

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902076282A1

Publication Date

20140208

Applicant

FATTORIA AUTONOMA TABACCHI S.C.A.R.L.

Title

METODO PER LA PRODUZIONE DI TABACCO VOLTO A RIDURRE IL
TENORE DI NITROSAMMINE.



1 Descrizione del Brevetto per Invenzione Industriale avente per
2 titolo:

3 "METODO PER LA PRODUZIONE DI TABACCO VOLTO A
4 RIDURRE IL TENORE DI NITROSAMMINE"

5 del

6 GRUPPO MAURO SAVIOLA S.r.l., Proprietario del 70%

7 di nazionalità Italiana, con sede a VIADANA - (Mantova) - e
8 FATTORIA AUTONOMA TABACCHI S.C.A.R.L., proprietaria del
9 30% , di nazionalità Italiana, con sede a Città di Castello - Peru-
10 gia ed elettivamente domiciliate presso l'Ufficio Brevetti Dott.
11 Franco Cicogna, in Via Visconti di Modrone 14/A - Milano.

12 Depositata il al N.

13 DESCRIZIONE

14 Il presente trovato ha come oggetto un metodo di produ-
15 zione del tabacco.

16 Il metodo oggetto del presente trovato mira in particolare
17 a ridurre la concentrazione di nitrosammine specifiche (TSNA =
18 Tobacco Specific NitrosAmines) del tabacco.

19 Come è noto, le nitrosammine sono ritenute composti
20 cancerogeni (IARC Monographs vol. 89) e la riduzione della loro
21 concentrazione è un obiettivo primario della ricerca per il conte-
22 nimento dei danni da consumo di tabacco in genere e da fumo in
23 particolare.

24 Le nitrosammine specifiche studiate su tabacco (TSNA)
25 sono soprattutto quattro: NNN (N2-NitrosoNorNicotina),



1 NNK (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone), NAB (N2-
2 NitrosoAnaBasina) e NAT (N2-NitrosoAnaTabina).

3 La presente invenzione non si limita a queste, ma conside-
4 ra per similitudine tutte le nitrosammine presenti nel tabacco allo
5 stato verde o neoformate, attraverso vari meccanismi, nel perio-
6 do post-raccolta, ovvero nel periodo compreso tra la raccolta e
7 la cura del tabacco, e tra cura, fermentazione o invecchiamento
8 e stoccaggio del tabacco stesso, fino alla fase di manifattura di
9 prodotti da fumo o da consumo diretto a base di tabacco.

10 Queste nitrosammine si formano per reazione tra gli alcal-
11 loidi del tabacco e vari composti dell'azoto (nitrati, nitriti, NOx),
12 mediata dalla temperatura, dall'umidità e dalla presenza di batte-
13 ri responsabili dell'attività nitrato reduttasica del tabacco, in
14 condizioni di anaerobiosi.

15 Il problema delle nitrosammine riguarda tutti i tipi di tabac-
16 co: air-cured come il Burley, flue-cured come il Virginia Bright e
17 fire-cured come il Kentucky, per citare i principali tipi e senza
18 escludere altri.

19 Tuttavia, è stato maggiormente studiato nel Burley e nei
20 tabacchi scuri, in conseguenza di fattori genetici (linee cosiddet-
21 te "converter" dove la nicotina tende a trasformarsi in nornicoti-
22 na), agronomici (eccesso di concimazione azotata), condizioni di
23 cura (in particolare tra ingiallimento ed essiccazione) e stoccag-
24 gio (temperatura, rimozione dei piccioli delle foglie, ecc.) che
25 tendono a determinare un accumulo di TSNA.



1 tive quantità di tocoferoli e polifenoli, in grado di limitare la for-
2 mazione di TSNA.

3 Ad esempio, nel Virginia Bright il 28,7% del totale della
4 capacità antiossidante è costituito da acido clorogenico, e
5 l'11,5% da rutina, mentre nel Burley queste percentuali scendo-
6 no al 13,4 e al 6,2%, rispettivamente.

7 Tuttavia, queste sostanze tendono a perdersi nel corso
8 della cura: dal 50 all'80% nei primi 14 giorni nel Burley, tanto
9 che le concentrazioni di acido clorogenico e rutina scendono a
10 meno del 15% rispetto al tenore che avevano alla raccolta (Li et
11 Al., 2006).

12 Nell'ambito delle sostanze antiossidanti esogene la biblio-
13 grafia brevettuale ha preso in esame miscele di antiossidanti,
14 non meglio precisate, in combinazione a bicarbonato di sodio,
15 acido ascorbico, glutatione e selenio (Krauss et al., in US
16 2003/0056801 A1 del 27-03-2003), oppure l'acido ferulico e
17 suoi esteri (Thomas et al. in US 7,757,697 B2 del 20-07-2010),
18 applicati sia in pre che in post-raccolta del tabacco, in soluzione
19 alcolica ed in miscela a surfattanti.

20 Tuttavia, le scoperte fin qui codificate in brevetti non han-
21 no ad oggi condotto a processi commerciali, in quanto le modali-
22 tà di realizzazione delle applicazioni ed il loro costo, legato an-
23 che all'uso di antiossidanti di grado farmaceutico, non sono stati
24 in grado di dar luogo a processi percorribili sotto il profilo del ri-
25 sultato tecnico ed economico.



1 Questo dato di fatto è stato ribadito al 242° Meeting sta-
2 tunitense della Società per la ricerca sul cancro, che ha aperto i
3 lavori il 28-08-2011 a Denver (CO) con una relazione dal titolo
4 "Carcinogenic nitrosamines in U.S. cigarettes: Three decades of
5 remarkable neglect by the tobacco industry" [Nitrosammine car-
6 cinogeniche nelle sigarette USA: 30 anni di rimarchevole dimen-
7 ticanza da parte dell'industria del tabacco] dove si parla di "ap-
8 parent lack of effort to control the levels of these carcinogens in
9 cigarette tobacco and smoke by the cigarette manufacturers"
10 [apparente mancanza di sforzi da parte dei produttori di sigarette
11 di controllare i livelli di questi carcinogeni nel tabacco da sigaret-
12 te e nel fumo].

13 Compito del presente trovato è quello di realizzare un me-
14 todo per la produzione di tabacco che superi i problemi della
15 tecnica nota citata sopra.

16 Nell'ambito di questo compito, uno scopo del trovato è
17 quello di realizzare un metodo di produzione del tabacco che sia
18 basato sull'uso di un estratto vegetale naturale o di sue frazioni
19 standardizzate, con caratteristiche di antiossidanti.

20 Questo ed altri scopi, che meglio appariranno evidenziati in
21 seguito, sono raggiunti da un metodo per la produzione del ta-
22 bacco, caratterizzato dal fatto di comprendere l'uso di estratto
23 di tannini di castagno o sue frazioni per ridurre la formazione di
24 nitrosammine nel tabacco.

