Foto di Andreas Rockstein

L'erba medica è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Leguminose.

Estratto supercritico di Medicago sativa

Caratterizzazione e potenziali applicazioni cosmetiche

Negli ultimi due decenni, come conseguenza di una nuova sensibilità globale verso la salvaguardia della natura, anche il settore cosmetico ha visto considerevolmente aumentare da parte dei consumatori, la richiesta di prodotti a connotazione "green", caratterizzati dalla presenza in formula di materie prime di origine vegetale.
Lo studio presentato, svolto nell'ambito di un lavoro di tesi di Laurea in Biotecnologie per la Salute dell'Università degli Studi di Ferrara, esplora le potenzialità di un estratto di Erba Medica, ottenuto mediante tecnica di estrazione in CO2 supercritica, per un possibile impiego in ambito cosmetico.

**** Irene Ferraro,***
**** Caterina Rossi***
**** Silvia Vertuani***
**** Stefano Manfredini***

Nel contesto cui si è accennato nell'introduzione, si configura come un'opportunità l'identificazione di composti naturali con potenziale di applicazione e/o sostituzione di sostanze sintetiche da impiegare in settori produttivi a più alto valore aggiunto.
Lo scopo di questo studio, svolto nell'ambito di un lavoro di tesi di Laurea in Biotecnologie per la Salute dell'Università degli Studi di Ferrara, è stata l'esplorazione delle potenzialità di un estratto di Erba Medica (*Medicago sativa* L.), ottenuto mediante tecnica di estrazione in CO_2 supercritica, per un possibile impiego in ambito cosmetico. Un esempio di tale tipo di valorizzazione è dato da Chlorophyllin-Copper Complex, un colorante verde, prodotto a partire dalla clorofilla estratta per saponificazione dall'erba medica, in cui il sale di magnesio viene sostituito da un sale di rame. Il complesso ha impiego in ambito alimentare come additivo, dove è identificato con il numero E141, e in ambito cosmetico come colorante, deodorante e antiossidante è utilizzabile in cosmetici naturali e biologici.
Il nostro studio, ancora in fase preliminare, ha valutato la composizione di un estratto ottenuto dall'intera pianta di *M. sativa,* in forma essiccata. L'identificazione dei composti presenti nell'estratto, ha orientato una prima ricerca bibliografica sulle possibili attività cosmetiche. A tal fine si è proceduto con una verifica preliminare di conformità dell'estratto al Regolamento europeo

Medicago sativa L.	
Dominio	Eukaryota
Regno	Plantae
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordine	Fabales
Famiglia	Leguminose (Fabaceae)
Sottofamiglia	Faboideae
Tribù	Trifolieae
Genere	Medicago
Specie	Sativa

REACH (CE) n. 1907/2006: al fine di garantire l'utilizzabilità nel prodotto cosmetico, come definito dal Regolamento EU 1223/2009, si è anche considerato il rispetto degli standard della federazione europea per gli ingredienti cosmetici (EFfCI GMP). Si sono infine evidenziati i requisiti necessari per poter ottenere una certificazione COSMOS e/o NaTrue, cioè una certificazione volontaria di adesione agli Standards proposti da enti certificatori, privati perché un ingrediente possa essere ammesso nella formulazione di un cosmetico naturale o biologico.
Ulteriori approfondimenti e uno studio puntuale della filiera produttiva sono auspicabili, sia per identificare la matrice più idonea all'estrazione per scopo cosmetico, sia per accertare la sua adesione al concetto di sostenibilità economica dell'intera filiera.
L'erba medica è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Leguminose. Originaria della regione della Media (attuale Iran) da cui prende il nome, la pianta venne introdotta già nel IV secolo a.C. in Grecia e successivamente in Italia. Da qui la sua coltivazione come piante da foraggio si diffuse in tutto l'impero romano. Caduta in disuso durante il Medioevo, la coltura venne re-introdotta in Spagna dagli Arabi. Per questo motivo la pianta è chiamata anche erba Spagna o alfaalfa, dall'arabo al-fáṣfaṣa che significa foraggio. L'erba medica rappresenta ad oggi la specie foraggera più coltivata nelle zone a clima temperato. Nel mondo la superficie coltivata supera i 30 milioni di ettari ed è diffusa, oltre che in Europa (soprattutto in Italia, Francia, Spagna e Ungheria), negli USA, in Canada, in Argentina e in Australia e in Cina. Negli USA e in Australia è anche utilizzata come specie da pascolo. In Italia la superficie coltivata a erba medica è di circa 700 mila ettari e si concentra nelle regioni centro-settentrionali, soprattutto in Emilia-Romagna, ma anche nelle Marche, in Lombardia, in Veneto, in Umbria, in Toscana, in Lazio e in Campania. I pregi che hanno decretato una così estesa diffusione della coltura sono: una buona capacità produttiva ed un elevato valore nutritivo del foraggio, soprattutto dal punto di vista del contenuto proteico; la capacità di adattarsi ai diversi ambienti pedoclimatici, grazie alla presenza di diversi tipi e varietà resistenti alla siccità oppure al freddo; una elevata azione miglioratrice della fertilità del terreno, l'ampia possibilità di conservare il foraggio prodotto mediante affienamento, insilamento o disidratazione.

