di avere una stabilità tale da poter essere utilizzati tranquillamente per circa un mese.

La linearità di risposta del rivelatore spettrofluorimetrico è stata verificata nell'intervallo di concentrazioni  $1,4 \cdot 10^{-4} \div 6,4 \cdot 10^{-4}$  mg/ml di ipericina in metanolo.

La precisione del metodo analitico era determinata da sette analisi di un campione di un estratto idroalcolico di *Hypericum perforatum*, ottenendo un CV per l'ipericina dello 0,5%.

## Risultati e discussioni

Con il metodo RP-LC messo a punto abbiamo analizzato gli estratti ottenuti con l'Estrattore Naviglio® dalle varie parti della pianta (capsule e pianta intera). Per ogni campione si è analizzata un'aliquota delle quattro estrazioni effettuate, dosando in ognuna l'ipericina.

I risultati ottenuti per le varie parti di pianta analizzate sono riportati in Tab. 3.

Tabella 3 - Concentrazioni in mg/Kg di ipericina negli estratti idroalcolici di campioni di capsule e di pianta intera di *Hypericum perforatum* mediante estrazione con Estrattore Naviglio®

Campioni	Ipericina (mg/Kg)				
	I estr.	II estr.	III estr.	IV estr.	Totale
<i>Capsule</i>					
1	227,7	196,5	89,3	20,0	533,5
2	241,2	195,1	90,6	18,2	545,1
3	227,2	194,3	87,1	19,9	528,5
4	232,0	194,8	88,4	19,9	535,1
5	220,2	199,6	88,0	24,6	532,4
<i>Pianta intera</i>					
1	370,4	332,1	140,0	12,6	855,1
2	365,4	321,2	133,4	11,4	831,4
3	364,9	318,6	133,5	12,8	829,8
4	358,1	315,4	129,5	11,8	814,8
5	362,6	318,9	130,2	11,3	823,0

Per ogni campione sono state condotte tre analisi.

I valori riportati in tabella rappresentano la media dei tre valori

Dall'analisi della Tab. 3 si evince che già dopo la IV estrazione la pianta si può considerare esausta.

Con lo stesso metodo HPLC sono stati analizzati gli estratti idroalcolici ottenuti dalla varie parti della pianta per macerazione; i risultati ottenuti sono riportati nella Tab. 4.

Tabella 4 - Concentrazioni in mg/Kg di ipericina negli estratti idroalcolici di campioni di capsule e di pianta intera di *Hypericum perforatum* mediante estrazione per macerazione

Campioni	Ipericina (mg/Kg)	
	<i>Capsule</i>	<i>Pianta intera</i>
1	350,3	387,4
2	348,5	384,7
3	350,2	395,0
4	345,8	386,5
5	351,0	390,4

Per ogni campione sono state condotte tre analisi.

I valori riportati in tabella rappresentano la media dei tre valori

Dalla Tab. 5 si osserva che usando il metodo di estrazione solido-liquido Naviglio Estrattore® si ottengono estratti che hanno un titolo in ipericina superiore del 53% per le capsule e del 153% per la pianta intera rispetto a quelli ottenuti con il metodo della Farmacopea ufficiale.

Tabella 5 - Confronto fra le rese di estrazione da *Hypericum perforatum* con l'estrattore Naviglio® (A) e con il metodo ufficiale Farmacopea (B)

	Titolo in Ipericina (mg/Kg)		Efficienza di estrazione A/B %
	Estrattore Naviglio®	Macerazione	
<i>Capsule</i>	534,9	349,2	153 %
<i>Pianta intera</i>	830,8	388,8	213 %

Inoltre con il metodo Naviglio Estrattore®, la droga è praticamente esausta dopo quattro estrazioni (Tab. 3) per complessive dieci ore di lavoro. Invece il metodo ufficiale richiede ventuno giorni, la concentrazione dell'estratto è notevolmente più bassa, come già evidenziato, e la pianta non è ancora esausta.

Il vantaggio in termini di tempo e di quantità di sostanza recuperata è evidente. Inoltre il metodo consente di ottenere gli estratti a temperatura ambiente ed in atmosfera di gas inerte evitando la degradazione di sostanze termolabili e/o facilmente ossidabili. Gli estratti ottenuti per composizione quali-quantitativa sono di buona qualità e riproducibili.