25 Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'oggetto del presen-



1 te trovato risulteranno maggiormente evidenziati attraverso un
2 esame della descrizione di una forma di realizzazione preferita,
3 ma non esclusiva, del trovato, illustrata a titolo indicativo e non
4 limitativo nei disegni allegati, in cui:

5 la figura 1 mostra il profilo cromatografico relativo
6 all'estratto liquido fraz. 6 di legno di castagno, registrato a 280
7 nm;

8 la figura 2 mostra il profilo cromatografico relativo alla so-
9 luzione acquosa di estratto secco (spray dried) di legno di casta-
10 gno, registrato a 280 nm;

11 la figura 3 è una tabella che illustra come le foglie apicali
12 di una coltura di Virginia Bright cv. VFC-ITB678, provenienti dal-
13 la quarta raccolta, siano state suddivise in 7 campioni, con due
14 replicazioni, nell'esempio 4;

15 la figura 4 mostra i dati relativi al contenuto di nitrosam-
16 mine relativi ad uno dei campioni della prima serie in analisi (se-
17 rie L), nell'esempio 4;

18 la figura 5 mostra il profilo cromatografico relativo
19 all'estratto idroalcolico del campione CHV01 (testimone), acqui-
20 sito a 254 nm (in alto) e 330 nm (in basso);

21 la figura 6 è una tabella dell'analisi quali-quantitativa dei
22 singoli metaboliti secondari e della nicotina presenti negli estratti
23 idroalcolici ottenuti dai campioni dell'esempio 5;

24 la figura 7 mostra un istogramma del contenuto in derivati
25 flavonolici totali e derivati idrossicinnamici totali per un campio-



1 ne, serie CHV, di tabacco varietà Virginia Bright;

2 la figura 8 mostra un istogramma del contenuto in derivati
3 flavonolici totali e derivati idrossicinnamici totali per un campio-
4 ne, serie PV, di tabacco varietà Virginia Bright;

5 la figura 9 mostra un istogramma del contenuto in derivati
6 flavonolici totali e derivati idrossicinnamici totali per un campio-
7 ne, serie RB, di tabacco varietà Burley;

8 la figura 10 mostra un istogramma del contenuto in deri-
9 vati flavonolici totali e derivati idrossicinnamici totali per un
10 campione, serie BEB, di tabacco varietà Burley;

11 la figura 11 è una tabella, la quale illustra il contenuto di
12 TSNA misurato sui campioni dell'esempio 4;

13 la figura 12 è una tabella, la quale illustra il contenuto di
14 TSNA misurato sui campioni dell'esempio 5.

15 L'estratto di tannini di castagno è caratterizzato dalla pre-
16 senza di tannini idrolizzabili, costituiti generalmente da gruppi
17 fenolici come acidi gallici ed ellagici, parzialmente o totalmente
18 esterificati con una molecola di D-glucosio. L'attività antiossi-
19 dante dell'estratto acquoso, determinata con il saggio FRAP (ri-
20 duzione del complesso tripiridiltriagina/Fe(III) alla forma ferrosa
21 blu, con aumento dell'assorbanza a 593 nm), è superiore a
22 3500 nmol equivalenti di acido ascorbico per mg di estratto. Il
23 prodotto e sue frazioni standardizzate esercitano anche una mo-
24 derata azione antimicotica ed antimicrobica.

25 Inaspettatamente, si è scoperto che l'applicazione su ta-



1 bacco dell'estratto di tannini di castagno in acqua, o delle sue
2 frazioni standardizzate, effettuata nel corso della crescita in
3 campo della pianta fino alla raccolta, oppure dopo la raccolta, al
4 confezionamento dei cestoni dove ha luogo la cura del tabacco
5 Virginia Bright (flue-curing), oppure alla formazione delle filze di
6 foglie o di piante intere di tabacco Burley negli appositi capanni
7 di cura (air-curing) oppure subito prima o durante la cura a fuoco
8 (fire-curing) del tabacco Kentucky e successivamente, nel perio-
9 do compreso tra cura e manifattura dei prodotti finiti, riduce la
10 formazione di TSNA, senza modificare le altre caratteristiche e-
11 strinseche (ad esempio: colore, consistenza e aroma delle foglie)
12 ed intrinseche (ad esempio: tenore in nicotina e zuccheri ridutto-
13 ri) del tabacco, a parità di gradi di maturazione. Le TSNA sono
14 determinate mediante il metodo descritto da Li et Al. in J. Agro-
15 nomy & Crop Science 192, 267—277 (2006).

16 A differenza di altri antiossidanti fin qui proposti, l'estratto
17 di tannini di castagno o sue frazioni standardizzate sono inoltre
18 caratterizzati da aromi che non alterano il naturale gusto del ta-
19 bacco, con vantaggi tecnologici non trascurabili. Inoltre, sono
20 prodotti già usati, anche se con altre finalità, nella produzione
21 agricola del tabacco, ad esempio per la correzione del pH del ter-
22 reno e dell'acqua irrigua e come stimolante la crescita in base al-
23 le domande di brevetto EP 1 464 635 (A1) del 26-08-2003 e EP
24 2 345 628 (A1) del 14-01-11, rispettivamente a nome di Nuo-
25 va Rivart S.p.A., attualmente confluita nella richiedente il pre-



1 sente brevetto, e Sadepan Chimica S.p.A., facente parte della
2 holding Saviola. Il presente brevetto costituisce, a tutti gli effet-
3 ti, una continuazione e sviluppo delle domande di brevetto sopra
4 citate.

5 Ai fini della presente invenzione, senza però limitarne le
6 possibilità applicative, vengono usati l'estratto di tannini di ca-
7 stagno in forma liquida all'1-37% di tannini o sue frazioni, e pre-
8 feribilmente al 13%. Questi prodotti possono essere distribuiti:

9 1) al terreno in prossimità delle piantine, nei successivi stadi di
10 crescita in semenzaio e in campo, veicolati dall'acqua irrigua o
11 da un fertilizzante appositamente preparato; 2) alla pianta (rac-
12 colta a pianta intera) o alle foglie (raccolta per corone) del ta-
13 bacco nel periodo precedente la raccolta, e specificatamente in
14 corrispondenza della cimatura e nell'intervallo compreso tra 10
15 giorni prima della raccolta ed immediatamente prima della rac-
16 colta, e più specificatamente tra 3 e 1 giorno prima della raccol-
17 ta. In caso di raccolta effettuata per successive corone, le appli-
18 cazioni saranno in tal caso in numero corrispondente al numero
19 di raccolte. In caso di raccolta a pianta intera verrà effettuato un
20 unico intervento; 3) alla pianta intera o alle foglie del tabacco
21 raccolte e in fase di allestimento per la successiva cura, da at-
22 tuarsi secondo le modalità specifiche per i diversi tipi di tabacco:
23 flue-cured, air-cured, fire-cured e sun-cured (tabacchi orientali).
24 In alcuni tipi di tabacco, come il Virginia Bright, il Burley ed il
25 Kentucky, i trattamenti possono aver luogo anche nelle fasi suc-



1 cessive alla cura e fino alla manifattura dei prodotti finiti, ad e-
2 sempio durante le fasi di "battitura" (separazione del lembo fo-
3 gliare dalla costola). Nel caso delle applicazioni al terreno in
4 prossimità delle piantine di tabacco, direttamente o veicolato in
5 acqua irrigua o in un fertilizzante, l'estratto di tannini di casta-
6 gno in soluzione al 13%, o sue frazioni, vengono applicati a
7 concentrazioni comprese tra 0,1 e 50%, e preferibilmente tra 5
8 e 10%, somministrando complessivamente -nel corso del ciclo
9 del tabacco in più trattamenti- fino a 50 kg/ha di tannini. Nel ca-
10 so delle applicazioni alla pianta intera o alle foglie di tabacco
11 prima della raccolta, si interviene a concentrazioni comprese tra
12 0,1 e 5%, e preferibilmente tra 1 e 3%, distribuendo complessi-
13 vamente -in successivi trattamenti precedenti le singole raccol-
14 te- fino a 20 kg/ha di tannini. Nel caso, infine, delle applicazioni
15 effettuate su tabacco in post-raccolta, si interviene a concentra-
16 zioni comprese tra 0,5 e 10%, e preferibilmente tra 1 e 5%. In
17 tal caso, si applicano fino 50 ml di soluzione per metro quadrato
18 di superficie fogliare, corrispondenti a circa 0,65 g di tannino o
19 sue frazioni.