L'estratto SFE di Medicago sativa

L'estrazione e la caratterizzazione chimica dell'estratto di M. sativa, sono state eseguite da ILSA S.p.A. presso lo stabilimento produttivo ed il dipartimento Ricerca e Sviluppo di Arzignano. L'estrazione dalla matrice vegetale essiccata, è avvenuta mediante supercritical fluid extraction (SFE) usando come solvente CO2. La scelta di tale tecnica estrattiva è stata guidata dall'intenzione di scegliere una metodologia che non prevedesse solventi organici, quindi "green", e che fosse possibilmente supportata da dati di letteratura scientifica. Dagli studi presenti in letteratura, la SFE è emersa come tecnica che risponde a questa necessità. Si osserva infatti per le foglie di *M. sativa,* una maggiore resa di estrazione per i composti attivi di interesse cosmetico (in particolare saponine, flavonoidi e polifenoli,) rispetto ad altre metodologie indagate come la macerazione, l'estrazione con ultrasuoni, l'estrazione accelerata con solvente.
La SFE è una tecnica estrattiva facilmente applicabile alle matrici vegetali: la CO_2 allo stato supercritico è infatti un solvente con proprietà intermedie tra quelle di un liquido e di un gas, caratterizzato dalla mancanza di tensione superficiale e da una viscosità trascurabile che ne permettono la penetrazione in matrici solide difficilmente accessibili ai liquidi. La velocità del processo di estrazione risulta anch'essa favorevole, poiché in ambiente supercritico sia la diffusività del solvente che dell'estratto risultano maggiori.
A differenza di altri procedimenti convenzionali la SFE non comporta stress termico delle materie prime e consente, diversamente dall'estrazione con solventi, una maggiore selettività nella tipologia di molecole estratte, semplicemente apportando modifiche alle condizioni di pressione e temperatura del processo. Questa tecnica inoltre evita l'uso di grandi volumi di solvente richiesti per le estrazioni convenzionali e azzera la possibilità di inquinamento da solvente e la necessità di purificare gli estratti. Per il suo ridotto impatto ambientale, la FDA (Food and Drug Administration-USA) ha conferito a questo

Analisi dell'estratto di Medicago sativa ottenuto tramite SFE.

(4S,6S)-4-hydroxy-6-pentadecyltetrahydropyr-2-one	Glycitein	Pyridoxamine
2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone	Hederagenin	Pyridoxine
4-coumaric acid (hydroxycinnamic acid) *	Hydrocaffeic acid	Quinic acid
6'-hydroxy-2',3',4'-trimethoxychalcone	Hydroferulic acid *	Retinal
a-tocotreinol	litseaone B	Retinic acid
b of g –tocotrienol	Loliolide	Retinol
Bayogenin	Lutein	Salicylic acid
betulinic acid	Medicagenic acid	Sativan
Broussochalcone A	Medicarpin	Scopoletin
Callicosin	Melilotocarpan E	Sinapinic acid *
Capsaicin	Methyl oleate	Soyasapogenols E
Capsanthin	Monoglyceride of oleic acid	Tricin
Chrysoeriol	Oleanolic acid	Ursolic acid
Deanolic acid	p-Coumaric acid *	Vanillic_acid *
Desmethylxanthohumol	Pectolinarigenin	Vestitol
d-tocopherol	Pratensein	Violaxanthin
Echinocystic acid	Propyl gallate *	Zeaxanthin
Ferulic acid	Prunetin	α-tocopherol
Flavokawain B	Pseudobaptigenin	γ-tocopherol
Fromononetin	Pyridoxal	