Concludendo, il principio di estrazione qui applicato e sottoposto a verifica, si è dimostrato veramente interessante. Alcune ricerche da noi effettuate e ancora in corso condotte su altre matrici, ad es. residui dell'industria agroalimentare, piante aromatiche, ecc., fanno prevedere una possibile applicazione in altri settori, oltre quello fitoterapico, quali l'industria alimentare e l'industria cosmetica.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) D. NAVIGLIO, "Estrazione rapida ed esauriente a temperatura ambiente dei principi attivi contenuti nelle piante officinali mediante una tecnologia estrattiva innovativa basata su un nuovo principio di estrazione", Atti del VI Congresso Nazionale di Fitoterapia, Viterbo, 2-4 giugno 2000, 21.
- (2) L. FERRARA, D. MONTESANO, D. NAVIGLIO, "Confronto tra le tecniche estrattive ufficiali e il Naviglio Estrattore® nell'estrazione dei principi attivi dalle piante officinali", Atti del VII Congresso Nazionale di Fitoterapia, Pescara, 1-3 giugno 2001, 15.
- (3) D. NAVIGLIO, L. FERRARA, D. MONTESANO, G. MELE, B. NAVIGLIO, M. TOMASELLI, F. MARTINI, M. PINTONELLO, S. DIANA, S. SAGGIOMO, "Nuova tecnologia di estrazione solido-liquido nella produzione del liquore di limone", *Ind. Bev.*, 2001, 30, 362-370.
- (4) D. NAVIGLIO, "Estrattore rapido solido-liquido dinamico", Atti del V Congresso Italiano di Scienza E Tecnologia degli Alimenti (CISETA), Cernobbio (CO), 2001, 14.
- (5) D. NAVIGLIO, D. MONTESANO, L. FERRARA, "Metodiche analitiche per il confronto di estratti vegetali ottenuti con il Metodo Soxhlet e con il «Naviglio Estrattore»", *Piante Medicinali*, 2002, 1/1, 14-17.
- (6) L. FERRARA, D. MONTESANO, D. NAVIGLIO, "Metodo rapido di estrazione per i coloranti naturali", *Piante Medicinali*, 1/3, 142-144.
- (7) J. M. REY, G. WALTER, "Hypericum perforatum (St. John's wort) in depression: pest or blessing?", *Med. J. Aust.*, 1998, 169.
- (8) H. HIPPIUS, "St. John's wort (Hypericum perforatum): a herbal drug antidepressant", *Curr Medical Research and Opinion*, 1998, 14.
- (9) E. ERNST, "Second thoughts about safety of St. John's wort", *Lancet*, 354, 1999.
- (10) A. TUBARO "Considerazioni sulla sicurezza e sugli effetti avversi di estratti di iperico", in Iperico Giornate di aggiornamento, Società Botanica Italiana, Bologna 2001.
- (11) K. D. HÄNSGEN et al., "Studio in doppio cieco effettuato in diversi centri per valutare l'efficacia antidepressiva dell'estratto di iperico LI 160", *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.*, 1994, 7.
- (12) E. ERNST, "L'erba di S. Giovanni quale terapia antidepressiva", *Fortschritte der Medizin*, 113 (25), 1995.
- (13) E. U. VORBACH et al., "Efficacia e tolleranza dell'estratto di Iperico LI 160 comparato all'Imipramina: studio randomizzato in doppio cieco su 135 pazienti ambulatoriali", *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.*, 1994, 7.
- (14) R. BERGMANN et al., "Trattamento delle depressioni lievi e moderate: comparazione tra Hypericum perforatum e Amitriptilina", *Neurologie/Psichiatrie*, 1993, 7.

- (15) G. HARRER et al., "Efficacia e tolleranza dell'estratto di Iperico LI 160 comparato alla Maprotilina: uno studio in doppio cieco effettuato in diversi centri clinici", *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.*, 1994, 7.
- (16) P. AVATO, "La chimica del genere iperico" in Iperico Giornate di aggiornamento, Società Botanica Italiana, Bologna 2001.
- (17) American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium: *St. John's Wort -Hypericum perforatum*, 1997.