20 Per effettuare le applicazioni al terreno, l'estratto di tannini
21 o le sue frazioni sono preferibilmente diluiti nell'acqua
22 d'irrigazione oppure in un fertilizzante liquido, usando le normali
23 apparecchiature di miscelazione, e distribuiti, ad esempio, con la
24 tecnica della microirrigazione. Nel caso in cui il veicolo sia costi-
25 tuito da un fertilizzante allo stato solido, questo viene preferibil-



1 mente localizzato alla piantina, per aumentarne l'assorbimento.
2 Per le applicazioni alle foglie, sia in pre- che in post-raccolta,
3 l'estratto di tannini di castagno e sue frazioni sono irrorati con le
4 normali apparecchiature in uso presso le aziende agrarie, che
5 spruzzano i prodotti liquidi effettuandone una buona nebulizza-
6 zione, così da aumentare la superficie di contatto tra goccioline
7 e pagina fogliare.

8 I seguenti esempi vengono forniti solo a scopo illustrativo
9 della presente invenzione e non devono essere intesi in senso
10 limitativo dell'ambito di protezione, quale risulta definito dalle
11 accluse rivendicazioni.

12 Esempio 1

13 Esempio di frazionamento dell'estratto di tannini di casta-
14 gno e delle frazioni utilizzabili.

15 Sono stati analizzati campioni provenienti da un impianto
16 di estrazione acquosa a caldo di legno di castagno e fraziona-
17 mento a freddo mediante tecnologia a membrane.

18 In particolare, le frazioni prese in esame sono state:

19 Brodi tannici filtrati;

20 Permeato da nanofiltrazione I;

21 Concentrato da nanofiltrazione I;

22 Concentrato da nanofiltrazione II;

23 Permeato da nanofiltrazione II;

24 Concentrato da nanofiltrazione III;

25 Permeato osmosi;



1 Concentrato osmosi;

2 Sedimentato da chiarificazione.

3 Per l'analisi HPLC è stata utilizzata una colonna Luna C18
4 250x4.60 mm, 5 μ m (Phenomenex, Torrance, CA), la fase mobi-
5 le impiegata è costituita da H₂O (pH 3.2 per HCOOH), (A) e
6 CH₃CN (B). È stato applicato un gradiente lineare a quattro
7 rampe, flusso 0,8 mL/min, per 55 minuti. Il profilo di eluizione
8 utilizzato è il seguente: inizialmente 100% A , quindi il solvente
9 A è stato portato all'85% in 20 min, mantenuto costante per 5
10 min, diminuito al 75% in 10 min, mantenuto costante per 8 min,
11 infine riportato allo 0% (100% B) in 5 min e mantenuto costan-
12 te per 4 min per poi tornare alle condizioni iniziali in 3 min. I de-
13 rivati gallici sono stati calibrati a 280 nm con acido gallico, quelli
14 ellagici a 254 nm con acido ellagico.

15 Nelle figure 1 e 2 si riportano, a titolo di esempio, i profili
16 cromatografici relativi a due frazioni: la prima, liquida, ottenuta
17 da concentrazione mediante nanofiltrazione (frazione 6), con pe-
18 so specifico 1,06 (Fig. 1), e la seconda ottenuta per spray
19 drying a partire da quest'ultima (Fig. 2).

20 I numeri di riferimento della Fig. 1 si riferiscono ai seguenti
21 componenti: 1. Acido gallico; 2. Monogalloil glucosio; 3. Gallo-
22 tannino m/z 677; 4. Pentagalloil glucosio; 5. Galloil-HHDP glu-
23 cosio; 6. HHDP glucosio; 7. Ellagitannino m/z 925; 8. Castalagi-
24 na/vescalagina; 9. Ellagitannino m/z 1085; 10. Acido ellagico.

25 I numeri di riferimento della Fig. 2 si riferiscono ai seguenti



1 componenti: 1. Monogalloil glucosio; 2. Acido gallico; 3. Digal-
2 loil glucosio; 4. Trigalloil glucosio; 5. Tetragalloil glucosio; 6.
3 Pedunculagina isomero; 7. Ellagitannino m/z 683; 8. Ellagitanni-
4 no m/z 925; 9. Castalagina/vescalagina; 10. Ellagitannino m/z
5 613; 11. Galloil-HHDP glucosio; 12. Acido ellagico.

6 Oltre alle precedenti due frazioni sono state analizzate le
7 altre provenienti dallo stesso processo produttivo a membrana.

8 Esempio 2

9 Applicazione al terreno e via microirrigazione su V. Bright.

10 L'estratto secco di tannini di castagno dell'esempio 1 è
11 stato applicato ad una coltura di tabacco Virginia Bright in cam-
12 po in corrispondenza di due fasi: al momento del trapianto,
13 nell'acqua usata per bagnare la piantina (200 ml/pianta della so-
14 luzione al 5% p/p) e in fertirrigazione, in tre trattamenti, alla
15 dose di 4,5 kg/ha, previo scioglimento del prodotto in acqua ed
16 iniezione in manichetta del liquido ottenuto.

17 Dopo la raccolta e la cura in locali per il flue-curing, è sta-
18 to programmato il controllo analitico del contenuto di TSNA del-
19 le foglie di tabacco così trattate in confronto ad un testimone,
20 coltivato in tutto e per tutto allo stesso modo, salvo che per il
21 trattamento sperimentale.

22 L'analisi delle foglie dopo la cura è in fase di completa-
23 mento.

24 Esempio 3

25 Applicazione in pre-raccolta su tabacco V.Bright



1 L'estratto di tannini di castagno fraz. 6 è stato applicato
2 ad una coltura di tabacco Virginia Bright in campo in corrispon-
3 denza della fase di cimatura, e più precisamente, nell'intervallo
4 compreso tra questo intervento, che consiste nella rimozione
5 dell'infiorescenza apicale della pianta insieme alle ultime foglioli-
6 ne, e 48-24 ore prima delle successive 3-4 raccolte.

7 Queste hanno luogo per successive corone, appena cia-
8 scuna raggiunge la maturità tecnologica, ben nota all'esperto del
9 settore.

10 La frazione è stata diluita in acqua a concentrazioni com-
11 prese tra lo 0,005 e lo 3% di tannini. In particolare, le soluzioni
12 con concentrazione compresa tra 0,5 e 1% di tannini non hanno
13 determinato fitotossicità sulla pianta, quando applicate su vege-
14 tazione turgida e con temperature inferiori a 20°C, mediante
15 ugelli in grado di polverizzare finemente il getto sulle foglie. In
16 un'esperienza sono stati applicati 150 l/ha di soluzione all'1%
17 per 4 volte; ciascun trattamento ha avuto luogo nell'intervallo
18 compreso tra la cimatura e 24 ore prima di una raccolta, inte-
19 ressando precisamente i palchi fogliari maturi e quindi pronti per
20 questo intervento.