processo industriale l'attributo di GRAS (Generally Recognized as Safe) ovvero generalmente riconosciuto come sicuro per l'uso nei prodotti alimentari. Il limite maggiore all'impiego di tale metodica è attualmente il costo elevato e il dispendio energetico necessario ad ottenere i valori di pressione richiesti dal processo.
L'analisi dell'estratto di *Medicago sativa* ottenuto tramite SFE è stata condotta preliminarmente a livello qualitativo mediante UPLC-HRMS (Ultra high performance liquid chromatography coupled with a high resolution mass spectrometer) ed ha individuato la presenza dei composti elencati in tabella 1. I composti contrassegnati con (*) sono quelli presenti nel prodotto solo a seguito della sua idrolisi acida. L'estratto mostra numerosi metaboliti secondari come fenoli, flavonoidi, saponine. Le saponine derivate dall'erba medica sono glicosidi pentaciclici triterpenici con acido medicageno, ederagenina, baiogenina; come aglicone è presente soiasapogenoli. Tra i flavonoidi presenti nell' estratto di *M. sativa* si possono distinguere i glicosidi apigenina, luteolina, crisoeriolo, tricina, metiltricetina, medicarpina, melilotocarpan E. In letteratura è stata riportata invece la caratterizzazione di estratti etanolici che hanno rivelato la presenza di genistina, daidzeina, gliciteina, genisteina e formononetina. Per la presenza di diverse categorie di composti bioattivi, gli estratti di erba medica potrebbero trovare una applicazione come ingredienti in ambito cosmetico. Le possibili attività di alcuni estratti sono già state evidenziate in diversi studi presenti in letteratura scientifica e in brevetti industriali.

Possibili applicazioni

Alla luce dell'analisi condotta è possibile ipotizzare diversi impieghi cosmetici.

1 - Attivita' antirughe

In un brevetto statunitense del 2003, Bonte et al. hanno attribuito alle saponine e ai sapogenoli triterpenici, presenti in un estratto di erba medica, la funzione di stimolanti della sintesi del collagene IV, componente essenziale della giunzione dermoepidermica GDE. Un aumento significativo nella quantità di collagene IV si riscontra nelle colture di cheratinociti umani coltivate in presenza di saponine di *M. sativa*. La concentrazione di saponine che determina l'attività massima è di 10ug/ml. Un ulteriore effetto sulla produzione di collagene è stato osservato quando questi composti sono stati usati in sinergia con β-ecdysone, preferibilmente in rapporto 1:1 (Bonte et al., 2003). Il β-ecdysone è un ormone presente negli invertebrati, dove svolge funzione di controllo della crescita e un fitosterolo prodotto da diverse piante. Come emerso dagli studi condotti sulla molecola, questa da sola non incrementa la quantità di collagene, ma agisce come potenziatore (effetto booster). Poiché l'aumento della sintesi di collagene IV e l'adesione dei cheratinociti dello strato basale alla giunzione dermo epidermica sono stati associati ad una riduzione della profondità delle rughe e/o al rallentamento della loro progressione (Bonte et al., 2002), l'estratto di *Medicago sativa* si candida ad un approfondimento per l'utilizzo in cosmesi come attivo antirughe.

2 - Attività antiossidante

Negli ultimi decenni l'attività antiossidante degli estratti vegetali è stata ampiamente indagata anche in ambito cosmetico, trovando due principali ambiti applicativi: un'applicazione tecnologica, con impiego degli estratti nella protezione antiossidante della formula cosmetica e un'applicazione funzionale che prevede l'uso degli estratti per la protezione dei sistemi biologici contro processi ossidativi endogeni

Foto di Michael Kin

Gli estratti vegetali possono avere funzione di preservanti ausiliari sia a supporto di molecole conservanti tradizionali, che di strategie di conservazione più complesse