21 Dopo la raccolta e la cura in locali per il flue-curing, è sta-
22 to programmato il controllo analitico del contenuto di TSNA del-
23 le foglie di tabacco così trattate in confronto ad un testimone,
24 coltivato in tutto e per tutto allo stesso modo, salvo che per il
25 trattamento sperimentale.



1 L'analisi delle foglie dopo la cura è in fase di completa-
2 mento.

3 Esempio 4

4 Applicazione in post-raccolta su tabacco V. Bright, svolta
5 presso la Fattoria Autonoma Tabacchi di Città di Castello (PG)
6 (coltivatore in area Città di Castello).

7 Come illustrato nella tabella di figura 3, le foglie apicali di
8 una coltura di Virginia Bright cv. VFC-ITB678, provenienti dalla
9 quarta raccolta, sono state suddivise in 7 campioni, con due re-
10 plicazioni, sottoposte ai trattamenti sperimentali descritti, e cu-
11 rate secondo la buona pratica, nota all'esperto del settore.

12 Il Teavigo, estratto concentrato da tè verde utilizzato nel
13 settore biomedico e negli alimenti funzionali, è costituito essen-
14 zialmente da monomeri galloilati di tannini condensati, la cui
15 concentrazione è del 97% (HPLC); quindi la concentrazione di 5
16 g/l equivale a circa 10 mM di tannini.

17 Il Teavigo è stato volutamente scelto per queste sperimen-
18 tazioni in virtù delle dimostrate attività antimicrobiche ed antim-
19 cotiche su microorganismi di interesse biomedico ed alimentare.

20 Il tannino di castagno è una miscela di frazioni 1-8, con ti-
21 tolo in tannini del 4,6% (HPLC); quindi la concentrazione di 115
22 g/l equivale a circa 10 mM di tannini.

23 Di seguito è descritto il metodo di preparazione dei cam-
24 pioni per le analisi.

25 Pesate per lavaggi ed estratti acquosi a caldo:



1 CHV01: 752.1 mg

2 CHV02: 752.6 mg

3 CHV03: 752.0 mg

4 CHV04: 749.8 mg

5 CHV05: 751.4 mg

6 CHV06: 749.6 mg

7 CHV07: 750.6 mg

8 CHV05 per decotto senza lavaggio: 751.7 mg

9 I campioni pesati sono stati tagliati in pezzi di piccole di-
10 mensioni.

11 Lavaggi:

12 I campioni 1-7 sono stati posti in beuta e lavati agitandoli
13 manualmente per circa 2'30'' con 10.0 mL di acqua millipore.
14 L'acqua di lavaggio è stata prelevata con una pipetta, quindi un
15 volume esatto della soluzione di lavaggio è stato concentrato
16 5:1, centrifugato e messo in vial.

17 Estratti acquosi a caldo:

18 I campioni precedentemente lavati sono stati lasciati a-
19 sciugare, quindi sono stati mantenuti a ebollizione, sotto agita-
20 zione, con 50.0 mL di acqua millipore per 15'. Gli estratti otte-
21 nuti sono stati lasciati freddare, filtrati a pressione ridotta, porta-
22 ti a volume esatto, centrifugati e posti in vial per l'analisi
23 HPLC/DAD/ESI-MS.

24 Estratto acquoso a caldo senza lavaggio:

25 Il campione n°8 (ulteriore pesata del CHV05) è stato po-



1 sto in beuta, senza preventivo lavaggio, con 50.0 mL di acqua
2 millipore e mantenuto ad ebollizione per 15', quindi lasciato
3 freddare e filtrato a pressione ridotta. E' stato quindi portato a
4 volume esatto e posto in vial.

5 Estratti idroalcolici:

6 Per ciascun campione (CHV01- CHV07) è stato pesato
7 1.0 g di materiale vegetale. Il materiale pesato è stato tagliato in
8 piccoli pezzi e posto sotto agitazione in 50.0 mL di soluzione
9 EtOH/H₂O 70:30 a pH 3.2 per acido formico.

10 Dopo 20 h i campioni sono stati filtrati a pressione ridotta,
11 portati a volume esatto e posti in vial.

12 Attraverso le metodiche di preparazione di cui sopra, sono
13 stati preparati i seguenti campioni:

14 Lavaggi: CHV01L, CHV02L, CHV03L, CHV04L, CHV05L,
15 CHV06L, CHV07L (serie L).

16 Estratti acquosi a caldo dopo lavaggio: CHV01D,
17 CHV02D, CHV03D, CHV04D, CHV05D, CHV06D, CHV07D (se-
18 rie D).

19 Estratto acquoso a caldo senza lavaggio: CHV05DT.

20 Estratti idroalcolici: CHV01E, CHV02E, CHV03E,
21 CHV04E, CHV05E, CHV06E, CHV07E (serie E).

22 ANALISI QUALI-QUANTITATIVA HPLC/DAD E
23 HPLC/DAD/MS

24 Le analisi sono state condotte al fine di valutare il conte-
25 nuto delle foglie trattate sia in nicotina, nitrosammine e in parti-



1 colare TSNA (Tobacco Specific NitrosAmines), sia in metaboliti
2 secondari prodotti dalla pianta.

3 L'analisi HPC/DAD/MS HPLC è stata eseguita utilizzando
4 una colonna Luna C18 250x4.60 mm, 5 μ m (Phenomenex, Tor-
5 rance, CA). La fase mobile impiegata è costituita da H₂O acidi-
6 ficata a pH 3.2 per HCOOH (A) e CH₃CN (B). È stato applicato
7 un gradiente lineare a quattro rampe, flusso 0,8 mL/min, per 55
8 minuti. Il profilo di eluizione utilizzato è il seguente: inizialmente
9 100% A , quindi il solvente A è stato portato all'85% in 20 min,
10 mantenuto costante per 5 min, diminuito al 75% in 10 min,
11 mantenuto costante per 8 min, infine riportato allo 0% (100%
12 B) in 5 min. I derivati idrossicinnamici sono stati calibrati a 330
13 nm, quelli flavonolici a 350 nm e nicotina e derivati a 254 nm.

14 Nella figura 4 si riportano, a titolo di esempio, i dati relativi
15 al contenuto in nicotina e nitrosammine relativi ad uno dei cam-
16 pioni della prima serie in analisi (serie L).

17 Per i parametri chimici i valori di incertezza estesa sono ri-
18 feriti ad un intervallo di confidenza del 95%.

19 Il limite di determinazione (LOD) risulta uguale a
20 1/10LOQ*3.

21 N.D. = inferiore a LOQ (limite di quantificazione).

22 I nitriti, precursori delle nitrosammine, non si formano
23 quando i livelli di antiossidanti polifenolici, acidi idrossicinnam-
24 mici e flavonoidi, sono alti in contenuto quali-quantitativo. La
25 procedura adottata ha consistito nella valutazione della quantità



1 di molecole, applicate tramite trattamento superficiale, consu-
2 mate da ciascun campione durante il tempo di cura e il contenu-
3 to totale e di singole molecole di metaboliti antiossidanti pre-
4 senti. Solitamente il campione non trattato mantiene un conte-
5 nuto più basso di antiossidanti di tutela che aumentano in con-
6 tenuto quali-quantitativo nei diversi campioni trattati e con di-
7 versi livelli di trattamento. Tutti i campioni sono risultati confor-
8 mi sotto soglia legale di contenuto di nitrosammine igiene-
9 sicurezza, cosicché si può affermare che il metodo ritrovato ri-
10 sulta in grado di garantire e assicurare qualità ed igiene dei cam-
11 pioni nel tempo. Si può inoltre affermare che il positivo aumento
12 di antiossidanti naturalmente presenti nel tabacco, possa garan-
13 tire, con attività sinergica, la tutela della qualità nel tempo dei
14 campioni, evitando l'aumento del tenore di nitrosammine nelle
15 fasi di stoccaggio.

16 Nella figura 5, si illustra, a titolo di esempio, il profilo cro-
17 matografico relativo all'estratto idroalcolico di foglie di tabacco
18 trattate in cura senza aggiunta di soluzione di tannini (CHV01,
19 testimone), con la legenda dei composti identificati.

20 I numeri di riferimento della figura 5 identificano i seguen-
21 ti componenti: 1. nicotina; 2. acido monocaffeoil chinico I; 3.
22 acido monocaffeoil chinico II; 4. acido monocaffeoil chinico III;
23 5. quercetina ramnosil-glucoside; 6. kaempferolo ramnosil-
24 glucoside.

25 Come mostrato in figura 5, e nella successiva tabella di fi-



1 gura 6, il metodo di analisi descritto permette di identificare e
2 quantificare gli alcaloidi presenti nelle foglie di tabacco ma an-
3 che le sostanze di natura polifenolica dotate di attività antiossi-
4 dante ed antiradicalica. I singoli derivati sono stati calibrati uti-
5 lizzando specifiche curve di calibrazione secondo il metodo so-
6 pra descritto, in modo da ottenere i dati quantitativi relativi sia ai
7 singoli composti che alle sottoclassi chimiche.

8 Nella tabella di figura 6 è riportata l'analisi quali-
9 quantitativa dei singoli metaboliti secondari e della nicotina pre-
10 senti negli estratti idroalcolici ottenuti dai campioni presi in esa-
11 me, con i dati espressi in milligrammi per grammo di materiale
12 vegetale campionato.

13 Gli istogrammi riportati nelle figure 7-10 mostrano il con-
14 tenuto in derivati flavonolici totali e derivati idrossicinnamici to-
15 tali valutato per quattro serie di campioni, di cui i primi due (se-
16 rie CHV e PV) sono costituiti da foglie di tabacco varietà Virginia
17 Bright e gli altri due (serie RB e BEB) da foglie di tabacco varietà
18 Burley.

19 Le analisi sono state eseguite con lo stesso metodo de-
20 scritto su estratti idroalcolici di foglie di tabacco dopo il proces-
21 so di cura, ed i risultati sono espressi in milligrammi di polifenoli
22 per grammo di materiale vegetale.

23 Ognuna delle quattro prese in esame è una serie di cam-
24 pioni di tabacco su cui sono stati effettuati i sei diversi tratta-
25 menti con soluzioni di tannino di castagno, di Teavigo e di tè



1 verde (10, 100, 200 g/L e 0.5, 5.0, 10.0 g/L rispettivamente). I
2 derivati flavonolici e quelli idrossicinnamici risultano essere en-
3 trambi presenti in tutti i campioni eccetto quelli della serie "RB",
4 dove i derivati idrossicinnamici sono presenti solo in tracce. Il
5 contenuto in nicotina, nell'ambito delle quattro serie analizzate,
6 varia invece tra 12 e 43 mg/g di materiale vegetale.

7 CONTENUTO IN TSNA – metodo descritto da Li et Al,
8 2006.

9 La tabella della figura 11 mostra i risultati ottenuti, da cui
10 si evince, a seguito dei trattamenti effettuati, un calo delle
11 TSNA totali rispetto al testimone.

12 Esempio 5

13 Applicazione in post-raccolta su tabacco Burley, svolta
14 presso la Fattoria Autonoma Tabacchi di Città di Castello (colti-
15 vatore in area Caserta). In post-raccolta, e subito dopo la predi-
16 sposizione delle filze di foglie appese negli appositi capanni di
17 cura, sono stati effettuati i trattamenti sperimentali alle concen-
18 trazioni e dosi previste, sempre ponendo a confronto tannini i-
19 drolizzabili di castagno e tannini condensati da tè verde.

20 La tabella della figura 12 mostra i risultati ottenuti, da cui
21 si evince, a seguito dei trattamenti effettuati, un calo delle
22 TSNA totali rispetto al testimone.

23 I risultati indicano che il tabacco oggetto di studio, anche
24 in condizioni di non trattamento, mostra un modesto contenuto
25 in nitrosammine in accordo anche con studi scientifici su Burley



1 casertano che riporta valori di TSNA sotto 1 ppm (Monitoraggio
2 del contenuto in nitrosamine nel tabacco Burley, M.I. Sifola, Del-
3 tafina S.p.A., progetto finanziato 2007, dati divulgati 2010).

4 Il metodo analitico riportato permette quindi di poter indi-
5 viduare e quantificare singolarmente sia gli alcaloidi che le due
6 diverse sottoclassi di metaboliti secondari di natura polifenolica
7 con spiccate proprietà antiossidanti ed antiradicaliche, quali i de-
8 rivati flavonolici ed idrossicinnammici.

9 Si è in pratica constatato come il trovato raggiunga il
10 compito e gli scopi prefissati.

11 Infatti, come descritto nell'introduzione, i derivati flavono-
12 lici e caffeici possiedono elevata capacità antiossidante ed anti-
13 radicalica.

14 Il metodo oggetto della presente invenzione permette
15 quindi non solo di quantificare gli alcaloidi, ma anche di valutare
16 l'attività antiossidante totale e l'attività antiradicalica totale, mai
17 riportata su tessuti fogliari delle due varietà di tabacco analizza-
18 te.

19

20

21

22

23

24

25



RIVENDICAZIONI

1
2 1. Metodo per la produzione del tabacco, caratterizzato dal
3 fatto di comprendere l'uso di estratto di tannini di castagno o
4 sue frazioni per ridurre la formazione di nitrosammine nel tabac-
5 co.

6 2. Metodo, secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal
7 fatto che l'estratto di tannini di castagno o sue frazioni sono
8 concentrati esclusivamente con mezzi fisici, senza impiego di
9 additivi chimici.

10 3. Metodo, secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal
11 fatto che i mezzi fisici sono rappresentati preferibilmente da o-
12 smosi inversa e nanofiltrazione.

13 4. Metodo, secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal
14 fatto che l'estratto di tannini di castagno o sue frazioni sono ap-
15 plicati al terreno, in prossimità delle piante, veicolati da acqua ir-
16 rigua o un fertilizzante.

17 5. Metodo, secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal
18 fatto che l'estratto di tannini di castagno o sue frazioni sono ap-
19 plicati sulla pianta intera o sulle foglie delle piante di tabacco in
20 pre-raccolta.

21 6. Metodo, secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal
22 fatto che l'estratto di tannini di castagno o sue frazioni sono ap-
23 plicati sulla pianta intera o sulle foglie delle piante di tabacco in
24 post-raccolta.

25 7. Metodo, secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal



1 fatto che l'estratto di tannini di castagno o sue frazioni sono ap-
2 plicati in soluzione acquosa a concentrazioni comprese tra 0,1 e
3 50%, e preferibilmente tra 5 e 10%, in più interventi nel corso
4 del ciclo del tabacco.

5 8. Metodo, secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal
6 fatto che l'estratto di tannini di castagno o sue frazioni sono ap-
7 plicati in soluzione acquosa a concentrazioni comprese tra 0,1 e
8 5%, e preferibilmente tra 1 e 3%, in successivi trattamenti pre-
9 cedenti le singole raccolte.