ed esogeni. In quest'ultimo caso gli estratti possono mostrare attività antiage, lenitiva e protettiva dell'epidermide. Per quanto concerne *M. sativa*, uno studio del 2013, ha indagato l'attività antiossidante di un estratto idroalcolico, misurandone la capacità di scavenging radicalico su radicale DPPH, il potere di riduzione ferrica con saggio FRAP e determinandone il contenuto totale dei polifenoli TPC e il contenuto di flavonoidi totali (TFC). Questi ultimi due saggi non misurano direttamente la capacità antiossidante, ma danno comunque un'indicazione della possibile attività dell'estratto, essendo polifenoli e flavonoidi molecole note per la loro capacità antiossidante. Da questo studio è emerso che, mentre i valori antiossidanti dell'estratto risultano relativamente elevati secondo i saggi DPPH e FRAP, il contenuto in polifenoli e flavonoidi si dimostra basso. Gli autori hanno suggerito che per *M. sativa* l'attività antiossidante fosse da attribuire ad altre classi di composti. Uno studio del 2017 (Krakowska et al., 2017) ha misurato e confrontato l'attività antiossidante di estratti da foglie, fiori, semi e radici di *M. Sativa*, ottenuti attraverso 4 diverse metodiche: macerazione in etanolo al 70% e al 96%, estrazione con ultrasuoni in etanolo al 70% e al 96% (UAE), estrazione accelerata con solvente etanolo al 70% e al 96% (ASE) ed estrazione con fluidi supercritici mediante CO_2 (SFE) e CO_2 con aggiunta di piccole concentrazioni di 2 cosolventi rispettivamente etanolo al 70% (EtOH70-SFE) e etanolo al 96% (EtOH96-SFE). Lo studio aveva lo scopo di individuare la tecnica di estrazione con la maggior resa e con il maggior contenuto di composti attivi a elevato potenziale antiossidante, individuati in fenoli, flavonoidi e saponine. Lo studio ha trovato in ASE al 70% di Etanolo il metodo con la resa più alta di estrazione, ma ha anche trovato che l'estrazione e SFE con Etanolo al 96%" come co-solvente, pur risultando la tecnica con il più basso rendimento, fornisce estratti particolarmente ricchi di flavonoidi e saponine che mostrano elevata capacità di scavenging, misurata mediante saggio DPPH. Lo studio individua in particolare in fiori, foglie, e radici una possibile fonte di antiossidanti naturali per nutraceutici, additivi alimentari e ingredienti cosmetici.

3 - Attività antimicrobica

L' attività antimicrobica degli estratti vegetali è una caratteristica desiderabile per ingredienti di utilizzo cosmetico, specialmente per quella categoria di prodotti che ricade nel "naturale" certificabile, dove l'impiego di conservanti tradizionali è condizionato dalle limitazioni poste dai vari disciplinari di certificazione volontaria. Gli estratti vegetali possono avere funzione di preservanti ausiliari sia a supporto di molecole conservanti tradizionali, che di strategie di

Foto di Tore Bustad

Secondo COSMOS, l'estratto di M. sativa ottenuto tramite CO_2 supercritica rientra nella categoria degli agro-ingredienti processati fisicamente: la pianta non è OGM.

conservazione più complesse, le quali prendono in considerazione molteplici fattori come la riduzione dell'acqua libera, il pH del prodotto o l'utilizzo di packaging airless. Un estratto vegetale che sia un attivo funzionale, ad esempio un attivo antirughe, e al contempo abbia attività preservante sarebbe ideale anche in un'ottica di riduzione del numero complessivo di ingredienti, trend attuale nel mercato cosmetico.

Il potenziale antimicrobico degli estratti di *Medicago sativa*. è stato indagato da Rodrigues et al. che hanno definito la MIC (concentrazione minima inibitoria) di estratti idroalcolici di 7 varietà di *Medicago s*., contro *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, trovando tutti gli estratti attivi sui microrganismi testati, con l'eccezione di *P. Aeruginosa e C. Albicans.* L' attività antibatterica è stata ipotizzata essere correlata alla presenza di elevate quantità di composti fenolici e flavonoidi nella composizione degli estratti. La mancata efficacia su specifici batteri è stata correlata alla presenza della matrice extracellulare per *P. aeruginosa* e alla complessa parete cellulare di *C. albicans*, che impedirebbero agli estratti di entrare in contatto con le strutture cellulari.

Khan S. et al. hanno indagato il potere antimicrobico di estratti di Medicago Sativa in etanolo, metanolo, etilacetato, esano e acqua su 3 batteri Gram-positivi (*Bacillus subtilis, Styphyloccus aureus, Bacillus atrophoeus*), 3 Batteri Gram-negativi (*Salmonella typhi, Klebsella pneumoniae* ed *Escherichia coli*) e 3 ceppi fungini (*Candida albicans, Rhizopus sp* e *Aspergillus sp*). Tutti gli estratti hanno mostrato attività su tutti i ceppi, con ordine di efficacia sui Gram-positivi

Foto di silviarita

La quantità di collagene presente nella pelle si abbassa con l'invecchiamento.