10 9. Metodo, secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal
11 fatto che l'estratto di tannini di castagno o sue frazioni sono ap-
12 plicati in soluzione acquosa a concentrazioni comprese tra 0,5 e
13 10%, e preferibilmente tra 1 e 5%, successivamente alla raccol-
14 ta.

15 10. Metodo, secondo le rivendicazioni 8 e 9, caratterizzato
16 dal fatto di comprendere l'applicazione fino a 50 ml di soluzione
17 per metro quadrato di superficie fogliare.

18 11. Metodo, secondo una o più rivendicazioni precedenti,
19 caratterizzato dal che il tabacco è del tipo flue-cured, air-cured,
20 fire-cured o sun-cured e loro miscele in tutte le proporzioni.

21 12. Metodo, secondo una o più rivendicazioni precedenti,
22 caratterizzato dal fatto che la fase di post-raccolta include
23 l'allestimento del tabacco per la cura, la cura, la cernita, la con-
24 servazione e tutte le fasi di lavorazione manifatturiera fino
25 all'approntamento dei prodotti commerciali a base di tabacco,



1 anche in miscela con altre componenti.

2 13. Metodo, secondo una o più rivendicazioni precedenti,
3 caratterizzato dal fatto che l'uso dell'estratto di tannini di casta-
4 gno o sue frazioni riduce il tenore di nitrosammine del tabacco
5 trattato dal 10 al 50%, rispetto al non trattato.

6 14. Metodo per la produzione del tabacco, caratterizzato
7 dal fatto di comprendere l'uso di Teavigo per ridurre la forma-
8 zione di nitrosammine nel tabacco.

9 15. Metodo analitico caratterizzato dal fatto di consentire
10 di individuare qualitativamente e quantificare singolarmente sia
11 gli alcaloidi che i metaboliti secondari di natura polifenolica con
12 spiccate proprietà antiossidanti ed antiradicaliche, e in particola-
13 re i derivati flavonolici ed idrossicinnammici.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25



CLAIMS

1
2 1. A method for making tobacco, characterized in that
3 said method comprises to use chestnut tannin extracts or
4 fractions thereof to reduce tobacco nitrosamine formation.

5 2. A method according to claim 1, characterized in
6 that said chestnut tannin extracts or fractions are concentrated
7 by exclusively using physical means without chemical additives.

8 3. A method according to claim 2, characterized in
9 that said physical means comprise reverse osmosis and
10 nanofiltration.

11 4. A method according to claim 1, characterized in
12 that said chestnut tannin extracts or fractions are applied to the
13 soil, near the plants, and conveyed by irrigation water or a
14 fertilizer material.

15 5. A method according to claim 1, characterized in
16 that said chestnut tannin extracts or fractions are applied either
17 to an overall tobacco plant or to tobacco leaves during a pre-
18 fetching operation thereof.

19 6. A method according to claim 1, characterized in
20 that said chestnut tannin extracts or fractions are applied either
21 to an overall tobacco plant or to tobacco leaves during a post-
22 fetching operation thereof.

23 7. A method according to claim 4, characterized in
24 that said chestnut tannin extracts or fractions are applied as an
25 aqueous solution at a concentration from 0.1% to 50%,



1 preferably from 5% to 10%, in a number of application steps
2 during the tobacco cycle.

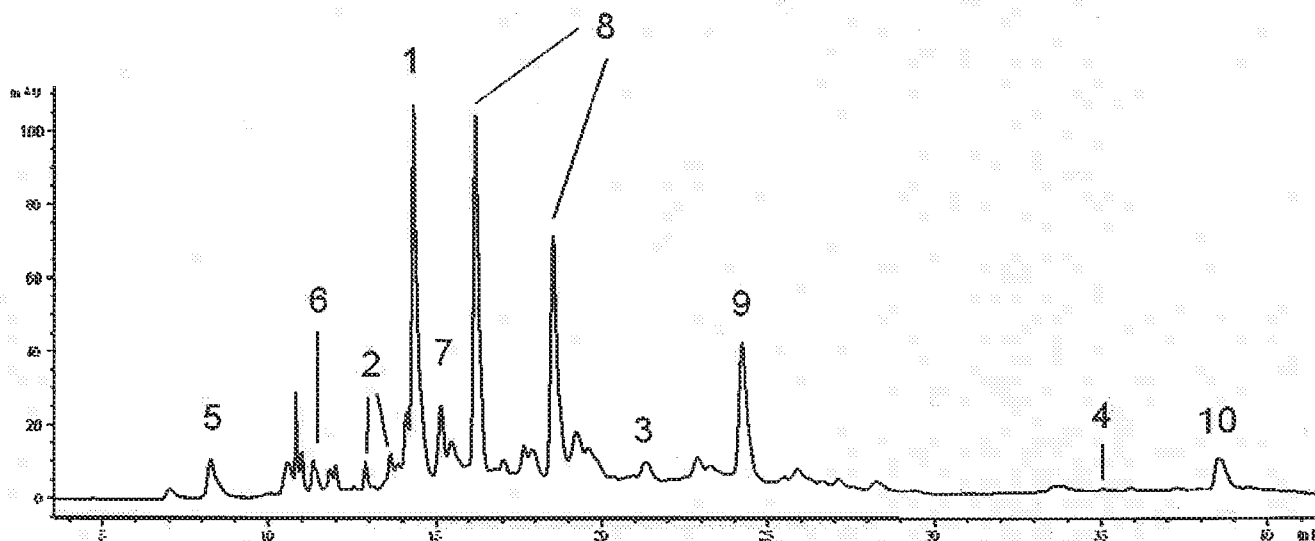
3 8. A method according to claim 5, characterized in
4 that said chestnut tannin extracts or fractions are applied as an
5 aqueous solution at a concentration from 0.1% to 5%,
6 preferably from 1% to 3%, in following treatments before
7 individual tobacco fetching operations.

8 9. A method according to claim 6, characterized in
9 that said chestnut tannin extracts or fractions are applied as an
10 aqueous solution at a concentration from 0.5% to 10%,
11 preferably from 1% to 5%, after the tobacco fetching
12 operation.

13 10. A method according to claims 8 and 9,
14 characterized in that said method comprises to apply up to 50
15 ml of said aqueous solution per square meter of tobacco leave
16 surface.

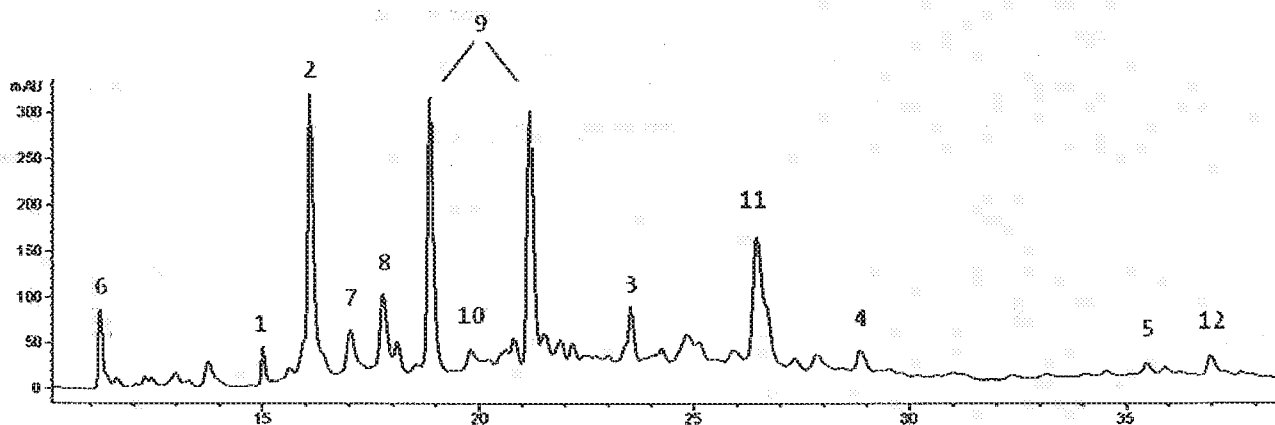
17 11. A method according to one or more of the
18 preceding claims, characterized in that said tobacco is a flue-
19 cured, air-cured, fire-cured or sun-cured tobacco and mixtures
20 thereof in all mixing proportions.

21 12. A method according to one or more of the
22 preceding claims, characterized in that said tobacco post-
23 fetching operation comprises preparing tobacco for curing,
24 curing the prepared tobacco, sorting and preserving tobacco
25 and performing all manufacturing operations to make tobacco



1. Acido gallico; 2. Monogalloil glucosio; 3. Gallotannino m/z 677; 4. Pentagalloil glucosio; 5. Galloil-HHDP glucosio; 6. HHDP glucosio; 7. Ellagitannino m/z 925; 8. Castalagina/vescalagina; 9. Ellagitannino m/z 1085; 10. Acido ellagico

FIG. 1



1. Monogalloil glucosio; 2. Acido gallico; 3. Digalloil glucosio; 4. Trigalloil glucosio; 5. Tetragalloil glucosio; 6. Pedunculagina isomero; 7. Ellagitannino m/z 683; 8. Ellagitannino m/z 925; 9. Castalagina/vescalagina; 10. Ellagitannino m/z 613; 11. Galloil-HHDP glucosio; 12. Acido ellagico.

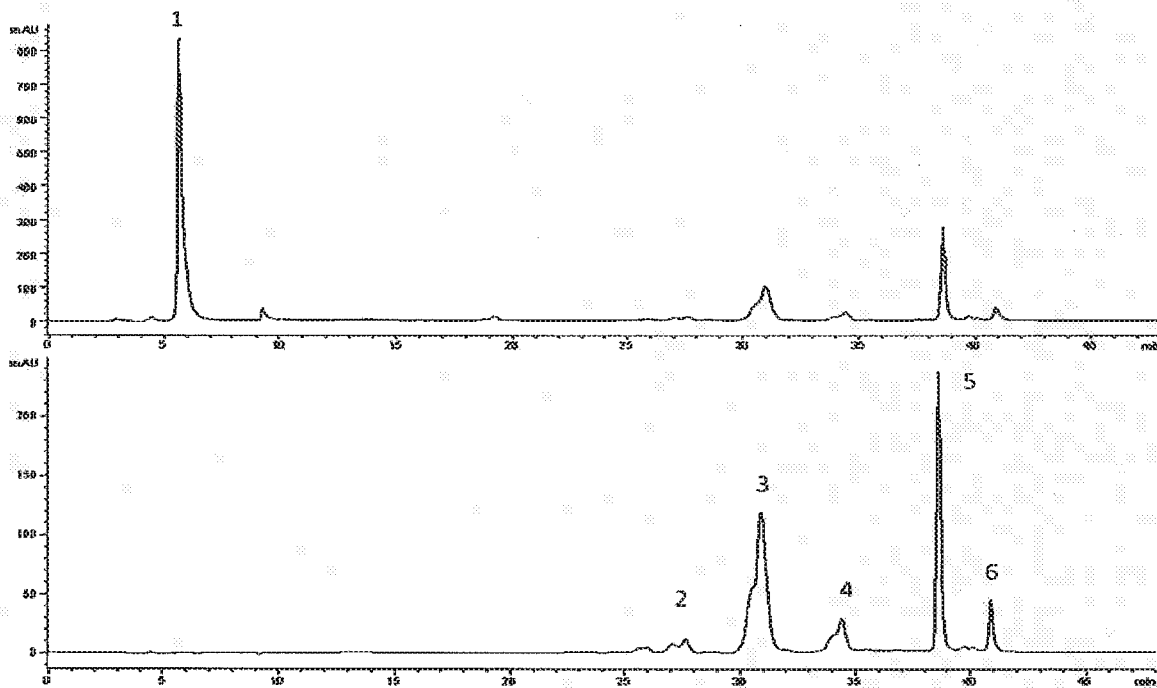
FIG. 2

N°	TRATTAMENTI
CHV01	Testimone
CHV02	Tannino miscela di fraz. 1-8 - 10 g/l
CHV03	Tannino miscela di fraz. 1-8 - 100 g/l
CHV04	Tannino miscela di fraz. 1-8 - 200 g/l
CHV05	Teavigo - 0,5 g/l
CHV06	Teavigo - 5 g/l
CHV07	Teavigo - 10 g/l

FIG. 3

Determinazione	Risultato	Inc	u.m.	LOQ	LOD	Limiti Rec.	Metodo
Amminoalcoli							MPIC/727
Dietanolammina	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
Trietanolammina	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
N,N-Dietanolammina	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
N,N-Dimetiletanolammina	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
1-metossi-2-propilammina	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
2-ammino-2-metil-1-propanolo	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
3-metossipropilammina	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
Morfolina	N.D.		mg/kg	0,050			MPIC/727
TSNA	0,8		mg/kg	0,050			MPIC/727

FIG. 4



1. nicotina; 2. acido monocaffeoil chinico I; 3. acido monocaffeoil chinico II; 4. acido monocaffeoil chinico III; 5. quercetina ramnosil-glucoside; 6. kaempferolo ramnosil-glucoside.

FIG. 5

(Dati in mg/g materiale vegetale)	CHV01E	CHV02E	CHV03E	CHV04E	CHV05E	CHV06E	CHV07E
acido monocaffeoil chinico I	0,779	0,745	0,461	0,404	1,027	0,312	0,876
acido monocaffeoil chinico II	8,203	12,303	9,606	7,580	11,301	7,071	10,399
acido monocaffeoil chinico III	1,514	2,100	1,514	1,022	2,144	1,079	1,983
quercetina ramnosil-glucoside	5,029	6,998	5,190	2,844	5,127	2,634	3,862
kaempferolo ramnosil-glucoside	0,592	0,883	0,634	0,337	0,755	0,321	0,501
NICOTINA	32,209	40,623	32,095	27,323	43,848	34,799	43,212
TOTALE	48,326	63,653	49,499	39,512	64,202	46,216	60,834