L'estratto SFE di Medicago sativa L. potrebbe dimostrare attività di tipo antimicrobico correlato alla presenza di saponine, sapogenine, fenoli e flavonoidi.

Foto di Andreas Rockstein

Foto di Marco Verch Professional

Medicago sativa. Come aspetto funzionale, l'effetto antirughe si configura come quello più attraente ai fini dell'upcycling di una pianta ritenuta comunemente "povera" ed usata come foraggio

> Gram-negativi > Funghi
L'estratto di etanolo è risultato il più efficace tra i 5, poiché l'etanolo come agente disidratante, provoca danno della membrana cellulare, rapida denaturalizzazione delle proteine, interferenza con il metabolismo cellulare e lisi.
Avato et al. hanno studiato l'attività antimicrobica delle saponine isolate da *M. sativa* contro lieviti selezionati di importanza medica, batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Dallo studio è emersa una crescente attività antibiotica passando dagli estratti di saponina ai campioni di sapogenina, così suggerendo che la parte zuccherina non fosse importante per l'efficacia antimicrobica. L'attività è stata trovata particolarmente elevata contro i batteri Gram-positivi (*Bacillus cereus, B. subtilis, Staphylococcus aureus* ed *Enterococcus faecalis*). È stata inoltre osservata una discreta attività antimicotica, principalmente contro *Saccharomyces cerevisiae*. Le proprietà antimicrobiche osservate di *M. sativa* risultano correlate al contenuto di acido medicageno. In conclusione l'estratto SFE di *Medicago sativa* L. potrebbe dimostrare attività di tipo antimicrobico correlato alla presenza di saponine, sapogenine, fenoli e flavonoidi. Evidenze in letteratura sono presenti soprattutto su estratti di tipo alcolico e su singole categorie chimiche, rendendo necessarie ulteriori indagini, possibilmente mirate ai microrganismi di maggior interesse per il cosmetico come *E. coli, C. albicans, A. brasiliensis, S. aureus, P. aeruginosa.*

CONSIDERAZIONI NORMATIVE

L'estratto di *Medicago sativa* da noi analizzato è, secondo l'articolo 6(1) del Regolamento REACH (CE) n. 1907/2006, esente dalla registrazione, poiché viene attualmente prodotto in quantità inferiori ad 1 tonnellata/anno e perché non contiene sostanze che siano definite come persistenti, bioaccumulative e tossiche (PBT) in accordo con i criteri definiti nell'Allegato XIII, o incluse nella lista stabilita in accordo con l'Articolo 59(1) del Regolamento REACH in una quantità superiore allo 0,1% in peso.
Secondo i primi dati tossicologici reperiti in letteratura (Rodrigues et al., 2013) l'estratto idroalcolico, testato per la possibile citotossicità su cheratinociti e fibroblasti mediante MTS assay e LDH assay, ha dato esito favorevole e risulta impiegabile in ambito cosmetico.
Ulteriori informazioni sull'estratto SFE dovranno essere reperite per permettere una più puntuale valutazione della sicurezza nel rispetto del regolamento EU 1223/2009.
L'estratto in SFE risulta certificabile secondo i requisiti richiesti da EFfCI. Questi prevedono che la produzione e la distribuzione siano effettuate secondo le proprie buone norme di fabbricazione, che si basano su tut-

ti i principi chiave della gestione della qualità della ISO 9001:2015 e includono requisiti aggiuntivi specifici per il settore cosmetico. L'adesione a queste norme è su base volontaria ma sempre più richiesta dai produttori di prodotti cosmetici.