FIG. 6

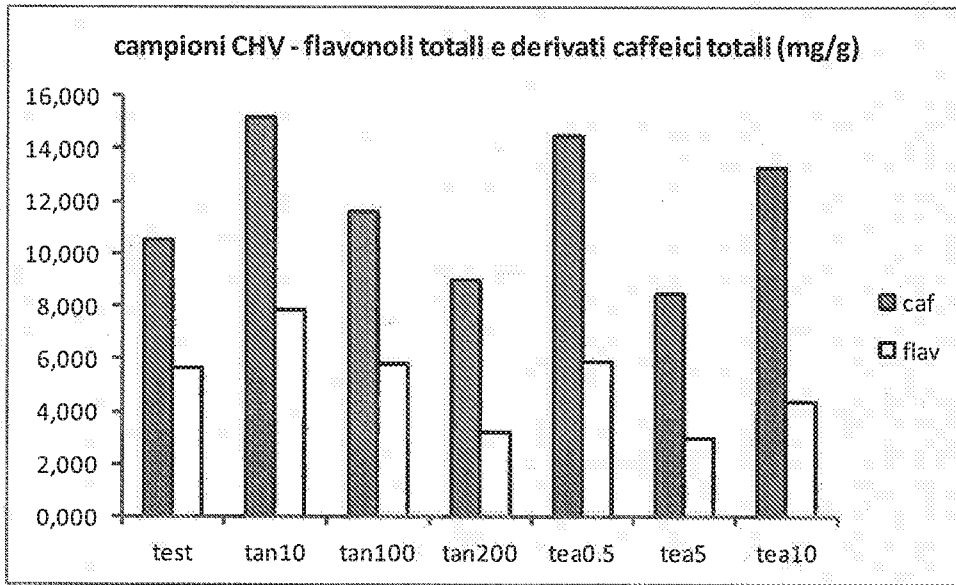


FIG. 7

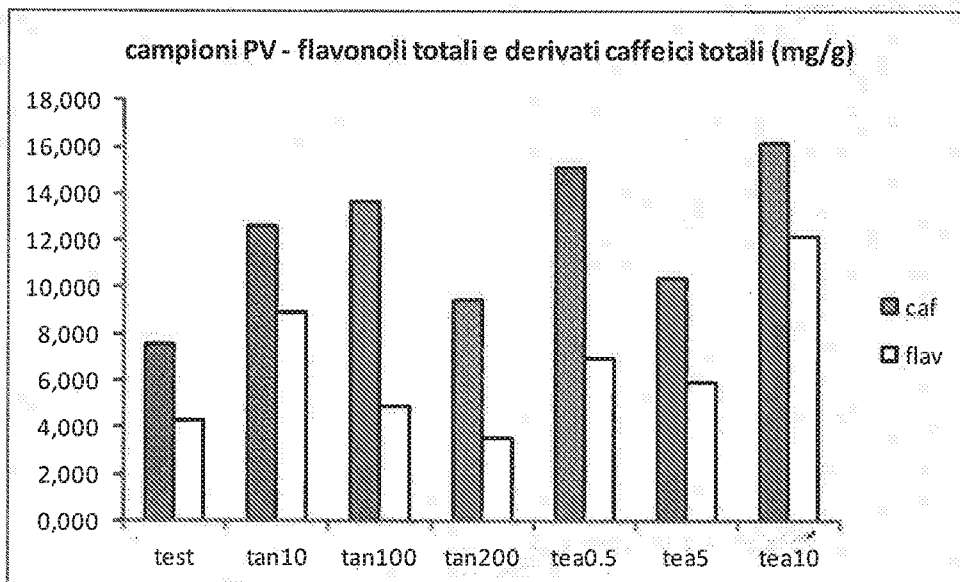


FIG. 8

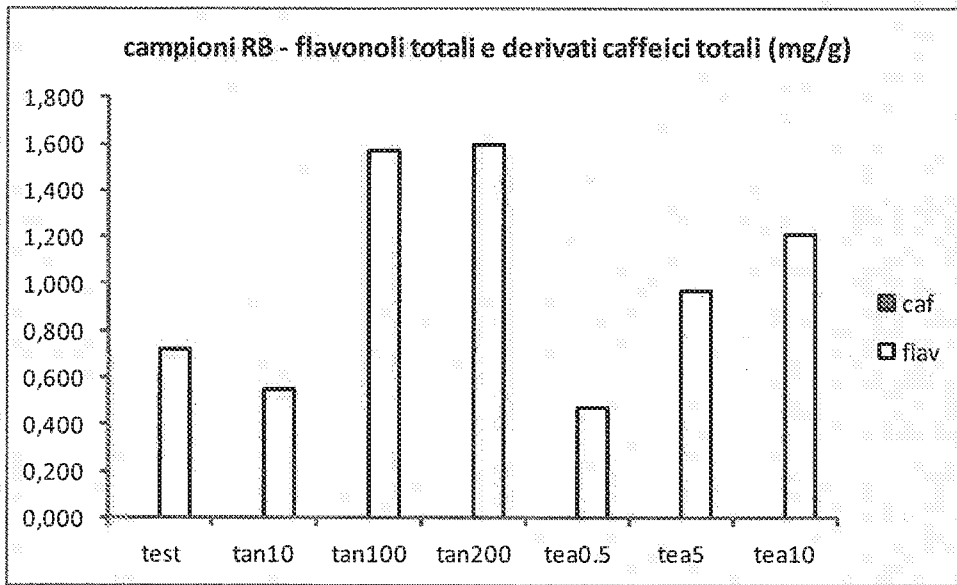


FIG. 9

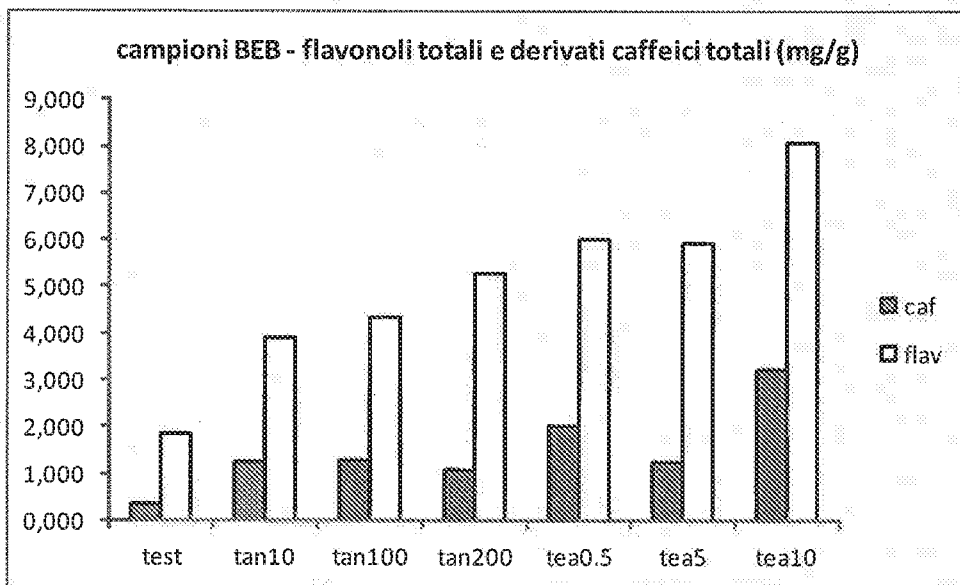


FIG. 10

	<i>TSNA</i> <i>mg/kg</i>
CHV01E	0,8
CHV02E	0,8
CHV03E	0,6
CHV04E	0,7
CHV05E	0,6
CHV06E	0,5
CHV07E	0,5

FIG. 11

	TRATTAMENTI	<i>TSNA</i> <i>mg/kg</i>
RB08	Testimone	0,8
RB09	Tannino miscela di fraz. 1-8 - 10 g/l	0,8
RB10	Tannino miscela di fraz. 1-8 - 100 g/l	0,6
RB11	Tannino miscela di fraz. 1-8 - 200 g/l	0,6
RB12	Teavigo - 0,5 g/l	0,6
RB13	Teavigo - 5 g/l	0,5
RB14	Teavigo - 10 g/l	0,5

FIG. 12