Le certificazioni per il cosmetico naturale/biologico come COSMOS e NaTrue, sono anch'esse su base volontaria. Secondo COSMOS, l'estratto di *M. sativa* ottenuto tramite CO2 supercritica rientra nella categoria degli agro-ingredienti processati fisicamente: la pianta non è OGM e rispetta i requisiti della convenzione di commercio internazionale sulle specie minacciate della Fauna e Flora selvatica non essendo una specie in via d'estinzione; la tecnica SFE è un processo di estrazione ammesso ed elencato nell'Appendice I del regolamento COSMOS e poiché non viene utilizzato nessun solvente organico, la percentuale di biologicità dell'ingrediente è pari al 100%, se si utilizzano piante da agricoltura biologica. Anche NaTrue classifica l'estratto di *M. sativa* in CO_2 supercritica come una sostanza naturale poichè è ottenuto secondo una tecnica di estrazione riportata nell'allegato 1a del proprio Standard e non viene sottoposto a reazioni enzimatiche o microbiologiche e nemmeno al trattamento con radiazioni ionizzanti. Quanto al livello di certificazione, se non è disponibile un certificato da agricoltura biologica l'ingrediente verrà considerato per la certificazione naturale e non per quella biologica.

Alla luce delle considerazioni sopra riportate riteniamo che sia interessante indirizzare i futuri studi verso una valutazione dell'attività antimicrobica e antiossidante per un possibile uso come conservante per cosmetici. Infine come aspetto funzionale, l'effetto antirughe si configura come quello più attraente ai fini dell'upcycling di una pianta ritenuta comunemente "povera" ed usata come foraggio.

**** UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie - Master di II livello in Scienza e Tecnologia Cosmetiche***

BIBLIOGRAFIA

1 - Avato P, Bucci R, Tava A, Vitali C, Rosato A, Bialy Z, Jurzysta M. (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* spp. structure-activity relationship. Phytother Res, 2006;Pages 454–457.

2 - Bonte, F., Dumas, M., Heusele, C., & Le Blay, J. (2002). Cosmetic treatment method for fighting against skin aging effects: Vol. United Sta (Patent No. US 6.6471,972 B1).

3 - Bonte, F., Dumas, M., & Perrier, P. (2003). Saponin or sapogenol compositions for increasing collagen iv synthesis: Vol. United Sta (Patent No. US 6,641,848 B1).

4 - Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of Medicago sativa: A review. Pharmaceutical Biology, 49(2), 211–220. https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732

5 - Khan, Siraj, et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity of the Cichorium intybus (Familyasteraceae) and Medicago sativa (Familyfabaceae) Peshawar. Pakistan. J Pharmacognosy Phytochem, 2018, 7.3: 603-616.

6 - Alan Mortensen, Asger Geppel, HPLC–MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin, Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 8, Issue 3, 2007, Pages 419-425.

7 - Battini Ferdinando, *Coltivazioni Erbacee. Corso di produzioni vegetali,* Edagricole Scolastico Rizzoli Education, 2016, Vol B.

8 - Wrona, O.; Rafińska, K.; Walczak-Skierska, J.; Możeński, C.; Buszewski, B. Extraction and Determination of Polar Bioactive Compounds from Alfalfa (Medicago sativa L.) Using Supercritical Techniques. Molecules 2019, 24, 4608.

9 - Francisca Rodrigues, Ana Palmeira-de-Oliveira, José das Neves, Bruno Sarmento, Maria Helena Amaral, Maria Beatriz Oliveira, Medicago spp. extracts as promising ingredients for skin care products, Industrial Crops and Products, Volume 49, 2013, Pages 634-644,

10 - Krakowska, A., Rafińska, K., Walczak, J., Kowalkowski, T., & Buszewski, B. Comparison of Various Extraction Techniques of Medicago sativa: Yield, Antioxidant Activity, and Content of Phytochemical Constituents. Journal of AOAC International, 100(6), 2017, Pages 1681–1693.

11 - Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 342, 22 dicembre 2009 Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 , sui prodotti cosmetici doi:10.3000/1725258X.L_2009.342.ita

12 - Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 342, 22 dicembre 2009 Regolamento (CE) n. 1223/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 , sui prodotti cosmetici doi:10.3000/1725258X.L_2009.342.ita

13 - NaTrue, Il Marchio NATRUE: requisiti per i cosmetici naturali e biologici, Versione 3.9, (01/01/2021), disponibile online Il Marchio NATRUE: requisiti per i cosmetici naturali e biologici,

14 - COSMOS, Standard Per Cosmetici biologici e naturali Versione 3.1: 1 Giugno 2020 disponibile online 0bbe4a_22c65b2405d54f31a-322031b3e188ebb.pdf (cosmos-standard.org)

15 - EFfCI, GMP For Cosmetic Ingredients, 2017, disponibile online https://effci.com/docs/EFfCI%20GMP%20Guide%20Final%202017.2.pdf